



2012. XII. évf. 3. szám

Tartalom:

A *Streptococcus pneumoniae* szerotipizálás és rezisztencia vizsgálat eredményei 2008. 01. 01-től 2012. 08. 31-ig

Tirczka Tamás, Berta Brigitta

Országos Epidemiológiai Központ, I. Bakteriológiai Osztály, Budapest

Szifilisz szerodiagnosztika – hagyományos és új vizsgálómódszereink helye a nemzetközi gyakorlat alapján

Várkonyi Viktória,¹ Balla Eszter²

Körúti Orvosi Centrum¹, Budapest

Országos Epidemiológiai Központ, II. Bakteriológiai Osztály², Budapest

A baktériumok rendszertana és azonosítása

Szabó Zsuzsa

Országos Epidemiológiai Központ, II. Bakteriológiai Osztály, Budapest



Alapító szerkesztők: Dr. Füzi Miklós (PhD)
Dr. Gacs Mária
Szerkesztő: Dr. Gacs Mária
Felelős szerkesztő: Dr. Visontai Ildikó
Operatív szerkesztő: Tirczka Tamás
Tóth Ákos

**A Mikrobiológiai Körlevelek az OEK honlapján
www.oek.hu elérhetőek.**

A *Streptococcus pneumoniae* szerotipizálás és rezisztencia vizsgálat eredményei 2008.01.01-től 2012.08.31-ig

Tirczka Tamás, Berta Brigitta

Bevezető

A *Streptococcus pneumoniae* számos betegség okozója főleg fiatal gyermekek és az idősek körében. Jellemzője, hogy kizárólag az embert betegíti meg, a fertőzést az egyik ember cseppfertőzéssel adja tovább a másiknak. A pneumococcus számos baktériumhoz hasonlóan az egészséges emberek felső légutaiban (orr és garat) természetes körülmények között is jelen van anélkül, hogy a szervezetben bármilyen betegséget okozna. Ugyanakkor a pneumococcus az egyik leggyakrabban előforduló mikroorganizmus a két évesnél fiatalabb gyermekeknél elsősorban a nasopharynx-ban (orrgarat) mutatható ki. A baktérium hordozása könnyen veszélyessé válhat a kicsik számára, mivel olyan külső, illetve belső hatások következtében, melyek az immunrendszer védekező képességét csökkentik, igen agresszívvá válhat. Az orr- vagy a garatüreg nyálkahártyáját áttörve a véráramba kerülhet, s ott súlyos, akár életveszélyes betegségeket - agyhártyagyulladást, vérmérgezést, tüdőgyulladást - okozhat.

A pneumococcus által okozott egyéb betegségek közül a leggyakoribb a középfülgyulladás. A pneumococcus által okozott fertőzések gyakorisága, a szövődmények súlyossága, vagy a kórokozó antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája miatt létfontosságú a hatékony megelőzés, amit jelenleg egyedül a védőoltást jelent.

Magyarországon a pneumococcus fertőzés megelőzésére aktív immunizációval, kétféle vakcina típussal – polysaccharid és konjugált vakcinák – van lehetőség. Aktív immunizációra mind a polysaccharid, mind a konjugált pneumococcus vakcinák alkalmasak. A polysaccharid vakcinák az emberben bacteraemia-t leggyakrabban okozó 23 szerotípus tokjának immunogenitásért felelős részét tartalmazzák, a konjugált vakcinák pedig a gyermekkorban invazív betegséget leggyakrabban okozó 7, 10 illetve 13 szerotípusát fehérjéhez konjugálva.

A *S. pneumoniae*-nak jelenleg több mint 90, egyedi polysaccharid kapszulával rendelkező szerotípusa ismert, amelyek a baktérium felszínéhez kötődve meggátolják a baktérium fagocitózist. A szerotípusok előfordulási gyakorisága nagymértékben különbözik a népességben.

Magyarországon először 2002-2004 között - a *Prevenar 7* (PCV7) konjugált vakcina bevezetését megelőzően – történt felmérés az öt éven aluli gyermekek körében az invazív pneumococcus betegségekből izolált *S. pneumoniae* szerotípusainak előfordulására és gyakoriságára vonatkozóan.

A vakcináció hatásának tudható be, hogy az ún. nem-vakcina szerotípusok gyakorisága emelkedett az oltások következtében, azaz az alkalmazott konjugált oltóanyag hatékonysága csökkent. Ez indokolta újabb szélesebb spektrumú, nagyobb védelmet nyújtó konjugált vakcinák alkalmazását (PCV10 és PCV13).

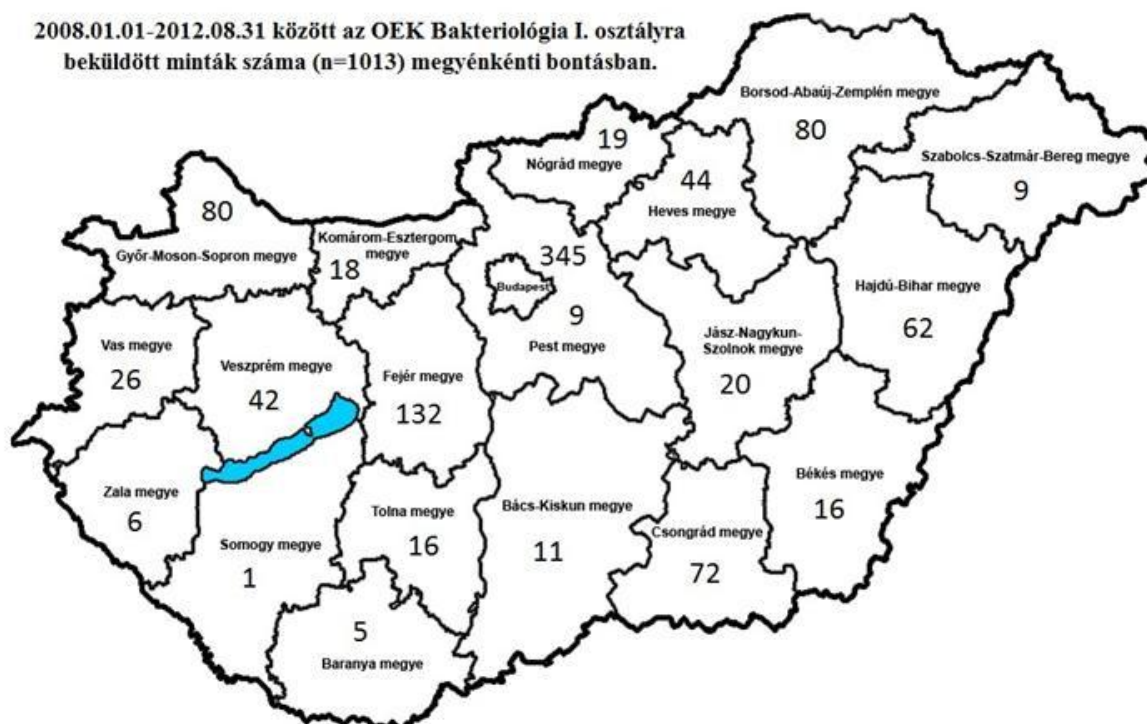
Minták

A) Összes mintatípus

Az Országos Epidemiológiai Központ 2008. szeptember 30-án levelet küldött ki valamennyi mikrobiológiai laboratórium számára, melyben értesíti a címzetteket a „*Streptococcus pneumoniae* által okozott invazív megbetegedések (IPD)” hazai adatgyűjtési (surveillance) rendszerének elindulásáról. A surveillance célja, hogy felmérje és több éven keresztül nyomon kövesse a pneumococcus szerotípusokat és azok változását a védőoltások alkalmazását követően. Az adatgyűjtéshez önkéntesen csatlakozott laboratóriumok - kezdetben 23 - által beküldött *S. pneumoniae* izolátumok szerotípusait határoztuk meg. 2012 áprilisában ismételt felkérés került kiküldésre minden laboratóriumnak elektronikusan, valamint a Mikrobiológiai Körlevél 2012. évi 2. számához csatolva. Ennek köszönhetően jelenleg már 46 laboratórium vesz részt az IPD rendszerben. A laboratóriumok által kitenyésztett és beküldött pneumococcus törzsek, illetve klinikai minták (liquor, vér) 67 kórház beteganyagából származtak.

Összesen 1013 minta érkezett be a vizsgált időszak végéig. Ezek területi eloszlását szemlélteti az 1. ábra. A területi előfordulás gyakoriságát jelző számok azonban messzemenő következtetést nem tesznek lehetővé. Bár ismert, az invazív, rezisztens törzsek halmozott megjelenése, ugyanakkor befolyásolhatja a beküldött törzsek számát a vizsgálati anyag vételének gyakorisága és a laboratórium hozzáállásának aktivitása is. Meg kell azonban jegyeznünk azt is, hogy a beküldött minták 6,1%-a nem volt *S. pneumoniae*, vagy szállítási, tárolási gondok miatt nem volt visszatenyésztendő.

2008.01.01-2012.08.31 között az OEK Bakteriológia I. osztályra beküldött minták száma (n=1013) megyénkénti bontásban.



1. ábra

A kiadott körlevélben megfogalmazottak szerint elsősorban az invazív fertőzésekből valamint a középfülből származó törzsek beküldését vártuk. A normálisan steril helyről származó invazív minták (liquor, vér, ízületi-, pleura-, nyirokcsomó-, arcüregi-, hasüregi- vagy hasúri punktatúmok) és a középfül minták mellett számos egyéb, nem invazív fertőzésből (felső légúti-, trachea-, bronchus-, szaruhártya-, felületi sebváladékok) származó pneumococcus törzs is érkezett, melyeknél a szerotípus meghatározást elvégeztük, de a későbbiekben a statisztikai feldolgozásba nem vettük be.

A mintatípusonként beérkezett minták számát az 1. táblázat szemlélteti.

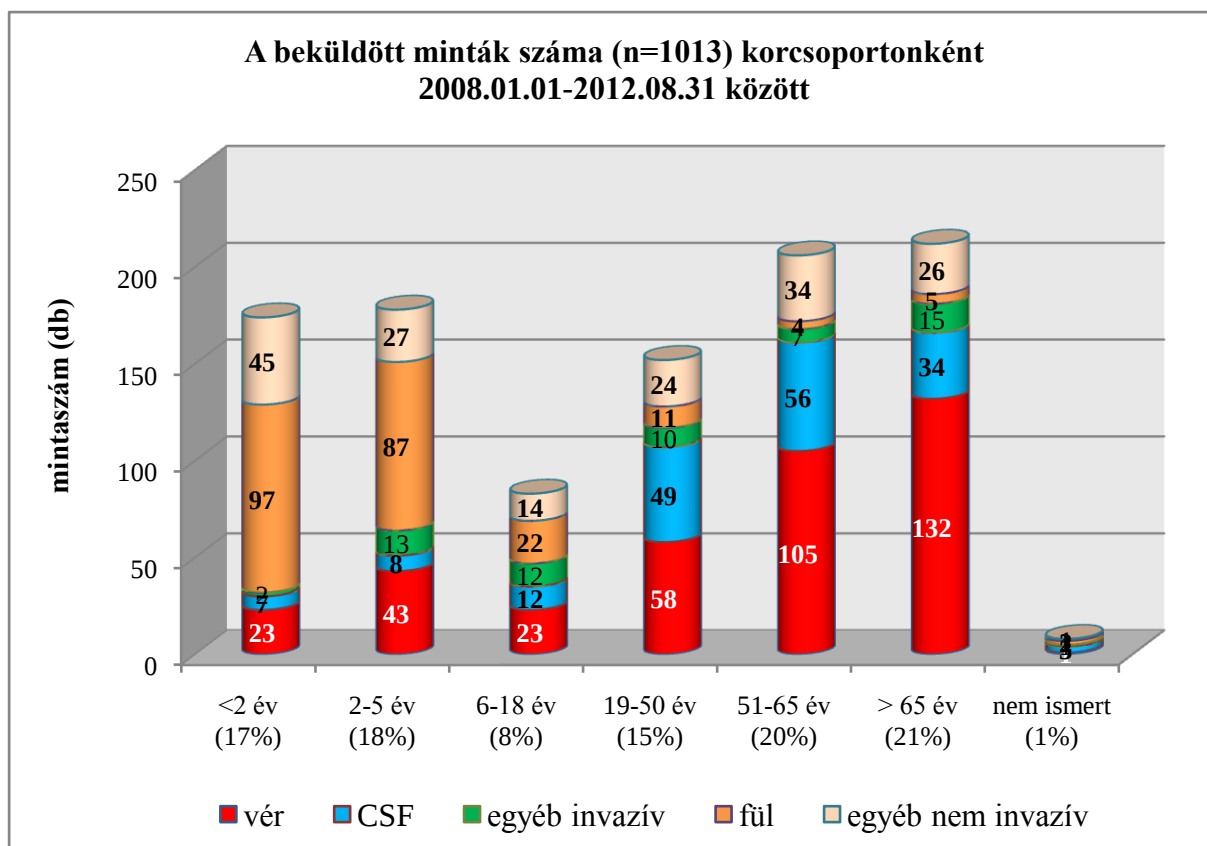
1. táblázat A 2008.01.01-2012.08.31 között beküldött minták száma mintatípusonként, évenkénti bontásban.

	2008	2009	2010	2011	2012	összesen (db)
liquor (CSF)	20	37	30	47	35	169
vér	30	97	88	84	86	385
egyéb invazív	5	8	12	15	20	60
fül	14	41	41	53	79	228
egyéb nem invazív	5	12	107	19	28	171
Összesen:	74	195	278	218	248	1013

Az IPD-ből származó pneumococcus törzsek gyűjtésében nem határoztunk meg kiemelt korcsoportokat. Valamennyi korosztályt bevontuk a vizsgálatba, ennek köszönhető, hogy nemcsak az 5 év alatti korcsoportban, hanem a felnőtt korosztályban előforduló szerotípusokat is fel tudtuk/tudjuk térképezni.

Mint a 2. ábrán látható, közel azonos számú minta érkezett be az évek során az 5 év alatti és az 50 év feletti korosztályból. A mintatípus összetétel azonban jelentős különbségeket mutat. Az 5 év alatti korcsoportokban az invazív minták a 2 év alattiaknál 18%-ot, a 2-5 év közöttiekénél 36%-ot tesznek ki. Ezzel szemben ugyanez az érték az 51-65 év közöttiekénél 82%, a 65 év feletti korcsoportban már 85%.

Az 5 év alatti korcsoportokban a fülvádékok képviselik az anyagok többségét (56% ill. 49%), amely megerősíteni látszik azt az irodalmi adatot, hogy a középfülgyulladás gyermekbetegség és elsősorban az 5 éven aluliakat sújtja.

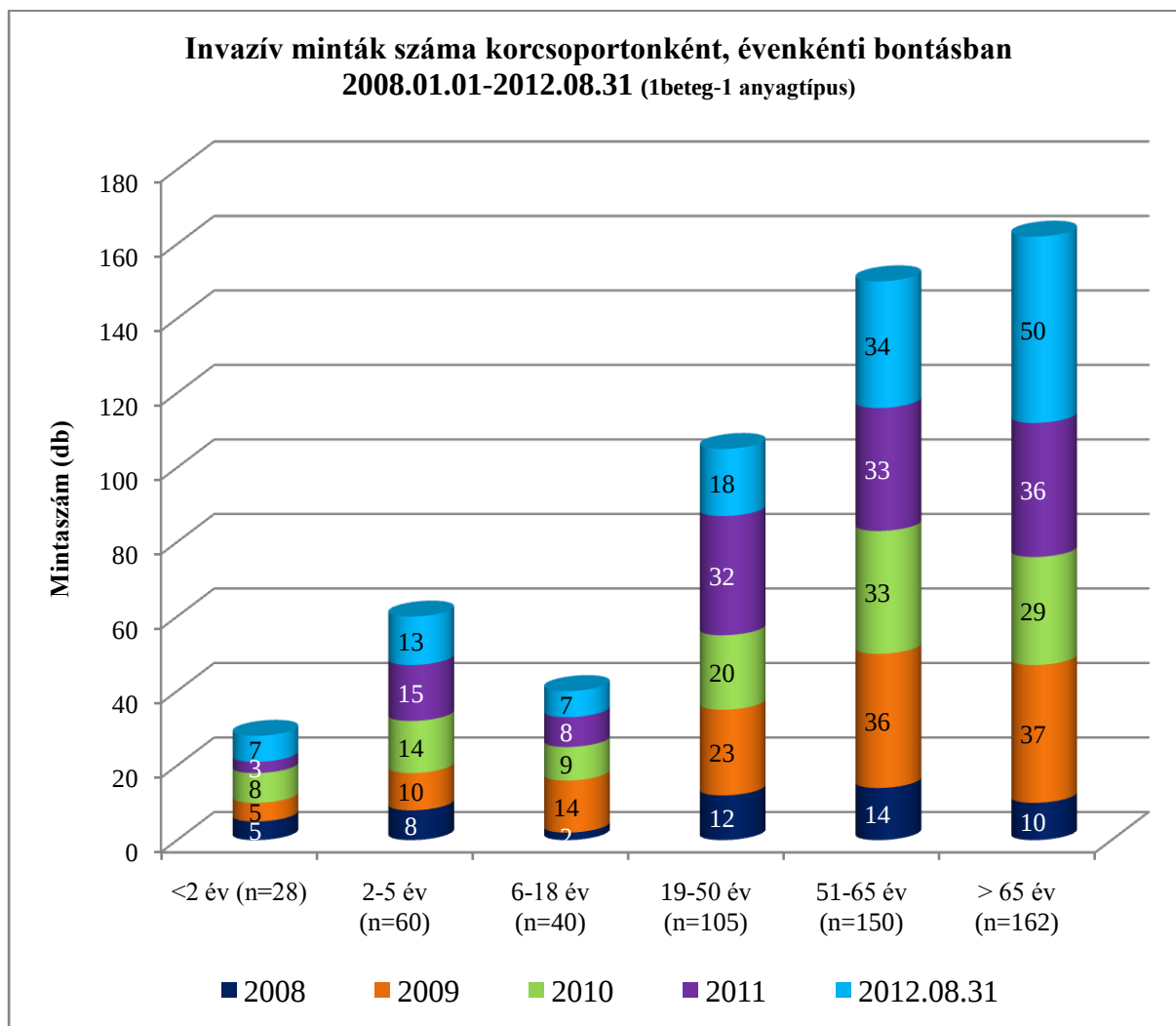


2. ábra

B) Invazív fertőzésekből származó minták (1 beteg - 1 mintatípus)

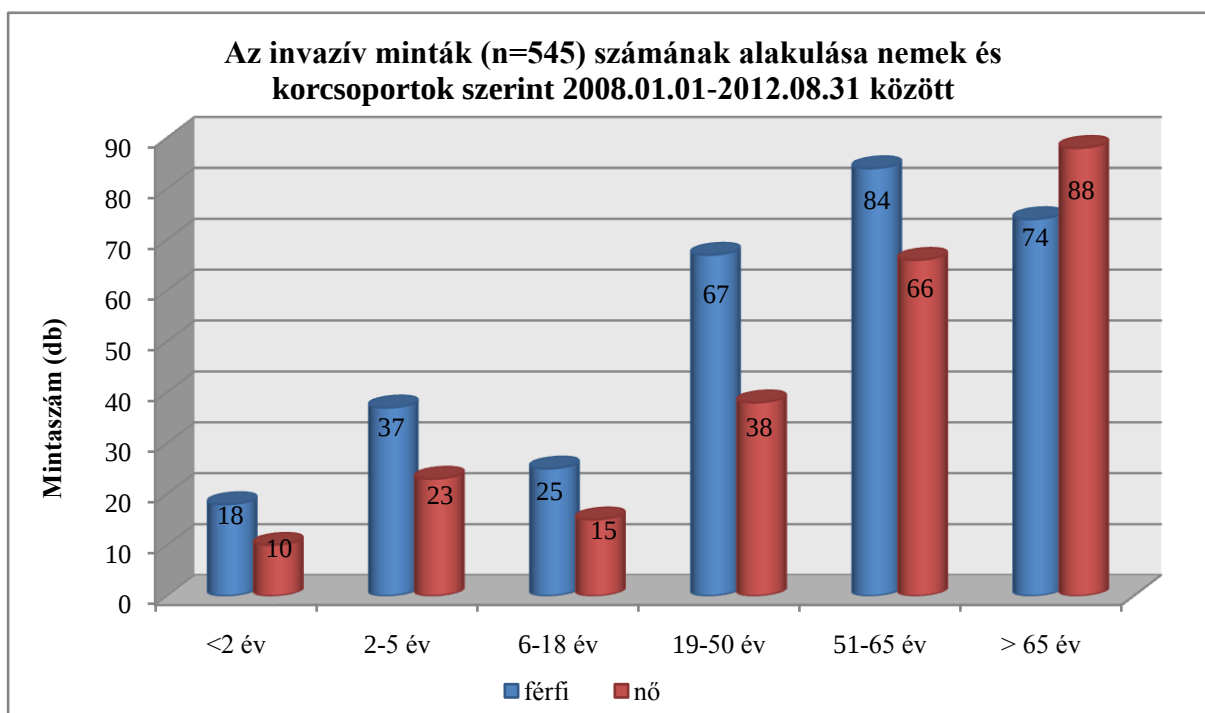
Ha az egyes években beküldött invazív minták számát nézzük, megállapíthatjuk, hogy a 2 év alatti korcsoportból a vizsgált időszak alatt kevés anyag érkezett be

vizsgálatra. A minták döntő többsége az 50 év feletti korcsoportokból származott (3. ábra).

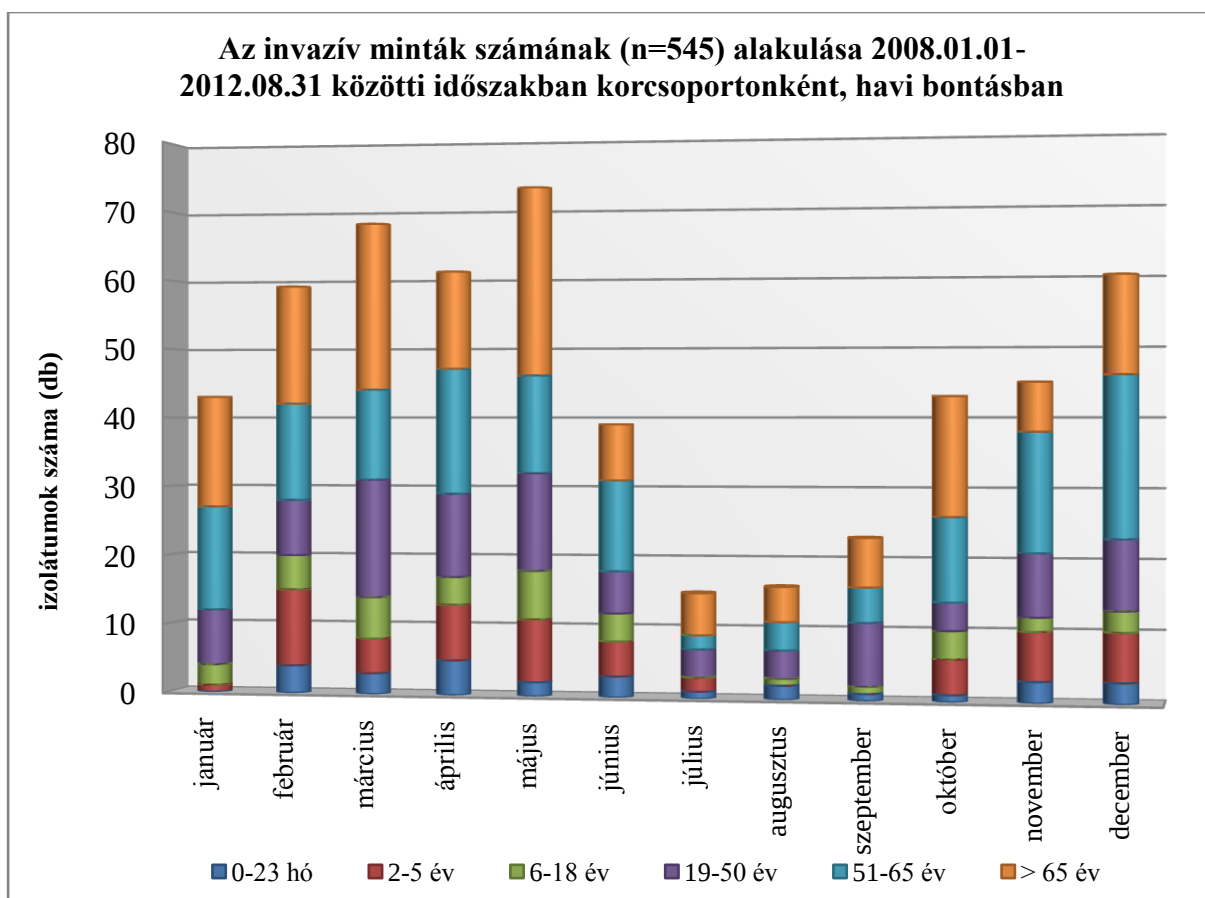


3. ábra

Ha a nemek szerint vizsgáljuk a beküldött anyagokat, akkor azt állapíthatjuk meg, hogy nincsenek lényeges különbségek a nemek között, de a 65 év feletti korcsoport kivételével a férfiak nagyobb számban képviseltetik magukat, mint a nők. (4. ábra)



4. ábra



5. ábra

A pneumococcus okozta invazív megbetegedésekből származó törzsek izolálási időpontjai követik a betegségek szezonálisát jellemző görbét. Általában a nyári hónapokban csökken a megbetegedések száma, ezáltal az izolált *S. pneumoniae* törzsek mennyisége is lecsökken, míg az ősztől tavaszig tartó időszakban fokozatosan emelkedik az esetek száma és március környékén éri el csúcspontját. (5. ábra)

Módszerek

1. A szerotipizálást ún. Quellung (tokduzzadási) reakcióval, a Statens Serum Institut pneumococcus antisavóival végezzük a cég által javasolt protokoll szerint.
2. Az antibiotikumok minimális gátló koncentrációját (MIC) gradiens diffúziós eljárással határoztuk meg. Az értékelést a Clinical and Laboratory Standards Institute (2008-2011 évi) és az EUCAST (2012-től) mindenkor érvényben levő ajánlásai szerint végeztük.

Szerotipizálási eredmények

A) Invazív minták

Az előző években folyamatosan mutattuk be a szerotípusok évenkénti változását a vakcina - szerotípusok oldaláról nézve. Kevesebb szó esett azokról a szerotípusokról, amelyek nem tartoznak a vakcinák szerotípusai közé, de számuk folyamatosan nő, ezáltal csökkentve az oltóanyagok hatékonyságát.

Magyarországon a pneumococcus elleni védőoltást a „Prevenar” oltóanyaggal 2005. év októberében vezette be az egészségügyi kormányzat 2008. év októberétől a két évnél fiatalabb kisgyermek részére ingyenessé tette a védőoltást. 2010 májusától a „Prevenar” gyári nevű készítmény folyamatosan lecserélésre került a „Prevenar 13” nevű készítményre.

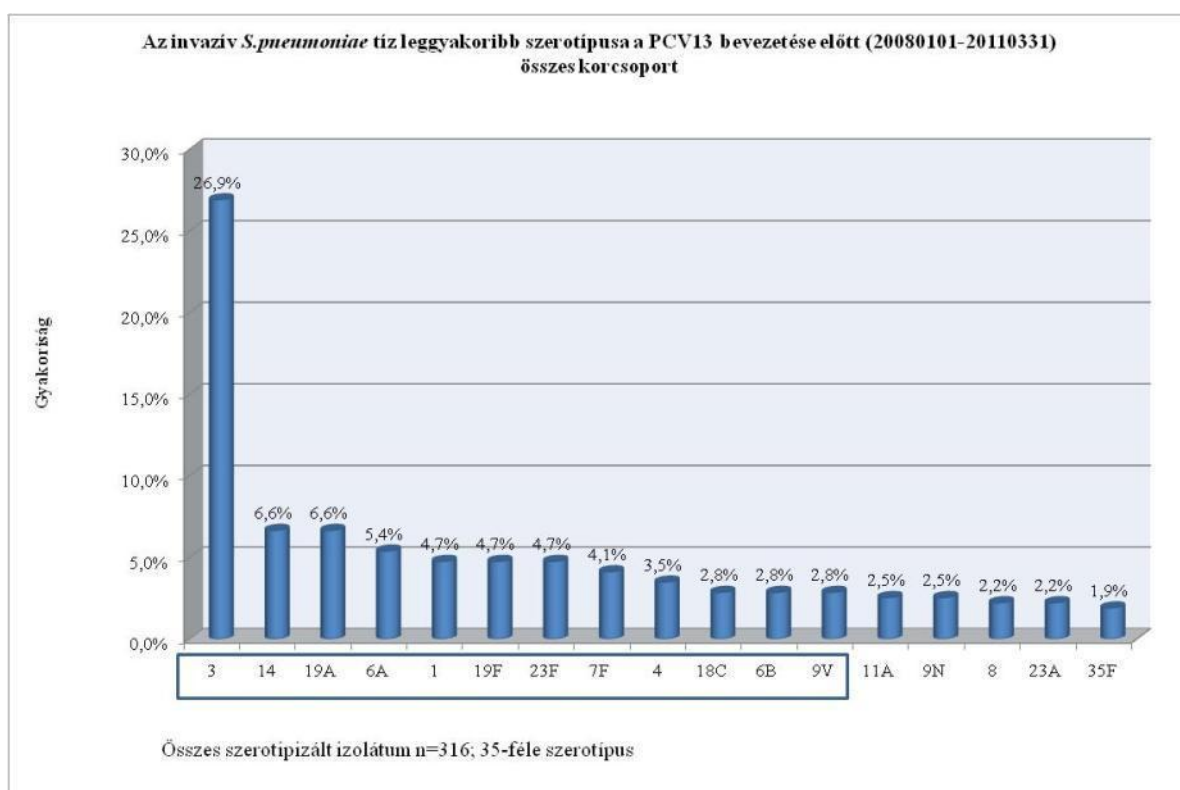
Korábban megjelent összefoglalóinkban (Mikrobiológiai Körlevél 2009. év IX. évf. 3. szám; 2011. év XI. évf. 1. szám) a „Prevenar” oltóanyag bevezetése utáni szerotípus változásokat elemeztük. Akkor jeleztük, hogy eredményeink összehasonlításra csak az 5 éven aluli korcsoportban van lehetőségünk egy korábbi, 2002-2004. év között, a „Prevenar” bevezetése előtt lezajlott szerotípus felmérés eredményei alapján.

Jelenleg az IPD surveillance keretén belül a szerotípusok változásának folyamatos nyomon követése lehetővé teszi, hogy ma már pontosabb adatokat tudunk közölni, mivel az oltóanyagok váltásakor már valamennyi korcsoportban rendelkezünk összehasonlítható adatokkal. Lehetővé vált a „Prevenar 13” előtti és utáni időszak összehasonlítása. (A statisztikai feldolgozás során a PCV 13

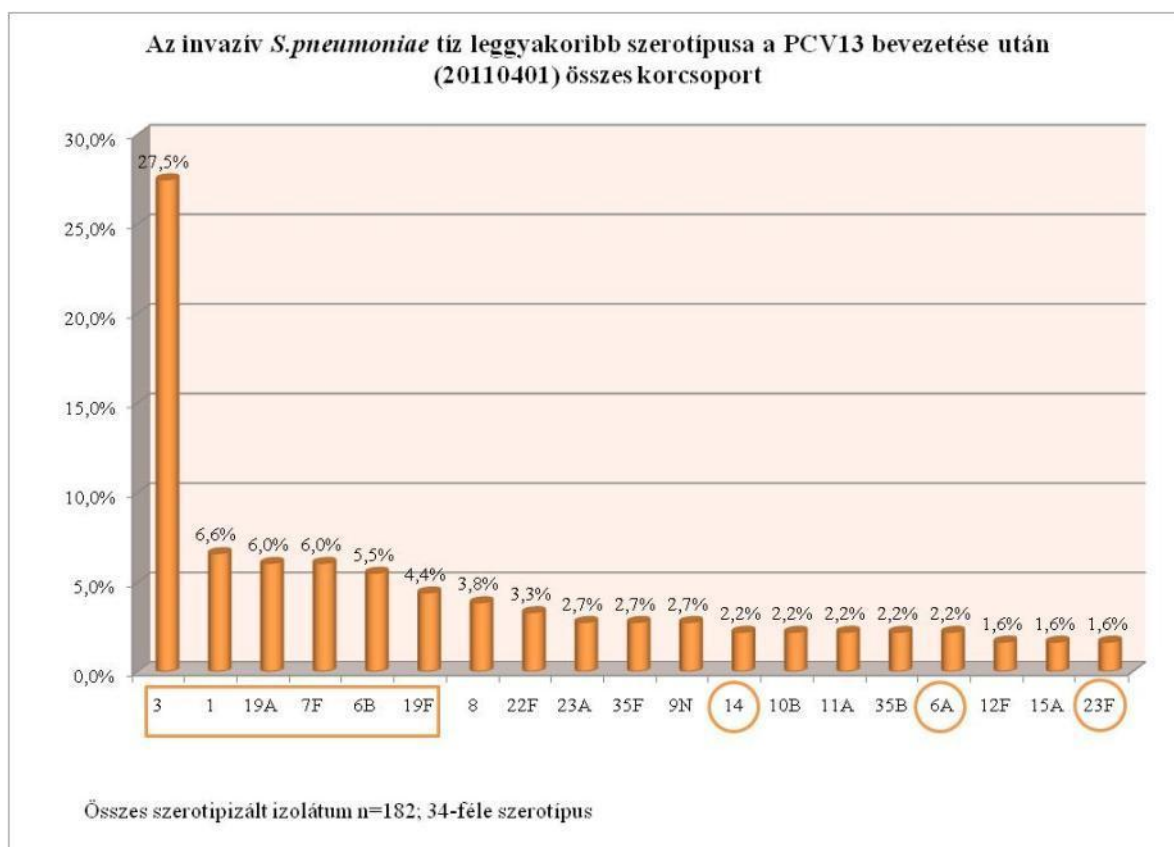
előtti időszakot 2008-tól 2011.03.31-ig, a bevezetés utáni időszakot 2011.04.01-től számítottuk).

Valamennyi korcsoportot figyelembe véve a „*Prevenar 13*” bevezetése előtti időszak leggyakrabban előforduló szerotípusai közül az első 10 helyen a 35-féle szerotípusból 17 osztozott (többféle szerotípus azonos gyakorisággal fordult elő). A leggyakoribb szerotípus a 3-as (26,9%). A vakcina szerotípusok közül egyedül az 5-ös szerotípus esett kívül a tízes listán. A szerotipizált törzsek 79,5%-a tartozott a vakcina - szerotípusok közé. A „top10” 17 szerotípusból mindössze 5 volt nem –vakcina szerotípus (6. ábra). A 6., 7. és 8. ábrán a vakcina szerotípusokat bekeretezve jelöltük.

A *Prevenar 13* bevezetését követően a „top 10”-es listán a vakcina szerotípusok már csak 62%-ot tettek ki. A listában a 34-féle szerotípusból 19 található, melyek közül a 3-as fordul elő a leggyakrabban (27,5%). A „top 10”-en kívülre került a 4, 5 és a 9V. A 19 szerotípusból 10 nem – vakcina szerotípus. (7. ábra)

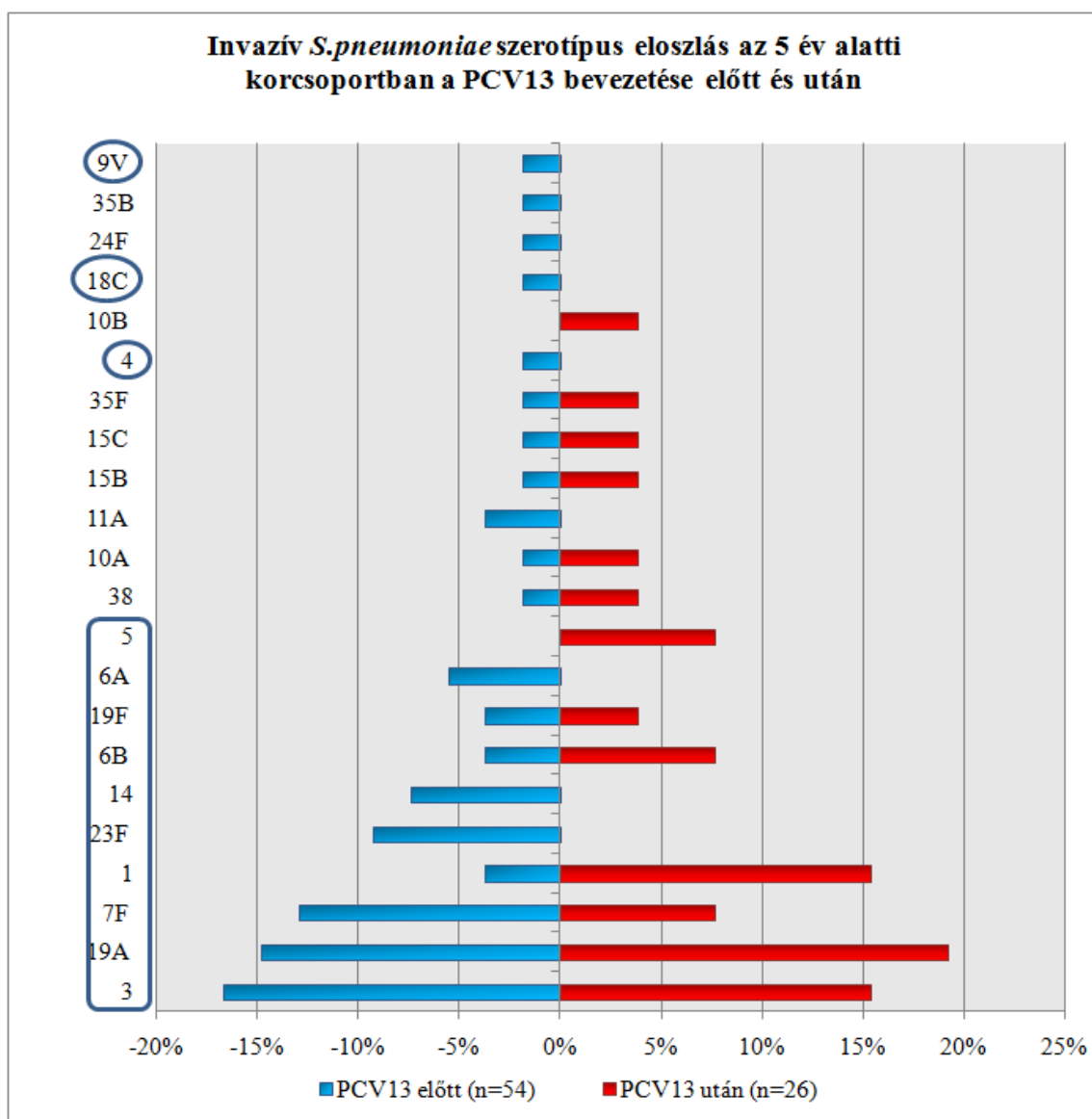


6. ábra



7. ábra

Az 5 év alatti korcsoporton belül a szerotípus megoszlás változása a két periódust összehasonlítva szembevetendő. (8. ábra) A PCV 13 bevezetése előtti időszakban a 3-as (15,7%), 19A (14,8%), 7F (13%) voltak a leggyakoribb szerotípusok. A 20-féle azonosított szerotípusból 8 (16,7%) nem-vakcina szerotípus volt. A PCV 13 bevezetése utáni időszak eredményei alapján a leggyakoribb szerotípusoknak a 19A (19,2%), 3 és 1 (15,4% - 15,4%) bizonyult. Ebben az időszakban az eddigi eredmények alapján 13-féle szerotípust azonosítottunk, melyből 6 (23,1%) volt nem-vakcina típus. Ami szembevetendő ebben a korcsoportban, hogy míg a PCV 13 előtti időszakban az 5-ös szerotípus kivételével valamennyi előfordult a vizsgált mintákban, a PCV 13 utáni periódusban a vakcina szerotípusok közül 6 (4, 6A, 9V, 14, 18C és 23F) teljesen eltűnt.



8. ábra

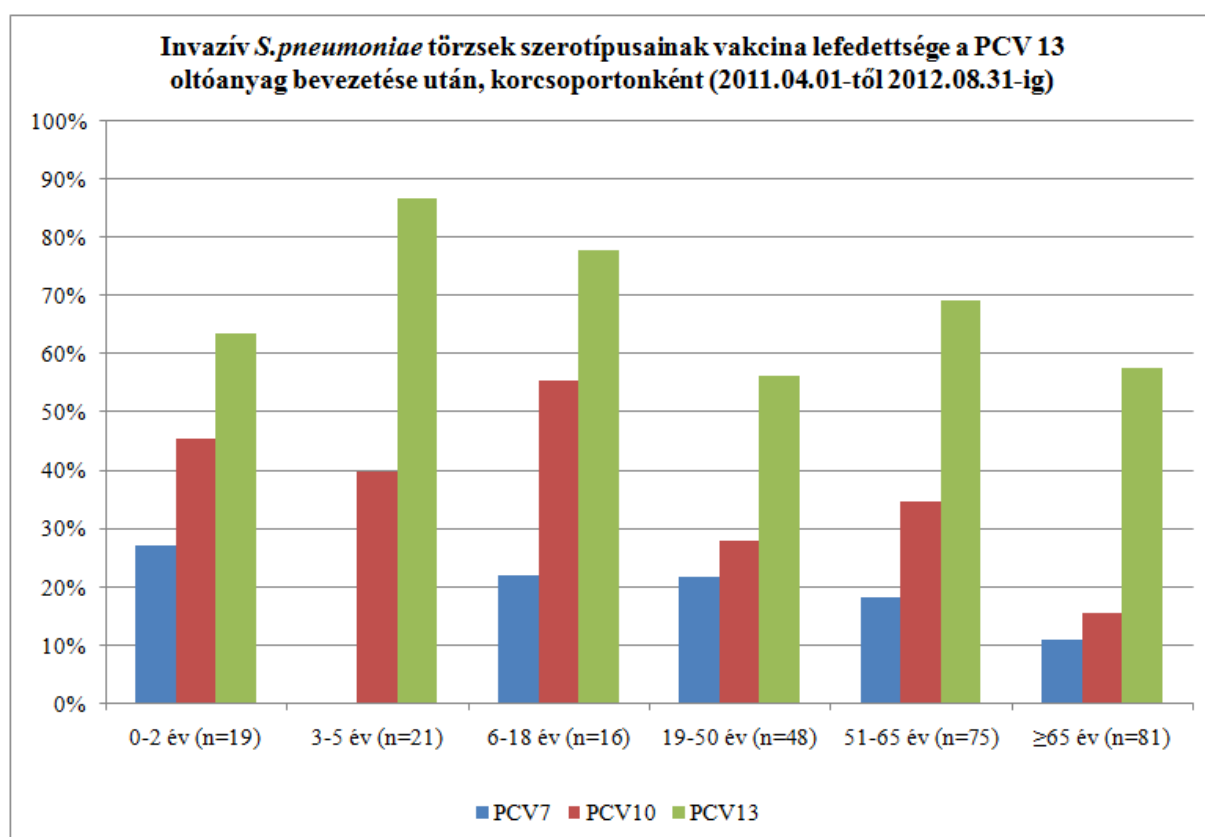
Az IPD surveillance keretében elsődleges célunk, hogy valamennyi korcsoportból, így az 5 év alattiakból is az összes, invazív fertőzésből izolált *S. pneumoniae* szerotípusa meghatározásra kerüljön. A 2008 - 2012 közötti időszakban beküldött 80 izolátum biztatónak mondható annak ismeretében, hogy a Nemzeti Bakteriális Surveillance adatai szerint - amelybe jelenleg 31 laboratórium küldi adatait -, 2010 - és 2012 első feléve között 5 év alatti korcsoportban liquorból és vérből összesen 38 *S. pneumoniae* törzset izoláltak (tisztított adat).

Az oltóanyagok hatékonyságát a vakcina - szerotípusok számának/gyakoriságának a változásával követhetjük nyomon. Az invazív fertőzésekből izolált *S. pneumoniae* -k vakcina – szerotípusainak változását a 2. táblázat segítségével követhetjük nyomon a vizsgált időszakban.

2. táblázat Invazív *S.pneumoniae* szerotípusok vakcina lefedettsége, évenkénti bontásban, 2008.01.01-2012.08.31.

	2008 (n=47)	2009 (n=105)	2010 (n=111)	2011 (n=110)	2012 (n=116)
PCV7	53%	33%	22%	15%	14%
PCV10	62%	44%	29%	28%	28%
PCV13	79%	80%	78%	70%	64%

A 9. ábra grafikonjai korcsoportonként mutatják a PCV 13 vakcina bevezetése utáni időszak szerotípus összetételének változását.



9. ábra

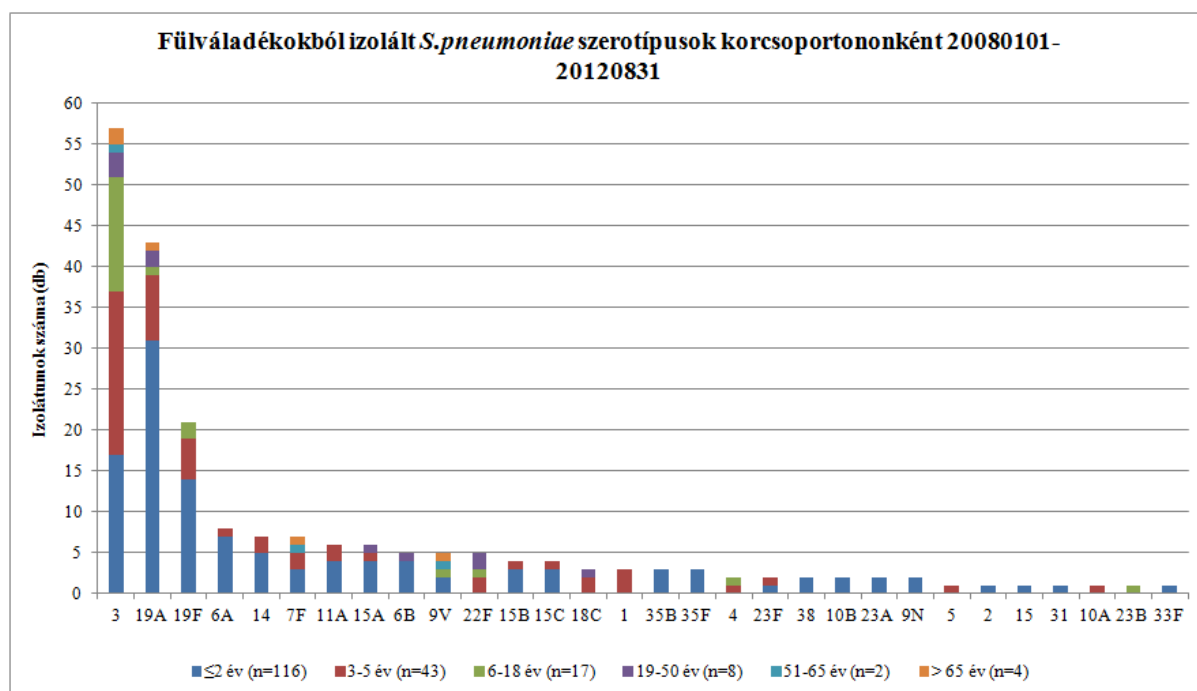
A %-os érték alapján megbecsülhető, hogy az adott csoportban milyen az egyes oltóanyagok hatékonysága.

Az adatok láttán jogosan merül fel az a kérdés, mennyire tekinthetjük ezeket az adatokat reprezentatívnak az egyes korcsoportokban tapasztalható alacsony mintaszám miatt. Erre egyik válasz, a már említett ok, az NBS adataiban sem szerepel több. Másrészt „küldött anyagból” dolgozunk. A jobb, pontosabb és valóban reprezentatívnak mondható adatok érdekében el kellene érünk, hogy a klinikusok vegyenek mintákat bakteriológiai tenyésztésre, és még inkább, hogy

a laboratóriumok a kitenyészett *S. pneumoniae* törzseket a fentebb említett körlevélnek megfelelően küldjék be az OEK Bakteriológia I. osztályára szerotipizálásra!

B) Fül váladékok

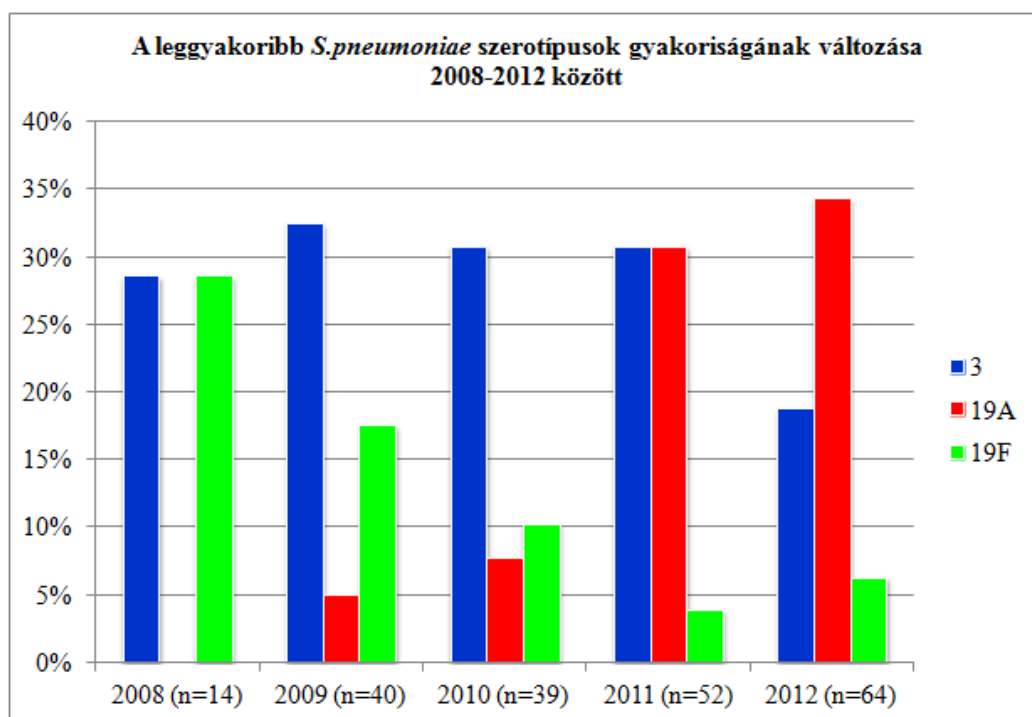
A fülvadás minták 81% -a az ≤ 5 év korosztályból származott. A leggyakoribb szerotípusok a vizsgált időszakban a 3-as, 19A és a 19F voltak. (10. ábra)



10. ábra

Ha a leggyakoribb szerotípusok (3, 19A, 19F) gyakoriságának változásait nézzük az évek során, azt tapasztalhatjuk, hogy a 3-as szerotípus 2008-tól 2011-ig gyakorlatilag azonos gyakorisággal (~ 30%) fordult elő. A 19F fokozatosan veszített teret a kezdeti 30%-ról gyakorisága 6% körüli értékre csökkent. Ezzel szemben a 19A, mely még 2008-ban a színen sem volt, 2012-ben meghaladta a 3-as szerotípus korábbi gyakoriságát (2012-ben 34%!), ugyanakkor a 3-as szerotípus előfordulása jelentősen csökkent (2012-ben 19%). (11. ábra)

Ez azért is figyelemre méltó, mert a PCV 13 bevezetését követően az ≤ 5 év korcsoportban az invazív mintákból származó *S. pneumoniae* szerotípusok közül szintén a 19A vált a leggyakoribbá (lásd 8. ábra).



11. ábra

A PCV 13 ajánlásában a középfülgyulladás megelőzése is szerepel. A oltások következményeként tapasztalhattuk a vakcina - szerotípusok csökkenését az invazív fertőzések esetében. Hasonló tendencia mutatkozik a középfülből izolált pneumococcusok esetében is. Az oltóanyagok hatékonysága, az általuk lefedett szerotípusok számának csökkenése figyelhető meg. (3. táblázat)

3. táblázat Középfülből izolált *S. pneumoniae* szerotípusok vakcina lefedettsége

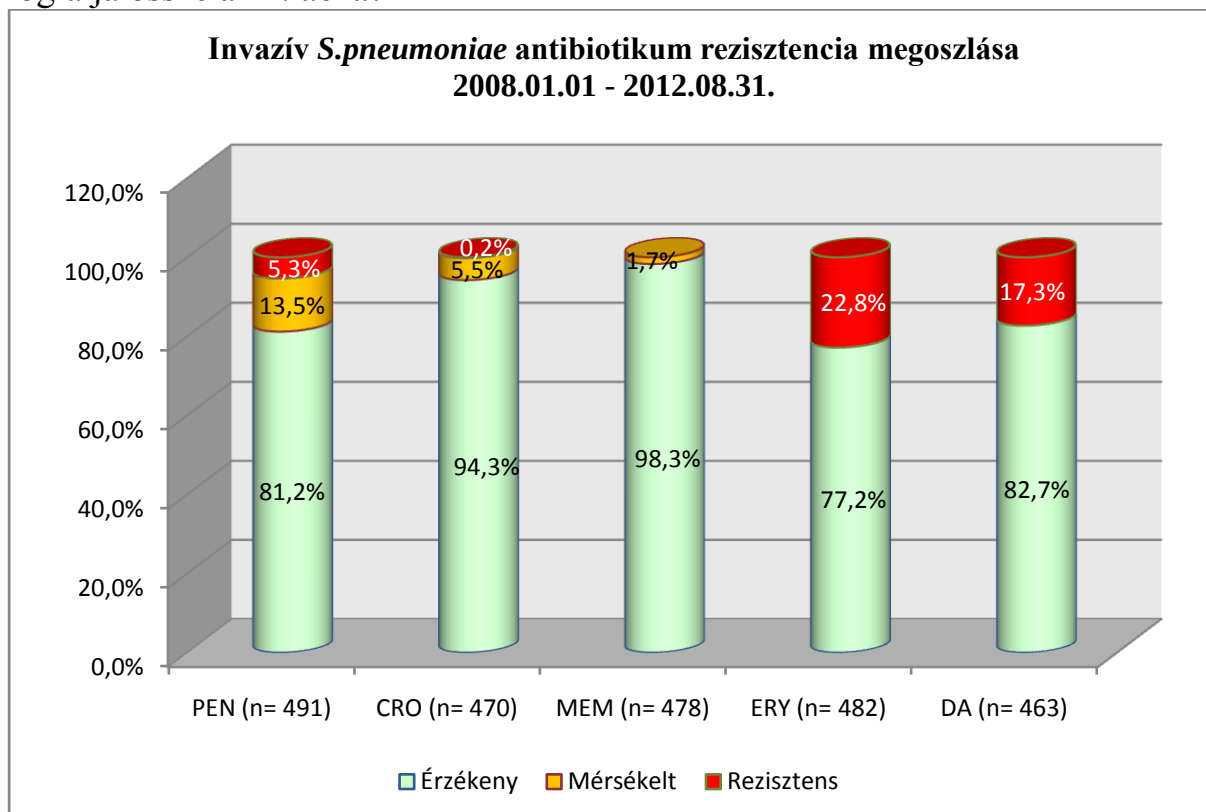
	2008 (n=14)	2009 (n=40)	2010 (n=39)	2011 (n=52)	2012 (n=64)
PCV 7	50%	33%	36%	10%	9%
PCV10	50%	45%	38%	12%	16%
PCV13	86%	83%	82%	79%	72%

Antibiotikum érzékenység

A 1970-es években írták le a penicillin rezisztens pneumococcus törzsek megjelenését Dél-Afrikában és Spanyolországban. A 1990-es évek elejére, a penicillin-rezisztens *S. pneumoniae* klónok gyorsan elterjedtek egész Európában és világszerte. A terápiában jelentős szerepet kaptak a makrolidok, ezt követően jelentősen megemelkedett a makrolidokkal és egyéb antibiotikumokkal szembeni rezisztencia is. A 1990-s években hat nemzetközileg elterjedt klónba (6A, 6B, 9V, 14, 19F, 23F) tartoztak ezek a törzsek. Az irodalmi adatok szerint a PCV7 konjugált vakcina bevezetésével tapasztalható volt az invazív

pneumococcus betegségek számának csökkenése a gyermekek és a felnőttek körében is. Ezzel egyidejűleg a fentebb említett szerotípusokba tartozó rezisztens izolátumok száma is csökkent.

A szerotípus meghatározásra beérkezett törzsek antibiotikum érzékenységét penicillin (PEN), ceftriaxon (CRO), clindamycin (DA), erythromycin (ERY) és meropenem (MEM) antibiotikumokkal szemben vizsgáltuk. Eredményeinket foglalja össze a 12. ábra.



12. ábra

Az invazív fertőzésekből származó pneumococcus izolátumok 5,3%-a (n= 26) bizonyult penicillinnel szemben rezisztensnek.

A penicillin rezisztensek közül

- 20 (76,9%) erythromycinnel, (35F, 9N, 1, 19A, 6B, 14, 23A, 19F, 6A, 18C)
- 14 (53,8%) erythromycinnel és clindamycinnel, (35F, 9N, 1, 19A, 6B, 14, 23A, 19F, 6A)
- 1 (3,8%) erythromycinnel, clindamycinnel és ceftriaxonnal (19A) szemben is rezisztens volt.

Az egyes szerotípusok antibiotikumokkal szembeni rezisztencia megoszlását a 4. táblázat foglalja össze. (Min.10 minta)

4. táblázat

Invazív *S.pneumoniae* izolátumok antibiotikum rezisztencia megoszlása szerotípusok szerint (2008.01.01-2012.08.31) (PEN n= 491; CRO n= 470; MEM n= 478; ERY n= 482; DA n= 463)

	Penicillin		Ceftriaxon		Meropenem		Erythromycin		Clindamycin	
	n	R %	n	R %	n	R %	n	R %	n	R %
1	29	3,4%	29	0,0%	29	0,0%	29	6,9%	28	7,1%
3	133	0,8%	134	0,0%	131	0,0%	129	5,4%	127	6,3%
4	12	0,0%	9	0,0%	11	9,1%	12	25,0%	11	9,1%
8	14	7,1%	14	0,0%	14	0,0%	14	7,1%	12	8,3%
14	24	4,2%	21	0,0%	23	4,3%	24	54,2%	22	31,8%
11A	11	0,0%	11	0,0%	11	0,0%	10	10,0%	11	0,0%
19A	32	12,5%	29	3,4%	31	3,2%	32	62,5%	31	54,8%
19F	22	22,7%	22	0,0%	22	0,0%	23	52,2%	18	38,9%
23A	11	9,1%	9	0,0%	9	0,0%	10	30,0%	9	22,2%
23F	18	11,1%	17	0,0%	18	0,0%	18	38,9%	18	27,8%
35F	11	9,1%	11	0,0%	10	0,0%	11	18,2%	10	10,0%
6A	20	10,0%	20	0,0%	20	0,0%	20	50,0%	20	35,0%
6B	20	20,0%	19	0,0%	20	5,0%	20	70,0%	19	63,2%
7F	26	0,0%	25	0,0%	24	0,0%	25	4,0%	24	0,0%
9N	11	9,1%	11	0,0%	11	0,0%	10	10,0%	10	10,0%
9V	11	0,0%	10	0,0%	10	20,0%	11	18,2%	9	11,1%

SZIFILISZ SZERODIAGNOSZTIKA – HAGYOMÁNYOS ÉS ÚJ VIZSGÁLÓMÓDSZEREINK HELYE A NEMZETKÖZI GYAKORLAT ALAPJÁN*

VÁRKONYI VIKTÓRIA DR.¹, BALLA ESZTER DR.²

Körúti Orvosi Centrum¹, Budapest

Országos Epidemiológiai Központ, II. Bakteriológiai Osztály², Budapest

ÖSSZEFOGLALÁS

A szifilisz igen változatos klinikai tünetekben nyilvánulhat meg, épp ezért a laboratóriumi vizsgálati módszereknek, főként a szerológiai eredményeknek jelentős diagnózisformáló szerep jut. A szerzők a nemzetközi guideline-ok, közlemények és a szexuális úton terjedő infekciókra vonatkozó, hazai módszertani levél (Bőr- és Nemibetegségek Szakmai Kollégiuma, 2002) alapján foglalják össze a szifilisz szerodiagnosztika aktuális lehetőségeit és buktatóit. Értékelik a régi és a közelmúltban elterjedt laboratóriumi vizsgálatok szerepét az egyes klinikai stádiumokban. A szifilisz szerológia szövevényes világában fogódzót nyújt, ha pontosan ismerjük, mit várhatunk el a szűrő - illetve a verifikáló tesztektől; hol a helye a kvalitatív, illetve a kvantitatív vizsgálatoknak, és milyen gyakorlati szabályokat célszerű követnünk a helyes diagnózis érdekében.

Az epidemiológiai adatok ismeretében egyelőre nincs jele annak, hogy a szifilisz, mint kórkép a közeljövőben veszítene a jelentőségéből, épp ezért sürgető lenne a korábbi, hazai módszertani ajánlás laboratóriumi diagnosztikai vonatkozásainak aktualizálása.

BEVEZETŐ

A szifilisz diagnosztika laboratóriumi tesztjei a szerológiai vizsgálómódszerek szinte teljes tárházát felölelik, és valamennyi kínálkozó lehetőséget kiaknázzák. Mindez többek között abból fakad, hogy ezen a területen az elmúlt száz évben, az 1906-ban bevezetett Wasserman-teszttel kezdődően átfogó fejlesztés és próbálkozás zajlott és zajlik annak érdekében, hogy minél tökéletesebb módszer lehessen a kezünkben. E sokféle technika bevezetése dacára mind a mai napig nem sikerült egyetlen optimális szerológiai módszerhez kötni a diagnózis kritériumait. A diagnózis felállításában fontos szerepet játszik ugyanis az adott beteg kórelőzménye (szexuális anamnézis, akcidentális antibiotikum alkalmazása), vannak-e, voltak-e klinikai tünetei, a beteghez kapcsolható

járványügyi adatok (fertőzőforrások). Mindezek ismeretében a szerológiai diagnosztika a maga teljes spektrumával segíti a klinikust a diagnózis felállításában és/ vagy kizárásában. A szifilisz definitív diagnózisa tehát minden egyes betegnél a venerológustól igen nagy körültekintést igényel.

IMMUNVÁLASZ, ÉS DIAGNOSZTIKUS TESZTEK - ELMÉLETI HÁTTÉR

A szifilisz betegnél számtalan antigén ellen alakul ki szisztémás immunválasz, így **aspecifikus** (lipid-ellenes) antitestek és **specifikus** (anti-treponema) antitestek termelődésére egyaránt számíthatunk. Jól ismert tény, hogy ennek megfelelően az immunválaszra épülő szerológiai tesztek hagyományosan két fő csoportba sorolhatók:

1. **aspecifikus**, ún. reagin-típusú tesztek, vagy lipid próbák, melyek modern flokkulációs válfajai (RPR, VDRL, MPR, ART, USR, TRUST) a korábbi komplementkötési tesztekben (Wassermann, Kolmer) használt szervkivonatokkal ellentétben kardiolipin-koleszterol-lecitin-antigéneket alkalmaznak, valamint
2. **specifikus**, ún. treponema-tesztek, melyek a patogén *Treponema pallidum* (Nichols törzs)-antigénekkal szembeni reaktivitást detektálják (TPHA, TPPA, FTA, FTA-Abs, ELISA, Western blot).

Fontos hangsúlyozni, hogy az **első** detektálható változás a beteg szérumában a fertőzést követő **2. hét vége felé** a *specifikus anti-treponema IgM* megjelenése, (majd mintegy két héttel később, a fertőzéstől számított 4. hét körül, a *specifikus anti-treponema IgG-szint* emelkedése), tehát előfordulhat, hogy még a tünetmentes lappangási szakaszban juthatunk **korai diagnózishoz**. Csak ezt követően, **az expozíciótól számított 6. héten** várható az *aspecifikus, antifoszfolipid, heterofil ellenanyagok (IgM, ill. IgG) szintjének emelkedése*, melyek termelődését a károsodott humán szövetekből, valamint a patogén spirochaeták sejtfalából felszabaduló lipidek, lipoprotein-szerű anyagok váltják ki (1, 2, 3, 4).

Kezeletlen betegnél a specifikus IgM szintje az infekciótól számított hat-nyolc hét múlva csökkenni kezd, majd mintegy fél év alatt lecseng, de előfordul, hogy évekig-évtizedekig alacsony szinten perzisztál. A specifikus IgG egy-két évig tovább emelkedik, és magas szinten tartósan, akár évtizedekig is kimutatható marad. Az aspecifikus tesztek a betegség késői szakaszában, a terciér szifilisz

betegek közel egynegyedénél már negatívvá válnak, tehát a nem fertőző stádiumokban jelentősen visszaesik az érzékenységük.

Kezelt betegeknél a terápia eredményességének szerológiai indikátora a foszfolipid-ellenes antitestek szintjének markáns csökkenése. A terápiát követő első évben a kvantitatív tesztekkel kapott négyszeres titercsökkenés (két hígítási egység) jelent szignifikáns változást. Mivel ez indirekt módon az infekció aktivitására utal, a *reinfekciókra* épp az *ellentétes irányú, növekvő titerek hívhatják fel a figyelmet*. Megtévesztő lehet, hogy az aspecifikus ellenanyagszintek a kezelt betegek mintegy 15%-ánál nem csökkennek az elvárt értékre, sőt, egyeseknél alacsony szinten akár élethosszan is perzisztálhatnak (szerorezisztencia jelensége).

A specifikus IgG a kezelték 85%-ánál tartósan, akár élethosszig is detektálható szinten marad, ez tehát a kezeléstől független „*szerológiai bélyeg*”-ként jelezheti az átvészeltséget, míg a kezelték mintegy 15%-a szeronegatívvá válik (4, 5).

DIAGNOSZTIKUS TESZTEK - GYAKORLATI MEGFONTOLÁSOK

1.) Lipoid típusú tesztek

ELŐNYÖK:

A lipoid típusú, aspecifikus tesztek közül **szűrőmódszerként** az **RPR (pl. Omega, Randox)** és a **VDRL (pl. Omega, Randox)** alkalmazása terjedt el leginkább, melyekkel nagy mennyiségű vizsgálati anyagon olcsón, egyszerűen és gyorsan lehet eredményhez jutni. E makroszkóposan, ill. mikroszkóposan értékelhető flokkulációs tesztek óriási előnye a **kvantitálhatóság**, ami számszerűleg, **titerben** is kifejezi a betegsérum hígítási során észlelt reaktivitás határértékét. Az RPR és VDRL egymással közel azonos értékű tesztek, bár titerértékeik nem felelnek meg egymásnak, sőt, a különféle gyártók által forgalmazott RPR tesztek sem helyettesíthetők egymással titer nyomkövetés céljából. **Liquorvizsgálat** céljára magas érzékenysége folytán a VDRL-teszt számít standard eljárásnak (4).

A csapadékos reakciók értékelésének szubjektivitása is arra hívja fel a figyelmet, hogy **egy adott beteg mintáinak sorozatos kvantitatív vizsgálatát egyazon laboratórium egyazon típusú testtjével ajánlatos elvégezni**. Mindez természetesen a **kvalitatív tesztekre** is érvényes megállapítás.

E tesztek vonatkozásában, melyek szűrővizsgálatként széles körben elterjedtek, épp a potenciális ellenanyagszint-változás kimutatása érdekében **mindig titrál**

kell a pozitív eredményt adó szérummintákat! A kvalitatív teszt pozitív eredménye önmagában nem elegendő, mivel az ismételt vizsgálatok során nem képezhet viszonyítási alapot. Ugyancsak nem fogadható el, ha a nontreponemális teszt pozitivitás erősségét keresztekkel jelölik (egyőtől négyig).

KORLÁTOK:

Az alkalmazott antigén nem specifikus a *T. pallidum*-ra, épp ezért ezek a módszerek sem specifikusak szifiliszre. Az immunválasz már vázolt sajátosságaiból fakad e tesztek korlátozott érzékenysége, azaz, hogy a szifilisz korai, illetve késői stádiumait nem képesek jelezni. Épp ellenkező a magyarázata a *prozóna* jelenségnek, amikor a korai tünetmentes szeropozitív (másodlagos tünetek megjelenése előtti időszakban) vagy a szekunder szifiliszben betegekben alkalmanként (1-2%-ban) olyan kiugró ellenanyag-szint észlelhető, ami hígítatlan mintáknál álnegatívvá teszi a csapadékos antigén-antitest reakciót. A jelenségre atípusos, durva/szemcsés rögzéződés vagy gyenge reaktivitás hívhatja fel a figyelmet. Ilyenkor célszerű **1:16-os hígításból** kiindulva folytatni a kvantitatív vizsgálatot és elvégezni az aktuális titer-meghatározást, mivel a töményebb szérummintákkal ellentétben ez a hígítási fok a legtöbbször már elegendő a makroszkóposan detektálható, optimális antigén-antitest arány kialakulásához. Irodalmi adatok szerint HIV-fertőzöttek és terhesek körében gyakoribb ez a jelenség (1,6), azonban koinfekció és graviditás nélkül is megfigyelhető.

A különféle keresztreakciók következtében a becslések szerint a populáció mintegy 1%-ánál észlelhetünk álpozitív reakciókat. Az álpozitivitás az esetek döntő többségében **1:8-nál** alacsonyabb hígításban észlelt pozitivitást takar, melyet a specifikus tesztek nem erősítenek meg. A **Biológiai Aspecifikus Pozitivitás (BAP)** okai között bizonyos élettani változások (terhesség, idős kor), fertőző betegségek (mononucleosis, hepatitis, malária, tbc, treponematózisok stb.), daganatos megbetegedések, valamint az intravénás droghasználat, korábbi immunizációk a leggyakoribbak. Különösképp az autoimmun kórképek és a krónikus gyulladásos, kötőszöveti betegségek talaján észlelhetőek a hat hónapnál is hosszabb ideig perzisztáló álpozitív reakciók (1).

2.) Specifikus tesztek

ELŐNYÖK:

A treponema-antigént alkalmazó specifikus tesztek közül jelenleg a TPHA, TPPA, valamint az ELISA és a Western blot használata van terjedőben. Az ELISA és a Western blot technikák előnye, hogy az IgG mellett a specifikus IgM kimutatására is alkalmasak (pl. EUROIMMUN ELISA/Western blot). Ez utóbbi módszerek tehát már az aspecifikus tesztek **megelőzően** felhívhatják a klinikus figyelmét a friss fertőzés tényére. Ennek megfelelően, ha a kezelt beteg korábbi negatív IgM-lelete pozitívvá válik, **reinfekcióra** kell gyanakodni. A szifilisz **késői stádiumában**, amikor az aspecifikus tesztek érzékenysége újfent alacsonnyá válik, a szerodiagnosztikában ismét a specifikus tesztekre helyeződik a hangsúly (7).

E tesztek értéke magas érzékenységükkel párosuló specificitásukban rejlik, ugyanis antigénként teljes sejtes *T. pallidum* lizátumot, rekombináns antigéneket vagy szintetikus peptideket alkalmaznak. Elsődlegesen **validálási** céllal javasolják használatukat Negatív eredményük (amennyiben immunszuppresszió nem áll fenn) arra utal, hogy a vizsgált személy **nem szenved friss/átvészelt *T. pallidum* fertőzésben**. Alacsony prevalenciájú populációban egyes specifikus tesztek **szűrésre** is alkalmazhatóak (pl. megfelelő érzékenységű ELISA).

KORLÁTOK:

Az immunfluoreszcens módszerek (FTA, FTA-Abs) és az élő treponemákat alkalmazó, klasszikus TPI tömeges vizsgálatra nem alkalmasak, speciális felszereltséget igényelnek és a számos metodikai hibaforrás lehetősége miatt a diagnosztikus gyakorlatból kiszorulva jelenleg inkább csak egyes referencia-laboratóriumokban érhetőek el.

A TPHA vizsgálatot szokványosan **1:80-as** hígítású szérumban értékeljük, és a pozitív eredményt erre a titerre vonatkoztatjuk. A **TPHA/TPPA kvantitatív**, csakúgy, mint az ELISA eredmények szérumpárokban történő összehasonlítása, **nem** alkalmazható rutin diagnosztikus célokra, mivel a specifikus ellenanyagszintek **nem** követik szorosan a szifilisz infekció aktivitását, azaz **sem a terápiás hatékonyság ellenőrzésére, sem a reinfekciók igazolására nem alkalmasak** (3).

A specifikus tesztek sem mentesek az **álpozitív** eredményektől, bár ezek jóval ritkábbak, mint az aspecifikus tesztek esetében. Leírták többek között autoimmun kórképekben, HIV fertőzésben, EBV infekcióban, terhességben (1). Az immunválaszt befolyásoló tényezők közül feltétlenül említést érdemel a HIV-fertőzés, ill. egyéb immundeficienciával jellemezhető kórképek,

melyekben a szifilisztesztek **álnegatív, ill. fluktuáló, késleltetett** eredményt adhatnak (4).

AZ EGYES STÁDIUMOK SZEROLÓGIAI SAJÁTOSSÁGAI

Primer szifilisz. A primer tünetek kifejlődésének idejére, többnyire már mérhetőek a specifikus markerek, míg a lipoid tesztek attól függően, hogy a beteg az elsődleges fekély kialakulását követően mennyi idővel fordul orvoshoz és kerül sor a szifilisz szerológiai vizsgálatra, 20-30%-ban negatívak. Ebben a fázisban az RPR/VDRL típusú tesztek érzékenysége átlagosan csak 78-86%, és a TPHA szenzitivitása is csak hasonló értékeket mutat. A TPHA-val szemben az Egyesült Királyságban elterjedt **TPPA** közel 95%-os érzékenysége révén megbízhatóbb eredményeket ad (7).

Ebben a korai fázisban az IgM detektálására képes, egyéb specifikus tesztek is ajánlhatóak, épp ezért, ha a kórokozó direkt kimutatása (sötétlátóteres mikroszkóp, PCR) negatív eredménnyel zárul, akkor ezen tesztek pozitivitása is fontos szerephez jut a diagnózis felállításában (**ELISA IgM, Western blot IgM**). A szerológiai tesztek klinikai gyanú hiányában 2-12 hét múlva érdemes megismételni, hogy biztosan ki lehessen zárni a szifilisz diagnózist.

Szekunder szifilisz. Szekunder szifiliszben már ugrásszerűen megemelkedik a specifikus és nem-specifikus ellenanyagok szintje, így a **lipoid típusú tesztek** érzékenysége is 100 százalékos lesz. Utóbbiaknál a titermeghatározás elengedhetetlenül fontos a terápia monitorozása szempontjából. A **TPHA/TPPA** tesztek, ill. az **ELISA** és a **Western blot** is jellemzően markáns pozitivitást mutatnak, utóbbiak a specifikus IgM mellett már a specifikus IgG magas szintjét is jelzik.

Látens szifilisz. Az infekció tünetmentes, csupán szeroreaktivitással jellemezhető szakasza. Magyarországon korai látens szifiliszről beszélünk, ha a betegnél a fertőződés 2 éven belül következett be, késői látenciáról, ha több mint két éve. A korai látens szakaszban a komplett (specifikus + nem-specifikus) szerológiai pozitívitas a jellemző; ugyanakkor a lipoid tesztek érzékenysége az idő előrehaladtával fokozatosan csökken. A késői tünetmentes szeropozitívitas, syphilis latens tarda eseteiben a fertőződés időpontjára vonatkozó anamnesztikus adatok hiányoznak és tulajdonképpen egy váratlan, treponemális teszt pozitívítással állunk szemben (8). Ha csak a specifikus tesztekkel kapunk pozitív eredményt, akkor verifikálásképp egy harmadik, ugyancsak specifikus tesztre is szükség lehet.

Tercier (késői) szifilisz. A szerodiagnózis főként a specifikus tesztek eredményén alapul, mivel a lipoid tesztek érzékenysége már csak mintegy 70%-ra tehető, míg a TPHA/TPPA tesztek megőrzik 97%-os érzékenységet.

Neuroszifilisz. Neurológiai szövődmények a szifilisz bármely stádiumában kialakulhatnak. Amennyiben a *szeropozitív betegnél a klinikai tünetek alapján felmerül a központi idegrendszer érintettsége is, úgy a liquor -VDRL vizsgálata a „gold standard” eljárás*, ami specifikus, de nem elég érzékeny módszer. A CDC (4) ajánlása szerint a reaktív VDRL liquor emelkedett fehérvérsejt számmal ($>5/\text{mm}^3$), valamint emelkedett liquor fehérjével ($>40\text{mg/dl}$) a neuroszifilisz diagnózisát támasztja alá. A FTA-Abs vizsgálat elvégzése javasolt lehet, mivel negativitása megbízhatóbban zárja ki a diagnózist. A PCR alapú direkt eljárások szerepe elsőrendű fontosságú a korai fertőző syphilisben észlelt központi idegrendszeri érintettség esetén.

Connatalis szifilisz. A teljes klinikai/radiológiai kivizsgálás mellett többféle laboratóriumi módszert célszerű igénybe venni. Szerológiai szempontból számos tényező bonyolítja a vizsgálatok értékelését (anyai ellenanyagok jelenléte a gyermek vérében, az anya komplett/inkomplett kezelése, a magzat éretlen immunrendszere stb.). Párhuzamosan kell beállítani az anya és a gyermek szérummintáit (köldökzsinórvér a kontaminálódás veszélye miatt nem alkalmas), és meg kell határozni az RPR/VDRL titert.

Az anyai IgG transzplacentáris átjutása miatt a lipoid tesztek nem fertőzött gyermekeknél is pozitivitást mutathatnak. Pozitív esetben azonban a gyermek mintájában **minimum négyszeresét** észleljük az anyai szérum titerértékének (5,6). A specifikus tesztekkel (ELISA, Western blot) IgM kimutatásra kell törekednünk, emellett a gyermek szöveteiből, testnedveiből (liquor, nasalis váladék stb) PCR alapú tesztekkel, vagy sötétlátóteres vizsgálattal a direkt kórokozó-kimutatást célszerű megkísérelni (7,8). A negatív IgM teszt önmagában azonban nem zárja ki a diagnózist!

A KEZELÉS HATÉKONYSÁGÁNAK SZEROLÓGIAI ÉRTÉKELÉSE

Szerzett, korai fertőző szifilisz. A terápia hatékonyságának megítélése a tünetek remissziója mellett az aspecifikus, **kvantitatív szerológiai vizsgálatok** (RPR/VDRL) meghatározott időközönként, (az első évben 3 havonta, a második évben 6 havonta) történő ismétlésén és az eredmények összehasonlító értékelésén alapul (5,12).

Sikeresnek mondható a terápia, ha az elsődleges szeropozitív (syphilis I szeropozitív) diagnózissal kezelt betegeknél egy éven belül, szekunder és korai

látens szifilisz betegekénél két éven belül a nem-treponemalis tesztek negatívvá válnak. Előfordulhat azonban, hogy a szakmai előírásoknak megfelelően alkalmazott penicillin-terápia ellenére sem válnak negatívvá a nem-specifikus tesztek, illetve titerük lényegében nem változik (perzisztálnak az aspecifikus ellenanyagok, szerorezisztencia állapota) (1,14,15).

Ha a kezelést követően 1 év múlva sem észlelünk értékelhető titercsökkenést, akkor a kezelést meg kell ismételni. A szerológiai rezisztenciát mutató eseteknél a szakmai előírásnak megfelelően a második év végén feltétlenül indokolt a neurológiai vizsgálat.

Ha az RPR/VDRL titer a gondozott betegekénél két hígítási egységgel vagy többel megemelkedik, azt minden esetben *reinfekcióként* kell értékelni. A hazai gyakorlatban a szifilisz miatt kezelt betegekénél a kezelés megkezdése előtt HIV preteszt tanácsadás is történik. Ezt követően a beteg beleegyezésével minden egyes vérvétel nem csak a szifilisz szerológiai kontroll, hanem egyúttal HIV szűrővizsgálat céljából is történik. Ennek köszönhetően számos esetben észleltünk HIV szerokonverziót a szifilisz miatt gondozott betegeinknél.

A terápiás kudarc a penicillin injekcióval kezeltéknél általában nem várható, jöllehet a szakirodalomban számos utalást találhatunk (16,17)

A specifikus tesztek (TPPA/TPHA, ELISA, WESTERN blot) az esetenként tartósan perzisztáló specifikus ellenanyagválaszt detektálják, épp ezért alkalmatlanok a fertőzés aktivitásának megítélésére. E tesztek kvantitatív kivitelezése felesleges, akár megtévesztő is lehet.

Connatalis szifilisz A megfelelően kezelt újszülöttek féléves korukra már nem mutatnak reaktivitást az aspecifikus tesztekkel. Emelkedő vagy stabil titerek esetén azonban újabb kivizsgálást/kezelést kell fontolóra venni. A specifikus treponema-tesztek a felnőttkori szifiliszhez hasonlóan a kisdedeknél sem alkalmasak a terápia monitorozására. Az anyai specifikus ellenanyagok 15 hónapos koron túl már nem mutathatóak ki a gyermekek szervezetéből, épp ezért 18 hónapos kortól a specifikus tesztek (legalább két különféle teszt!) pozitivitása congenitális szifiliszt igazol (4, 6)

LABORDIAGNOSZTIKAI AJÁNLÁSOK

A helyi járványügyi viszonyok, laboratóriumi/pénzügyi lehetőségek figyelembevételével a világ számos országában a szifilisz-surveillance terén különféle protokollok honosodtak meg.

Az ELISA tesztek megjelenése előtt Európában hagyományosan a TPHA vált a szűrés legelterjedtebb eszközévé, míg az Egyesült Államokban erre a célra elsődlegesen az RPR/VDRL tesztekét javasolták. A korábbi, WHO ajánlást követő **TPHA és RPR/VDRL alapú szűrést** az Egyesült Királyságban a laboratórium kapacitásától függően **IgG- és IgM-detektáló ELISA - vagy TPPA-alapú szűrés váltotta fel**. A magas szenzitivitású ELISA ugyanis megfelelő alternatívát nyújt, ráadásul az RPR/VDRL és TPHA módszerekkel szemben automatizálható és objektív értékelést tesz lehetővé (18,19).

A különféle módszertani ajánlások zöme megegyezik abban, hogy a szifiliszdiagnosztikában **különböző elven alapuló tesztek kombinációja** ajánlott (1,3,4,6,15,20). Ha ugyanis más elven működik a konfirmáló teszt, mint a szűrőteszt, akkor minimális az esélye az álpozitív eredmények egybeesésének. Ennek értelmében például pozitív ELISA szűrővizsgálati eredményeket Western blottal, ill. TPHA-val lehet megerősíteni, és fordítva, pozitív TPHA szűrővizsgálati eredményeket ELISA tesztel lehet verifikálni (19, 20). Verifikálás céljára jelenleg a **Western blot** az elérhető legspecifikusabb technika (21).

AZ EGYES TESZTEK ALKALMAZÁSÁNAK INDIKÁCIÓI

- Alacsony prevalenciájú populációban (ahol alacsony az átfertőzöttség mértéke, azaz a specifikus ellenanyagra pozitív egyének aránya) **specifikus tesztekkel célszerű szűrést végezni**, mely egyből meghatározza azok csoportját, akik életük során fertőzést estek át. Ezt követően az infekció aktivitásának megítéléséhez **kvantitatív lipoid teszteket** kell alkalmazni (3).
- Magas prevalenciájú populációban (prostituáltak, rabok, pornósztársak, promiszkus egyének, homoszexuális férfiak stb.) épp ellenkezőleg, a **szűrésre aspecifikus teszteket** javasolnak, és a pozitív eredményeket **specifikus módszerekkel kell megerősíteni** (3). A megfelelően kezelt egyének zöme így kiesik a vizsgálat köréből, ami egyszerűsíti a kezelésre szoruló betegek felkutatását. Negatív esetben viszont a már említett prozóna jelenség, valamint a HIV fertőzés esélyét is szem előtt kell tartani!
- Az alacsony prevalenciájú, ám epidemiológiai szempontból kiemelkedő jelentőségű csoportban (terhesek, vérédonorok) az **aspecifikus**

tesztekkel végzett szűrést ELISA, TPHA, Western blot módszerrel ajánlott kombinálni.

- Primer/szekunder stádiumú szifiliszre gyanús tünetekkel jelentkező betegek, szexuális kontaktusok szerológiai kivizsgálását az előbbi csoporthoz hasonlóan ajánlott végezni.
- Késői szifilisz diagnózisát a tünetmentes/tünetes (pl. pszichiátriai, neurológiai) betegeknél egyaránt **három teszt eredményére** kell alapozni. (Aspecifikus tesztekkel történő szűrés + két különféle, specifikus - pl. ELISA+ TPHA - teszttel történő verifikálás).

ÖSSZEFOGLALÁS

A betegség igen korai, szeronegatív szakaszát leszámítva, amikor a kórokozó közvetlen kimutatására kell törekednünk, a szerológia a szifilisz valamennyi klinikai stádiumában a diagnózis pilléréül szolgál és segíti a venerológus munkáját. Mindemellett fontos szerepet tölt be a terápiás hatékonyság kontrollálásában és a reinfekció lehetőségének megítélésében.

A fel nem ismert, kezeletlen szifilisz horizontális/vertikális terjedése súlyos következményekkel fenyeget; épp ezért komoly kötelessége és felelőssége a témában érintett klinikusoknak, hogy nyomon kövessék a laboratórium-nyújtotta diagnosztikus lehetőségek fejlődését és naprakészen, a **tünettannal, anamnézissel, járványügyi adatokkal összevetve** értelmezni, alkalmazni tudják a kapott eredményeket.

A laboratóriumokban alkalmazott teszteknel a szakmai szempontoknak kell prioritást élvezniük, azaz kiemelkedő minőségű, körkísérletekben validált, reprodukálható és megbízható eredményt adó szűrő- és verifikáló teszteket kell választani, (a CE jelzés önmagában ugyanis semmit nem árul el egy teszt gyakorlati értékéről). A jártassági körvizsgálatokban való folyamatos részvétel, és a minőségbiztosítási szabályok szem előtt tartása a szifilisz-szerológiával foglalkozó laboratóriumok számára is elengedhetetlen (22).

A Bőr- és Nemibetegségek Szakmai Kollégiuma által 2002-ben közreadott „Módszertani levél a szexuális úton terjedő infekciók kivizsgálásához és kezeléséhez” még nem tartalmazta az újabb szerodiagnosztikai módszerekre vonatkozó ajánlásokat (8). Mielőbb szükség lenne e témában a kiegészítések, módosítások, javaslatok megfogalmazására, valamint arra, hogy a szifilisz diagnosztikai eljárások hazai protokollja aktualizált formában újulhasson meg.

IRODALOM:

1. **Ratnam S:** The laboratory diagnosis of syphilis. Canadian STI Best Practice Laboratory Guidelines. Can J Infect Dis Med Microbiol 2005; **16**:45-51
2. **Larsen SA, Steiner BM, Rudolph AH:** Laboratory Diagnosis and Interpretation of Tests for Syphilis. Clin Microbiol Rev 1995; **8**:1-21.
3. **STI Diagnostic Group:** Guidelines for the laboratory diagnosis of syphilis in East-European countries. (Sexual and Reproductive Health (SRH) Network; 2007
4. **Nesteroff S.:** Serology: Syphilis. 2004 RCPA Serology QAP pp.1-14
5. **Centers for Disease Control and Prevention.** Sexually Transmitted Disease Treatment Guidelines, 2006; MMWR 55:RR-11
6. **Goh BT, van Voorst Vader P C:** European guideline for management of syphilis. Int J STD&IDS 2001; **1(Suppl 3)**: 14-26
7. **Talha E, Kemény B, Horváth I et al:** Syphilis PCR: T.pallidum molekuláris kimutatása szeronegatív esetekben. Bőrgyógy.Vener.Szle 2003;79:65-68
8. **Petrovay F, Balla E, Boross K:** Treponema pallidum nested PCR gyakorlati jelentősége a szifilisz-diagnosztikában. STD és Genitális Infektológia 2008;2: 167-169
9. **Romanowski B, Sutherland R, Fick GH et al.:** Serologic response to treatment of infectious syphilis. Ann Intern Med 1991;**114**:1005–9.
- 10.**Smith G, Holman RP:** The Prozone Phenomenon with Syphilis and HIV-1 Co-infection. South Med J 2004; **97**(4):379-382
- 11.**Lewis DA, Young H:** Syphilis. Sex Transm Inf 2006;**82**:13-15
- 12.**Bőr-és Nemibetegségek Szakmai Kollégiuma:** Módszertani levél a szexuális úton terjedő infekciók kivizsgálásához és kezeléséhez. 2002
- 13.**Luger A F., Schmidt B L , Kaulich M:** Significance of laboratory findings for the diagnosis of neurosyphilis Int J STD&AIDS 2000;11:224-234
- 14.**Rolfs RT, Joesoef MR, Hendershot EF et al:** A randomized trial of enhanced therapy for early syphilis in patients with and without human immunodeficiency virus infection: the Syphilis and HIV Study Group. N Engl J Med 1997;**337**:307–14.
- 15.**Hook EW 3rd, Marra CM:** Acquired syphilis in adults. N Engl J Med,1992;**326**:1060-9.
- 16.**Giles AJH, Lawrence AG:** Treatment failure with penicillin in early syphilis. Br.J Vener Dis 1979; 55: 62-64,

17. **Parkes R., Renton A., Meheus A, Laukamm-Josten U.:** Review of current evidence and comparison of guidelines for effective syphilis treatment in Europe. *Int J STD and SIDS* 2004;15:73-88
18. **World Health Organization.** Treponemal infections. Technical report series 674. Geneva: WHO, 1982.
19. **Egglesstone SI, Turner AJL:** Serological diagnosis of syphilis. *Commun Dis Public Health* 2000; 3:158-62
20. **Young H:** Guidelines for serological testing for syphilis. *Sex Transm Inf* 2000;76:403-405
21. **Backhouse JL, Nesteroff SI:** *Treponema pallidum* western blot: comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for syphilis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 39 (1): 9-14
22. **Müller I, Brade V, Hagedorn HJ et al:** Is Serological Testing a Reliable Tool in Laboratory Diagnosis of Syphilis? Meta-Analysis of Eight External Quality Control Surveys Performed by the German Infection Serology Proficiency Testing Program. *J Clin Microbiol* 2006; 44(4):1335-1431

A baktériumok rendszertana és azonosítása¹

Szabó Zsuzsa

Ez az áttekintés szorosan kötődik az 50 éves Törzsközpont történetét bemutató közleményhez (1), mivel bármely törzsgyűjtemény és tegyük hozzá, bármely mikrobiológiai laboratórium megfelelő működéséhez a rendszertan és a rendszertani azonosítás témakörének ismerete nélkülözhetetlen. A szövegben található, kiragadott példákból látható, hogy e közlemény elsősorban a klinikai laboratóriumokban felvetődő, kórokozó baktériumokkal kapcsolatos problémákat igyekszik kiemelni.

A rendszertan három alapvető része az osztályozás, a jellemzés és a nevezéktan (nomenklátúra). Ezek mindegyike dinamikus, állandóan fejlődő terület, amelyek szorosan egymásra épülnek. Így a baktériumok egy-egy csoportjának nevezéktana függ azoktól az információktól, amelyek osztályozásuk alkalmával keletkeztek és az osztályozás a jellemzés eredményeként kapott információhalmazra támaszkodik. Amíg a nomenklátúra alkalmazását 1992 óta egyértelmű, nemzetközileg elfogadott szabályok rögzítik (2), az osztályozást és jellemzést mind a mai napig hivatalosan még nem szabályozták.

Osztályozás

Minden biológiai osztályozás végső célja az élő (és a kövületként fennmaradt ősi) szervezetek jól nyomon követhető elrendezése különböző csoportokba. A prokarióták osztályozásában elkülöníthető legmagasabb szintek, a két „domain”: „*Bacteria*” és „*Archaea*”. Az 1. táblázatban a humán kórokozó *Pasteurella multocida* ssp. *multocida* és a *Rothia mucilaginosa* baktériumok segítségével mutatjuk be a „domain” alatt sorban következő szinteket, egyúttal bemutatjuk a baktériumok nevezéktanának nemzetközi kódja szerinti hivatalos írásmódot is.

A prokarióták osztályozásának itt most nem részletezett története jól demonstrálja, hogy az időközönkénti változásokat a mind fejlettebb módszerek hozzáférhetősége eredményezte (3). Napjainkban az osztályozás polifázisos megközelítés alapján történik, amely tartalmazza a fenotípusos, a kemotaxonómiai és a genotípusos adatokat, továbbá a filogenetikai információkat. Bár a fajnál magasabb szintű taxonok (rendszertani egységek) esetén a filogenetikai megközelítésnek széles körű az elfogadottsága, ezt a prokarióta fajfogalom pontos tisztázása érdekében eddig még nem sikerült

¹ A közlemény a 2012.05.09-én, Dr. Lányi Béla tiszteletére rendezett 2. Tudományos napon elhangzott előadás alapján készült.

megfelelően alkalmazni. A tradicionális fajfogalmak között nincs egyetlen olyan sem, amely valamennyi élő szervezet esetén elfogadható. Az irodalom áttekintése alapján megállapítható, hogy a számos próbálkozás ellenére, a prokarióta faj fogalmának mind a mai napig nincs hivatalos definíciója (4, 5).

1. táblázat Az egymásra épülő rendszertani szintek

Rendszertani szint	<i>Pasteurella multocida</i> ssp. <i>multocida</i>	<i>Rothia mucilaginosa</i>
Domain	„ <i>Bacteria</i> ”	„ <i>Bacteria</i> ”
Törzs	„ <i>Proteobacteria</i> ”	„ <i>Actinobacteria</i> ”
Osztály	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>
Alosztály	-	<i>Actinobacteridae</i>
Rend	<i>Pasteurellales</i>	<i>Actinomycetales</i>
Alrend	-	<i>Micrococcinae</i>
Család	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i>
Genus	<i>Pasteurella</i>	<i>Rothia</i>
Faj	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Rothia mucilaginosa</i>
Alfaj	<i>Pasteurella multocida</i> ssp. <i>multocida</i>	-

Az 1950-es évek kezdetétől az új fejlesztések – pl. a numerikus taxonómia, a kemotaxonómia és a molekuláris módszerek területén – forradalmasították a prokarióták osztályozását. A 16S rRNS génszekvenálás, mint „gold standard” a prokarióták közötti természetes rokonsági kapcsolatok tanulmányozásához szolgáltat nélkülözhetetlen adatokat. Ezek az ubiquiter, univerzálisan elterjedt gének a jól használható molekuláris markerek minden tulajdonságát teljesítik; funkcionálisan állandóak, mérsékelten konzervált szerkezetűek és homológok. Stabilitásuk miatt kevésbé érintettek a laterális géntranszfer állandóan zajló folyamataiban, de éppen a túl konzervált tulajdonság miatt a 16S rRNS génszekvencia adatok összehasonlítása révén a közeli fajok elkülönítése nem lehetséges. Napjainkban a szoros rokonsági kapcsolatban álló törzsek illetve fajok elkülönítésére az MLSA (multilocus sequence analysis) vagy a DDH (DNS-DNS hibridizáció) a legelterjedtebb módszerek. A 16S rRNS génszekvenálás segítségével zajló analízisek jó alapot biztosítanak a prokarióták osztályozásához a genusok és a genusok feletti szintek esetén, de a legújabb módszerek alkalmazása ellenére is számos taxonon belül maradnak a rendszertani problémák továbbra is megoldatlanok. Éppen ezért a tradicionális

módszerek továbbra is kulcsfontosságú elemei maradnak a különböző helyekről kitenyészett baktériumok osztályozásának.

A prokariótáknak tehát jelenleg még nincs hivatalosan elfogadott osztályozása. A Bergey's Manual of Systematic Bacteriology szerkesztői és szerzői a legújabb kiadás eddig megjelent köteteiben pontos és naprakész osztályozást igyekeznek nyújtani (pl. 6, 7). Ez azonban nem tekinthető hivatalosnak, bár az általuk megadott osztályozást a tudományos mikrobiológiai közösségek legszélesebb rétegei elfogadják. Természetesen a Bergey's Manual egy-egy kötetében az aktuális osztályozás megjelenése és egy adott, a későbbiekben vizsgált rendszertani egység besorolása az időközben történt változások miatt eltérhet, ezért a kérdéses baktérium rendszertani helyzetét a laboratóriumban dolgozó szakembereknek mindig fontos figyelemmel kísérniük. Itt jegyezzük meg, hogy a 2012-ben megjelent legújabb kötetben (8) a szerkesztők egy önálló fejezetet szenteltek a 2001-ben megjelent első kötet óta közölt változások ismertetésének (filogenetikai rendszerek fontosabb revíziói, új taxonok leírása, stb.). Az adott genus felett lévő taxonómiai szinteket is érdemes nyomon követni, mert a különböző, gyakorlati szempontokra összpontosító kézikönyvek a baktériumokat az azonosításukat megkönnyítő, önkényes szempontok szerint csoportosítják. Így pl. a korábban a *Pseudomonas* genusba tartozó, nem fermentáló, Gram-negatív baktériumokat általában egy helyen részletezik, bár a molekuláris vizsgálatok eredményei alapján az ezekből újonnan kialakított genusok jelenleg a „*Proteobacteria*” törzs több osztályába illetve az osztályokon belül is több rendbe vagy családba tartoznak. Az ugyancsak önálló csoportként kezelt Gram-pozitív coccusok döntő többsége a „*Firmicutes*” törzsbe tartozik, de pl. a *Kocuria* vagy a *Kytococcus* genus az „*Actinobacteria*” törzsbe sorolható.

A mikrobiológiai laboratóriumokban alkalmazott kézikönyvekben a gyakorlati szempontok szerint csoportosított genusok tulajdonságait alapul véve a különböző határozókulcsokat is könnyebb alkalmazni. A kereskedelembe kapható félautomata rendszereknél a megfelelő panelek kiválasztásához is általában azokat a hagyományos alapvizsgálatokat kell elvégezni, melyeknek eredményei alapján a kórokozó baktériumok főbb csoportjait elkülöníthetjük (Gram-festés, kataláz- és oxidáz-teszt, glükóz és laktóz oxidációjának és/vagy fermentációjának vizsgálata, stb.). Egy további, munkavédelmi szempontok szerinti, nem hivatalos osztályozás a különböző veszélyességi szintű baktériumok BSL (biological safety level) kockázati csoportjainak kialakítása.

Jellemzés

Azok a törzsek, melyeknek DDH értéke 70 % vagy ennél nagyobb és elkülönült fenotípusos tulajdonságokkal rendelkeznek, ugyanabba a fajba sorolhatóak. A DDH értéke alapján külön fajba sorolható törzsek, melyeknek nincs határozottan elkülönülő fenotípusa, különböző jelzésekkel ellátott ún. „genomospecies”-ek képviselői. Ilyenekkel a klinikai jelentőséggel bíró baktériumokat leíró szakirodalomban is gyakran találkozhatunk (pl. *Acinetobacter*-ek).

Minden új faj leírásánál a feno- és genotípusos adatokat pontosan meg kell adni, egyúttal a törzset (egyetlen törzs vizsgálata alapján a szakemberek nem javasolják új faj leírását) tulajdonságaik alapján a közel rokon fajoktól is egyértelműen el kell különíteni. Ilyenkor a jellemzésnek lehetőleg minden lényeges részletre ki kell terjednie, ehhez útmutatásként Tindall és munkatársainak napjainkban megjelent átfogó közleménye szolgáltat konkrét javaslatokat (9). Bár a genom-orientált rendszertani munka a világ számos laboratóriumában szinte egyedül alkalmazott módszer, az értékes információkat szolgáltató fenotípusos jellemzés továbbra is a prokarióta rendszertan nélkülözhetetlen eleme marad a mikrobiológiai laboratóriumok túlnyomó többségében (4). Egy-egy új faj leírása és jellemzése nagyon munkaigényes folyamat, amely igen sok, az adott taxon vizsgálatára specializálódott szakemberekből álló, nemzetközi bizottságok által javasolt feno- és genotípusos tulajdonságok vizsgálatára kell, hogy kiterjedjen (10). Sajnos az ehhez a munkához szükséges felszereltséggel és hozzáértéssel rendelkező laboratóriumok száma igen kevés, nemcsak Magyarországon, de a világ számos országában is.

A 2005-ben megjelent Bergey's Manual (6) szerint a *Bacteria* „domain”-ba 25 törzs, 34 osztály, 78 rend, 230 család, 1227 genus és 6740 faj tartozik. Azóta számos új fajt leírtak és mivel a baktériumok rendszertana még viszonylag fiatal és erőteljesen fejlődő tudományág, ez a közeljövőben még fokozódik. Az újonnan megnevezett taxonok számának nagyarányú növekedéséért főleg az alábbi két tényező felelős:

1. A dúsítás és az izolálás területén napjainkban egyre változatosabb és mind több körülményre figyelmet fordító módszereket alkalmaznak, amelyek a mikroorganizmusok tényleges biokémiai tulajdonságait és tenyésztési igényeit messzemenően figyelembe veszik.
2. A mikroorganizmusok törzseinek jellemzéséhez mind több új módszert fejlesztenek ki és mind szélesebb körben alkalmazzák ezeket.

A 90-es évek közepétől megjelenő közlemények szerint már feltételezték, hogy a bolygónkon létező valamennyi baktériumfajnak csak egy elenyésző hányadát ismerjük és a környezetből származó bakteriális DNS génszekvenciák vizsgálata alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a Földön létező baktériumfajoknak kevesebb mint 1 %-a tenyésztethető (11). A fenti 1. pontban említett metodikai fejlesztések (pl. 12) és a különleges élőhelyek tulajdonságainak mind alaposabb ismerete azonban már gyakran lehetővé teszi, hogy valamely speciális élőhelyen előforduló, genetikai anyagának kimutatására alapuló ún. „candidatus” (jelölt) taxonok képviselőit utóbb sikerül kitenyészteni (13).

A jellemzéshez alkalmazott korszerű módszerek elterjedése (2. pont) is nagy mértékben hozzájárulhat ahhoz, hogy a tenyésztethető, de nehezen meghatározható baktériumok azonosításával az új taxonok száma gyorsan növekedjen. A klinikai gyakorlatban nem ritka, hogy a könnyen kitenyészthető kórokozókat a rutinszerűen végrehajtott rendszertani vizsgálatokkal nem sikerül azonosítani. Egy napjainkban megjelent tanulmány (14) több mint négy év alatt gyűjtött, 26000-nél is több azonosítatlan törzs 16S rRNS génszekvenálás segítségével végzett analízisét mutatja be. A törzsek vizsgálatának eredményei alapján 95 új taxont írtak le, melyek képviselői több beteg mintáiból is kitenyésztettek, így adataik epidemiológiai következtetések levonására is alkalmasak.

Nevezéktan

Egy taxon korrekt neve érvényes publikációján, hitelesítésén és a leírását tartalmazó közlemény elsőbbségén alapul. Mint fent már említettük, a nomenklátúra alkalmazása hivatalosan szabályozott (2), de a rohamosan fejlődő módszerekre támaszkodó osztályozásból származó információk napjainkban már nem kerülnek be a lefektetett szabályok közé. Így számos probléma adódik abból, hogy az irodalomban rendszeresen használt és újonnan javasolt fogalmakat hivatalosan nem tisztázzák. A nevezéktan szerint nem érvényesek pl. az osztályokon felüli rendszertani szintek, továbbá egyes, korábban rendszeresen használt faj alatti szint. Említésre méltó még, hogy napjainkig több mint háromszáz „jelölt” fajt, pl. „*Candidatus Chryseobacterium timonae*” (15) illetve egyéb taxont leírtak, de maga ez a fogalom szintén nem érvényes (a még nem elfogadott vagy bizonytalan helyzetű taxonokat idézőjelbe kell tenni, a jelölteket a fenti módon, az egyéb, hasonlóan nem elfogadott taxonok nevének írásmódját ld. az 1. táblázatban).

Évente félezernél is több az újonnan leírt fajok illetve az ennél magasabb rendszertani egységek száma. 1980. január 1-e óta a baktériumok nevének

elsőbbségét a baktériumnevek elfogadott listája (16) alapján jegyzik. 2000. januárjától az új nevek és új nevezéktani kombinációk csak akkor kerülhetnek az elfogadott nevek listájába, ha az International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) folyóiratban kerültek közlésre. Az elfogadott nevek első listája egyébként 2200 nevet adott meg genus és ez alatti szinten. 2010 végéig azonban már 9987 érvényes fajnév (ebből 1521 az új kombináció vagy szinonim név) és 1876 genusnév (ebből 103 szinonim név) jelent meg. Ezek áttekintését segíti a DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) által készített „naprakész bakteriális nevezéktan”, amelyet havonta frissítenek (17). Ezzel összhangban van a több mint 14 éve online elérhető és ugyancsak kb. havonta frissített adatbázissal rendelkező LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature). Az LPSN-ben (18) nemcsak a leírt és elfogadott (illetve külön évenkénti bontásban a nem érvényes) neveket találjuk meg, hanem további rendszertani információkat is; a nevezéktan szabályait illetve a hozzá szorosan kötődő fogalmakat, továbbá egyes rendszertani csoportok esetén az azonosítás során is jól alkalmazható (francia nyelvű) összefoglalókat.

Azonosítás

A kórokozó mikroorganizmusok alapos és gyors azonosítása kritikus jelentőségű, hogy a betegek szakszerű kezelését minél előbb megkezdhessük. Az azonosítást gyakran, mint a rendszertan egy részét említik, de ez „csak” egy ismeretlen és a már osztályozott és megnevezett baktériumok összehasonlítása, majd az eredmények alapján a kérdéses mikroorganizmus besorolása valamely ismert vagy egy eddig ismeretlen taxonba. A klinikai gyakorlatban az azonosítás során alkalmazott eljárásoknak olyannak kell lenniük, hogy a lehető legkevesebb vizsgálattal minél gyorsabban meg lehessen állapítani a kérdéses mikroorganizmusokról, hogy azok mely rendszertani egységbe tartoznak.

A kézikönyvekben szereplő határozókulcsok (és általában véve valamennyi azonosítást elősegítő algoritmus) hatékonyabbá teszik és meggyorsítják az identifikálás folyamatát, mivel kiemelik a szükséges és elégséges vizsgálatokat, meghatározva azok sorrendjét. A határozókulcsok használatát ugyanakkor korlátozzák az atipikus és variabilis tulajdonságok. Bármilyen algoritmus alkalmazása esetén az eredményt mindenképpen szükséges további vizsgálatok elvégzésével megerősíteni.

A kórokozó baktériumok azonosításánál a fajon belüli diverzitást is figyelembe kell venni. A mikroorganizmusoknak az a képessége, hogy egy adott betegséget képesek előidézni, a faj azonosításához elfogadott kritérium. Így pl. a *Neisseria*

gonorrhoeae és a *Neisseria meningitis* a feno- és genotípusos tulajdonságaik alapján faji szinten alig különböztethetők meg, de az általuk okozott betegség alapján két önálló fajba sorolták ezeket. A mozgásképeség, a laktóz fermentációja és a lizin dekarboxilációja alapján a *Shigella* és az *Escherichia coli* jól elkülöníthető. Ugyanakkor a filogenetikai vizsgálatok szerint ezek ugyanabba a fajba tartoznak. Az eltérések gyakran a környezethez (pl. gazdaszervezet) való adaptációnak köszönhetőek. Régóta ismert, hogy a laboratóriumi vizsgálatok alapján nehezen megkülönböztethető, szoros rokonságban lévő *Bacillus anthracis* és *Bacillus cereus* közötti minimális különbségek – ami alapján külön fajba sorolják ezeket a baktériumokat – ökológiai eltérésnek minősíthetők és szorosan kötődnek a virulenciájukhoz (19). Még a veszélyes kórokozókkal foglalkozó tudományterületen maradván; MLST vizsgálatokból származó eredmények alapján már közel 10 éve tudjuk, hogy a *Burkholderia mallei* a *Burkholderia pseudomallei* egy erősen gazdaszervezetspecifikus klónja (20). A szoros rokonsági kapcsolatban álló *Brucella* és *Ochrobactrum* fajok genetikai vizsgálatának eredményei alapján viszont a közelmúltban merült fel, hogy a *Brucella* egy redukált genommal rendelkező *Ochrobactrum* lehet (21).

Bármely azonosítás eredményét tehát – a fenotípusos és genotípusos jellemzők vizsgálatának adatain túlmenően – a klinikai szempontok is nagy mértékben befolyásolhatják. Az antibiotikum-használat miatt kialakult szelekció és az immunszuppresszált humán populáció növekedése miatt megfigyelhetők a kórházak egyes osztályain izolálható új kórokozó baktériumok, amelyek korábban betegségeket nem okoztak, bár a természetben már eddig is széles körben elterjedtek. Az ökológiai és evolúciós szempontok figyelembe vétele így a kórokozó baktériumok esetén is alapvető a mind mai napig nem tisztázott fajfogalom megalapozásához (22). A rendszertan és azonosítás kérdéseinek egy mind összetettebb megközelítése alapján talán megérthetjük azt is, hogy egyes „környezeti” baktériumok hogyan válhatnak kórokozókká (23).

Irodalom

1. Szabó Zs., Kurunczi M.: Az Orvosi Baktériumok Magyar Nemzeti Gyűjteménye (HNCMB). Mikrobiológiai Körlevél, XII. évf. 1.sz., 2012.
2. International Code of Nomenclature of Bacteria (1990 Revision). Bacteriological Code. Washington, D.C. 1992, American Society for Microbiology.
3. Schleifer, K.H.: Classification of *Bacteria* and *Archaea*: Past, present and future. Syst Appl Microbiol 2009, 32: 533-42.
4. Staley, J.T.: Universal species concept: pipe dream or a step toward unifying biology? J Ind Microbiol Biotechnol 2009, 36: 1331-36.
5. Krichevsky, M.I.: What is a bacterial species? I will know it when I see it. Bull BISMis 2011, 2:17-23.
6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol Two: The *Proteobacteria*, Part A – C. Garrity, G.M. (Ed.-in-Chief) 2005, Springer Verlag.
7. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol Three: The *Firmicutes*. Whitman, W.B. (Director of the Edit. Office) 2009, Springer Verlag.
8. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol Five: The *Actinobacteria*. Whitman, W.B., Goodfellow, M., Kämpfer, P. et al. (Eds.) 2012, Springer Verlag.
9. Tindall, B.J., Rosseló-Móra, R., Busse, H.-J. et al.: Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. Int J Syst Evol Microbiol 2010, 60: 249-66.
10. Minimal standards for the descriptions of new taxa
<http://www.bacterio.cict.fr/minimalstandards.html>
11. Ammann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H.: Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev 1995, 59: 143-69.
12. Vartoukian, S.R., Palmer, R.M., Wade, W.G.: Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. FEMS Microbiol Lett 2010, 309: 1-7.
13. Jumas-Bilak, E., Carlier, J.-P., Jean-Pierre, H. et al.: *Jonquetella anthropi* gen. nov., sp. nov., the first member of the candidate phylum 'Synergistetes' isolated from man. Int J Syst Evol Microbiol 2007, 57: 2743-8.
14. Schlager, R., Simmon, K.E., Fisher, M.A.: A systematic approach for discovering novel, clinically relevant bacteria. Emerg Infect Dis 2012, 18: 422-30.
15. Drancourt, M., Berger, P., Raoult, D.: Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. J Clin Microbiol 2004, 42: 2197-202.

16. Skerman, V.B.D., McGowan, V., Sneath, P.H.A. (Eds.): Approved list of bacterial names. Washington, D.C. 1980, American Society for Microbiology.
17. Bacterial nomenclature up-to-date (Approved lists, validation lists). Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Braunschweig, Germany
<http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft%20id=14>
18. Euzéby, J.P.: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
<http://www.bacterio.cict.fr/>
19. Helgason, E., Økstad, O.A., Caugant, D.A. et al.: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. Appl Environ Microbiol 2000, 66: 2627-30.
20. Godoy, D., Randle, G., Simpson, A.J. et al.: Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. J Clin Microbiol 2003, 41: 2068-79.
21. Aujoulat, F., Roger, F., Bourdier, A. et al.: From environment to man: genome evolution and adaptation of human opportunistic pathogens. Genes 2012, 3: 191-232.
22. Godreuil, S., Cohan, F., Shah, H., Tibayrenc, M.: Which species concept for pathogenic bacteria? An e-debate. Inf Gen Evol 2005, 5: 375-87.
23. Georgiades, K., Raoult, D.: Defining pathogenic bacterial species in the genomic era. Front Microbiol 2011, 1: 151. doi: 10.3389/fmicb.2010.00151.