



2024. XXIV. évfolyam 4. szám

Tartalom:

Csőben végzett koaguláz-próba, hemokultúrák direkt vizsgálatához

Dr. Felső Péter
Zala vármegyei Szent Rafael Kórház, Mikrobiológiai laboratórium

2024



Kiadja: Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központ
A kiadó és a szerkesztőség székhelye: 1097 Budapest, Albert Flórián út 2-6.
Felelős kiadó: Dr. Müller Cecília

Alapító szerkesztő:

Dr. Füzi Miklós

Dr. Gacs Mária

Felelős szerkesztő:

Pásztai Judit

Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály

Szerkesztő:

Dr. Áy Éva

Erdősi Tímea

Technikai szerkesztő:

Adravec Lilla

Olvasó szerkesztő:

Dr. Dencs Ágnes

Dr. Tóth Ákos

ISSN 2063-9813 (Online)

A Mikrobiológiai Körlevelek az NNGYK honlapján

www.nnk.gov.hu elérhetőek

Csőben végzett koaguláz-próba, hemokultúrák direkt vizsgálatához

Dr. Felső Péter

Zala vármegyei Szent Rafael Kórház, Mikrobiológiai laboratórium

1. Bevezetés

A klinikai mikrobiológiai gyakorlatban a gyors és pontos eredményközlés kulcsfontosságú és életet menthet.

Számos esetben a gyakorlatban nem állnak rendelkezésre azok a legkorszerűbb eszközök, amelyek a legrövidebb leletátfordulási időt biztosítják, ezért fontosak lehetnek azok a (régebbi, elfeledett) módszerek, amelyek kisebb eszközigénnyel, de megbízhatóan, néhány órán belül legalább előzetes eredménnyel szolgálhatnak a diagnózis felállításához és az eredményes kezelés megkezdéséhez.

Az alábbiakban egy ilyen módszer, a hemokultúrákból, csőben végzett direkt koaguláz-próba alkalmazását és a tapasztalt eredményeket foglaltam össze.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Véráramfertőzés és leggyakoribb kórokozói

A véráramfertőzés olyan infektív ágensek által okozott kórkép, amit életképes bakteriális vagy gombás kórokozók jelenléte okoz a véráramban. Ezek a mikroorganizmusok gyulladásos választ váltanak ki, ami a klinikai, laboratóriumi és hemodinamikai paraméterek megváltozásával mutatható ki (1).

A véráramfertőzések diagnosztikájához elengedhetetlen a betegről hemokultúra palackba levett vérminta mikrobiológiai laboratóriumba történő beküldése, valamint vizsgálata. A fertőzésnek legtöbbször szisztémás jelei vannak, mint például hidegrázás, láz, tachycardia, hipotenzió vagy hányinger.

A véráramfertőzésben többféle bakteriális kórokozó szerepe is ismert, amelyeknek az előfordulási gyakorisága és földrajzi eloszlása időről időre változhat.

Schöneweck és munkatársai például Németország tübingiai tartományában 26 kórház közreműködésével az 1. táblázatban szereplő adatokat közölték 2021-ben a hemokultúrából izolált leggyakoribb kórokozók előfordulásáról (2):

1. táblázat: Németország tübingiai tartományában végzett 2021-es vizsgálatokban szereplő pozitív hemokultúrák kórokozóinak százalékos megoszlása (2)

Összes véráram-fertőzéshez viszonyított megoszlási arány (%)	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
	25,4	4,6	1,7	15,2

Egy Angliában végzett vizsgálat során viszont a 2023-24-es évben a következő kórokozók dominanciáját jegyezték fel (2. táblázat):

2. táblázat: 2023-24-ben végzett angliai kutatás alapján a pozitív hemokultúrák kórokozóinak százalékos megoszlása (3)

Összes véráram-fertőzéshez viszonyított megoszlási arány (%)	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
	15,8	14	5	12,8

Ezek az adatok a Zala Vármegyei Szent Rafael Kórház laboratóriumában az alábbiak szerint alakultak 2019 és 2023 között. A 3. táblázatban az előzőekhez hasonlóan szűrt adatok szerepelnek, azaz egy betegről egy kórokozó csak egyszer van feltüntetve.

3. táblázat: A Zala Vármegyei Szent Rafael Kórházban pozitív hemokultúrákból kimutatott kórokozók százalékos megoszlása 2019 és 2023 között.

Évek (összes pozitív HK)	Összes véráramfertőzéshez viszonyított megoszlási arány (%)			
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
2019 (904)	12,5	3	2,3	11,6
2020 (1038)	9	5,1	3,4	9
2021 (1365)	9,4	3,2	3,6	10,2
2022 (964)	12,7	4,5	3,6	12,4
2023 (924)	18,8	3,2	2,5	15,6

Kórházunkban a pozitív hemokultúrákból kimutatott kórokozók százalékos megoszlása hasonlóságot mutat az országos adatokkal, melyek a 4. táblázatban olvashatóak.

4. táblázat: A magyarországi pozitív hemokultúrákból kimutatott leggyakoribb kórokozók százalékos megoszlása 2019 és 2023 között a Nemzeti Bakteriológiai Surveillance adatai alapján.

Évek (összes pozitív HK)	Összes véráramfertőzéshez viszonyított megoszlási arány (%)			
	<i>E. coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
2019 (22460)	11,8	5,2	4,1	9,9
2020 (22147)	9,6	4,5	3,8	8,1
2021 (33963)	7,8	4,3	3,8	8,1
2022 (27443)	10,1	4,6	3,9	9,1
2023 (30025)	10,6	5,5	3,6	8,9

2.2. A *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) által okozott véráramfertőzés

A közösségben szerzett és az egészségügyi ellátással összefüggő véráramfertőzések egyik vezető bakteriális kórokozója a Gram szerint pozitívan festődő, coccus sejt morfológiájú *S. aureus*. Ennek incidenciáját globálisan 10-30 eset/100 000 főre becsülik, az általa okozott mortalitás magas (15-40%) (4, 5, 6).

Hazánkban a Semmelweis Egyetem által végzett kutatás során, melyben *S. aureus* által okozott véráramfertőzéseket vizsgáltak, azt találták, hogy a bármilyen okból bekövetkező 30 napos mortalitás methicillin rezisztens *S. aureus* (MRSA) esetében 39,9%, míg methicillin érzékeny *S. aureus* (MSSA) esetében 30,7% volt. Az összes *S. aureus* esetet vizsgálva pedig 35,3%-os mortalitást írtak le (7).

2.3. A *S. aureus* túlélése a gazdaszervezetben

Ezen Gram-pozitív kórokozó számos olyan védekezési mechanizmussal rendelkezik, amelyek segítségével képes alkalmazkodni a gazdaszervezethez. Ezek közül kiemelendők a gazdaszervezet immunrendszerének elkerülésére szolgáló tulajdonságai, mint például túlélés az immunsejtekben, az immunsejtek vándorlásának akadályozása vagy az immunsejtek enzim általi károsítása (8), biofilmképzési képessége az intravaszkuláris katétereken és beültethető orvosi eszközökön (9). Mindemellet, korábbi tanulmányok beszámoltak a *S. aureus* intracelluláris perzisztenciájának képességéről is különböző típusú (például hám-, és endotheliális) gazdasejtekben, és oszteoblasztokban (10).

A biofilmekben és a gazdasejteken belül a *S. aureus* lassan növekvő szubpopulációt, úgynevezett kis telepváltozatokat (SCV, Small Colony Variants) képezhet. Ezek a telepek alacsonyabb metabolikus aktivitást mutatnak, és fokozott toleranciával rendelkeznek antibiotikumokkal szemben, ami krónikus fertőzések kialakulásához és visszaesésekhez vezethet (11).

2.4. A *S. aureus* okozta véráramfertőzés és következményei

A közösségben szerzett SA-BSI-ben (*S. aureus* - Blood Stream Infection) szenvedő betegeknél és a hosszan tartó bakteriémiában fokozott a másodlagos gócok létrejöttének kockázata (12). A betegek 8-15%-ánál a hematogén terjedés által későbbi, másodlagos szövődmények is kialakulhatnak (elsősorban endocarditis, csigolya-osteomyelitis, tályogok, stb.); az elsődleges fertőzést követően az ízületi protézisek, elektronikus szívkészülékek, illetve egyéb implantátumok beültetésével összefüggő *S. aureus* fertőzések akár hetekkel vagy hónapokkal később is előfordulhatnak.

A *S. aureus* vizeletből való izolálása szennyeződést, kolonizációt, húgyúti fertőzést jelenthet, és összefüggésbe hozható a *S. aureus* bakteriémiával is (13). Ebben az esetben előfordulása vagy a véráram fertőzés súlyosbodásának jele, vagy az urosepsis elsődleges forrása (14). A kórokozó jelenléte bakteruriában az esetleg mögöttes véráram-fertőzés felkutatását teszi szükségessé. Kivételt képeznek ez alól a húgyutakban idegen testtel rendelkező betegek, az állandó katétert viselők, akik esetében a katéter által generált gyulladás talaján képződő fibrinogén segíti a kórokozó megtapadását (a Clumping faktor B által) az urogenitális rendszerben.

Az elsődleges *S. aureus* okozta véráramfertőzések kiinduló pontjának a katétereket és a lágyyszöveti fertőzéseket tartják (15). Ennek kivédése érdekében az érkatéterrel összefüggő véráram fertőzések megelőzésére mind hazai, mind külföldi ajánlások, útmutatók elérhetőek (16).

Számos esetben előfordulhat, hogy a fertőzőforrás csak további képalkotó vizsgálatokkal mutatható ki (17), így a gócok akár 25%-a is felderítetlen maradhat (15). Ezért a *S. aureus* pozitivitást mutató betegek gondos kórelőzményének felvétele jelentős szereppel bír, különös figyelemmel a lehetséges gócokra.

A *S. aureus* szeptikus metasztázisokat okozó további terjedésének megakadályozása érdekében a fertőzési góc felderítését a lehető leggyorsabban el kell végezni, a fertőzött

idegen testet, beleértve az érkatétereket és a szívelektronikai eszközöket – a megfelelő antibiotikus kezelés mellett – a szervezetből minél előbb el kell távolítani (18, 19).

Azonban maga a véráram fertőzés is okozhat metasztatikus fertőzést a szervezetben, aminek felderítése a kezelés során alkalmazott antibiotikum terápia időtartamának megítéléséhez is elengedhetetlen (20).

Az SA-BSI-k egyik legsúlyosabb következménye az endocarditis, ami az esetek 10-20%-ában fordul elő, és rontja a betegség kimenetelének prognózisát, ezért minden esetben, ha *S. aureus* bakteriémia igazolódik, ajánlott elvégezni az ezirányú vizsgálatokat is (21).

A szintén komoly gondot okozó hematogén osteomyelitis általában monomikrobiális (22). Leggyakrabban olyan betegeknél fordul elő, akiknél nincs előzetes kockázati tényező vagy fertőzés, azonban előidézheti a kórokozók véráramba kerülése is, ami egy meglévő fertőzéstől eredhet. A hematogén osteomyelitis az összes osteomyelitis fertőzésnek csak 20%-át teszi ki, a gyermekek osteomyelitises eseteinek többsége azonban hematogén (23).

A véráramba kerülő *S. aureus* bejuthat a perifériás szövetekbe, ahol gyulladásos választ indukál, amely során neutrofil granulocitákat, makrofágokat és fagocitákat vonz a helyszínre. A folyamat fibrin lerakódásához vezet, de a lézió közepén a baktériumok tovább szaporodnak. Így a kórokozó egy fibrinlerakódásokból álló pseudotok védelmében kerülheti el a szervezet védekező mechanizmusait. A tályogok esetleges felszakadását követően más szövetekben is áttéteket képezhet, amelyek antibiotikum és esetleg sebészi beavatkozás híján nem számolhatóak fel (24).

2.5. A *S. aureus* okozta véráram fertőzés mikrobiológiai diagnosztikai lehetőségei

Mint az előzőekből is kiderül, a fertőzés meglétének mielőbbi felderítése a beteg esélyeit nagyban növeli. MALDI-TOF műszerrel vagy molekuláris módszerekkel nem rendelkező laboratóriumok esetében a hemokultúra automatából pozitívan kikerülő palackokból direkt kenet és kioltás készül. A mikroszkópos vizsgálat már orientálhatja a vizsgálatok irányát, de pontosabb eredmény csak másnapra, a tenyészeteket kézben tartva adható.

A minél előbbi, megfelelő mikrobiológiai eredmény elérése érdekében a *S. aureus* egyik fő jellemzőjét, a véralvasztási képességet vehetjük célba, ami megkülönbözteti a koaguláz-negatív – bőrmikrobióta részét is alkotó *S. epidermidis* és más *Staphylococcus* – fajoktól.

A koagulációnak a sérült erek elzárásán kívül a mikrobiális kórokozók elleni védekezésben is jelentős szerepe van, a behatoló baktériumokat alvadékban csapdába ejti, és így immobilizálja azokat (25). Azonban – mint azt sok más gazdaszervezet védekezési

útvonalaánál is megfigyelték –, a koaguláció egyúttal a bakteriális immunelkerülési stratégia is lehet.

A *S. aureus* baktérium kétféle koaguláz-enzimet, szabad-, és kötött koagulázt (ún. Clumping faktor) termel. Míg a szabad koaguláz extracellulárisan szekretált enzim, a kötött koaguláz egy sejtfalhoz kapcsolódó fehérje. A szekretált fehérje ún. cső-koaguláz teszttel detektálható, a kötött koaguláz jelenléte ugyanakkor tárgylemez-koaguláz teszt segítségével vizsgálható.

Azon jelenséget, hogy a kalcium-kelátos plazma vagy teljes vér *S. aureus*-szal történő beoltása gyors alvadást eredményez, először Loeb írta le 1903-ban (26).

A *S. aureus* két oldható koaguláza (a klasszikus koaguláz [Coa], és a *von Willebrand Factor-binding protein* [vWbp]) nem proteolitikus aktivitással éri el az alvadék képződését, hanem a protrombinhoz kapcsolódva, annak szerkezeti változását előidézve aktiválják a fibrin létrejöttét (27, 28).

Az olyan laboratóriumi vizsgálat során, amelynél a pozitív hemokultúrákból készített kenetben Gram-pozitív, csoportokban elhelyezkedő coccusok láthatók, fontos feladatot jelent a *S. aureus* elkülönítése az egyéb, pl. koaguláz-negatív staphylococcusoktól, mely utóbbiak klinikai jelentőségét mérlegelni kell (pl. immunszuprimált, vagy ismert billentyű problémával küzdő betegek esetén), mivel gyakran a nem megfelelő mintavétel kontaminánsaként vannak jelen a mintákban.

Ezzel ellentétben, a *S. aureus*-pozitív hemokultúra eredményeket legtöbbször klinikailag relevánsnak kell tekinteni, és további vizsgálatokat (antibiotikum érzékenység meghatározás) szükséges végezni, majd ezen eredménynek megfelelő kezelést kell alkalmazni. Bár a hemokultúra *S. aureus*-szal való kontaminációja nagyon ritkán előfordulhat (<5%), a magas halálozási arány, továbbá a *S. aureus* okozta véráramfertőzéssel járó súlyos szövődmények magas kockázata miatt általában azonnali terápia indítása javasolt (29, 30).

A *S. aureus* korai identifikálásának fontossága a pozitív hemokultúrákból mindig is lényeges szempont volt a klinikai mikrobiológiai laboratóriumok számára.

A kezdeti technikák során a hemokultúra-palackokban lévő vért – az esetlegesen benne található koaguláz-pozitív baktériumok koaguláló hatásának kimutatása érdekében – közvetlenül használták a diagnosztikus plazmával való vizsgálatához (31).

Egy korábbi, 1780 pozitív hemokultúrát feldolgozó kutatás során, amelyben 477 *S. aureus*, és 1303 egyéb baktérium került kimutatásra tenyésztéses módszerrel, vizsgálták a direkt cső koagulációs technika érzékenységét. Vizsgálataik során az alvadékképződést 5 csepp

tenyésztés és 0,5 ml nyúlplazma keverékének 35°C-on, 2, illetve 4 órán át történő inkubálása után értékelték. A vizsgálat során megkülönböztették a csak részleges koagulációt (gyenge pozitív) is a teljestől (erős pozitív). Abban az esetben mikor mind a gyenge, mind az erős pozitív koagulációt adó eredményeket számításba vették 2 óra elteltével (477 *S. aureus* mintából 160 csöves koaguláz pozitív eredmény) a szenzitivitás 34%, a specificitás 100%, a pozitív prediktív érték 100% és a negatív prediktív érték pedig 80,2%-os eredményt adott. Ezek az értékek 4 órás inkubációt követően a következőképp alakultak (477 *S. aureus* mintából még 150 csöves koaguláz pozitív és 4 fals pozitív eredmény): szenzitivitás 65%, specificitás 99,7%, pozitív prediktív érték 98,7% és a negatív prediktív érték 88,6%. (32). A teszt alkalmával három erős és egy gyenge fals pozitív eredmény született, amelyek mögött három esetben koaguláz-negatív *Staphylococcus*, ill. egy esetben *E. faecalis* állt (5. táblázat).

5. táblázat: Az inkubációs idő hatása a közvetlenül pozitív hemokultúrák vérből végzett csöves koaguláz-tesztre (N=477) (32)

Inkubációs idő (óra)	<i>S. aureus</i> (pozitív minták száma (n; (%)))		Egyéb, nem <i>S. aureus</i> (pozitív minták száma (n; (%)))	
	erős pozitív	gyenge pozitív	erős pozitív	gyenge pozitív
2	125 (26*)	35 (7)	0	0
4	133 (28)	17 (3,6)	3 (0,6)	1 (0,2)
Összesen	258 (54)	52 (11)	3 (0,6)	1 (0,2)

*: a pozitivitás százalékos értéke

A kutatás során megállapításra került, hogy a pozitivitás (erős és gyenge pozitív eredményt is egyben számolva) csupán 65%-os érzékenységi értékeért a hemokultúra palackokban található antikoaguláns (nátrium-polianetol-szulfonát, SPS) volt a felelős, amelynek 0,0008% (vegyes %) koncentráció feletti jelenléte megakadályozza a rögzös koaguláció kialakulását (a SPS egy polianionos antikoaguláns, amely egyéb funkciók mellett a komplement gátlásával akadályozza meg a véralvadást).

Ennek felismerése vezetett a hemokultúra palackból kinyert minták fiziológiás sóoldattal való hígításához a koaguláz próba elvégzése előtt. Ezen tesztek során nyert eredmények azt mutatták, hogy SPS hiányában még a 100 CFU (Colony-forming unit, telepképző egység) sejtszám (csíraszám) is képes 4 órán belül jól értékelhető koagulációt okozni. A vérben magas csíraszámú jelen lévő *S. aureus* hígítatlan formában is képes koagulátumot képezni a hemokultúrából.

A korábbi módszerben használt, direkt hemokultúrából vett hígítatlan vérmintával, valamint a palackból származó minta hígítási módszerével végzett vizsgálat összehasonlító eredményei az 6. táblázatban láthatók. A vizsgálatba 45 *S. aureus*, és 95 koaguláz-negatív *Staphylococcus* izolátum került bevonásra (33).

6. táblázat: A „direkt”, és a „hígítási” koaguláz tesztek eredményeinek összehasonlítása (44)

Baktérium	direkt teszt (pozitivitás)		hígítási teszt (pozitivitás)	
	4 órás inkubáció	1 éjszakás inkubáció	4 órás inkubáció	1 éjszakás inkubáció
<i>S. aureus</i> (N=45)	28 (62%*)	41 (92%)	40 (89%)	44 (98%)
Koaguláz-negatív <i>Staphylococcus</i> sp. (N=95)	0	0	0	0

*: a pozitivitás százalékos értéke

A hígított pozitív vérmintával végzett vizsgálatok teljesítményét 95,5%-os érzékenységgel, és 100%-os specificitással jellemezte Thirunavukkarasu és Rathish (34), de ezzel szinte teljesen megegyező eredményre jutottak Diab és munkatársai is (35).

3. Laboratóriumban végzett vizsgálatok

3.1. Laboratóriumban beérkezett minták és az elvégzett vizsgálatok menete

Kórházunkban (Zala Vármegyei Szent Rafael Kórház), az elmúlt 5 évet figyelembe véve az összes levett hemokultúra átlagosan 4%-a volt *S. aureus* pozitív. A minták száma éves bontásban a 7. táblázatban olvasható.

7. táblázat: A Zala Vármegyei Szent Rafael Kórház elmúlt 5 évében a laboratóriumba érkezett hemokultúrák, *S. aureus* és koaguláz-negatív *S. aureus* pozitív minták száma, és aránya

Vizsgálat kezdete (év)	Összes hemokultúra (n)		<i>S. aureus</i> -pozitív hemokultúra (n; (%))		Koaguláz-negatív <i>Staphylococcus</i> sp. (n; (%))	
	Mintaszám	Személy	Mintaszám	Személy	Mintaszám	Személy
2019	5 145	1 388	216	59 (4,2)	431	253 (18,2)
2020	5 081	1 262	170	53 (4,2)	598	262 (20,7)
2021	6 136	1 454	253	80 (5,5)	765	352 (24,2)
2022	5 760	1 443	250	68 (4,7)	440	229 (15,8)
2023	5 997	1 535	273	80 (5,2)	300	185 (12,0)

Az előzőekben ismertetett információk alapján, és a saját laboratóriumunk tapasztalatai szerint a pozitívan jelzett hemokultúrákból minden esetben sürgősen Gram-festést és mikroszkópos vizsgálatot szükséges végezni, majd abban az esetben, ha a mintában a mikroszkópos vizsgálat során csoportokba rendezve Gram-pozitív coccusok láthatók, az alábbi protokoll alapján szükséges elvégezni a hígított direkt, csöves koaguláz-próbát is:

- a hemokultúrák palackot felrázzuk, majd a benne lévő vérből 250 µl-t kivéve fiziológiás sóoldattal tízszeresére hígítjuk (250 µl ➔ 2,5 ml),
- ezen hígított minta 100 µl-ét 12 mm átmérőjű steril üveg csőben lévő 1 ml hígítatlan humán vérplazmához (friss, fagyasztott vérplazma [FFP], Országos Vérellátó Szolgálat) pipetázzuk, majd a pipetta segítségével óvatosan, néhányszor átszuszpendáljuk,
- az így kapott szuszpenziót 36 °C-os termosztátba helyezzük.

A vizsgálat ellenőrzésére a mintákkal párhuzamosan negatív (baktérium mentes plazma) és pozitív (ATCC 25923 *S. aureus* törzsszel beoltott plazma) kontrollt is inkubáltunk azonos körülmények között.

Pozitív minta esetében már 2 óra elteltével részleges, vagy akár teljes koaguláció figyelhető meg, ennek hiányában a minta további inkubálása, és óránkénti leolvasása szükséges. A bármely időpontban pozitívvá váló minták további inkubálására nincs szükség.

Fontos megjegyezni, hogy a koaguláció ellenőrzése során a csöveket csak óvatosan szabad mozgatni/megbillenteni, mert a még csupán kismértékű koaguláció eredményét egy hirtelen mozdulat tönkre teheti, aminek következtében a vizsgálat fals negatív eredményt adhat. Mindemellett az óránkénti leolvasás fontosságát hangsúlyozza azon tény is, hogy egyes esetekben a kialakult koagulátum önmagától is képes oldódni, ami szintén hamis eredményhez vezethet.

3.2. Eredmények

A módszer 2021-es bevezetése óta számos vizsgálatot végeztünk laboratóriumunkban: minden, több pozitív hemokultúrával rendelkező személy esetén – a biztosabb eredmény és a módszer teljesítőképességének tesztelése érdekében legalább 2 palackból – elvégzésre került az ismertetett koaguláz teszt. 2021-ben 253 *S. aureus*-pozitív hemokultúrából 186, 2022-ben 250-ből 202, míg 2023-ban a 273 esetből 208 alkalommal használtuk a módszert a gyors diagnózis elérése érdekében (8. táblázat). A nagyszámú minták vizsgálata alapján az általunk

végzett tesztek 4 esetet leszámítva megfelelő eredményt adtak, amelyeket a tenyésztéssel meg tudtunk erősíteni. 4 esetben mikor a teszt nem megfelelően működött, a teszt negatív eredményt adott annak ellenére, hogy abban *S. aureus* volt. Ezek a minták közt egy pár hemokultúra volt, mely egy főhöz tartozott (másik párral pedig nem rendelkezett) a másik 2 esetben viszont 1-1 aerob palackról volt szó, aminek viszont az anaerob párja pozitív reakciót mutatott, igaz csak az éjszakán át tartó inkubálást követően.

Néhány mintát leszámítva, mikor a koaguláció eredménye csak másnap reggelre vált jól láthatóvá, és így egyértelműen értékelhetővé (a minták mintegy 11%-a), ezen technika alkalmazásával szinte minden esetben 2, de legkésőbb 4 órán belül (a minták 32, ill. 57%-a) használható eredményhez jutottunk.

8. táblázat: A laboratóriumunkban végzett direkt csöves koagulációs tesztek eredményei *S. aureus* minták esetén

Év	Összes <i>S. aureus</i> pozitív hemokultúrák száma	Koaguláz tesztek száma	Pozitív tesztek száma	2 órán belül pozitív eredményt adó tesztek száma (n; (%))	2 órás inkubációt követően, de 4 órán belül pozitív tesztek száma (n; (%))	Csak egy éjszakás inkubáció után pozitív tesztek száma (n; (%))
2021	253	186	185	52 (28,1)	118 (63,8)	15 (8,1)
2022	250	202	200	64 (32,0)	114 (57,0)	22 (11,0)
2023	273	208	207	74 (35,7)	105 (50,7)	28 (13,5)
Összes elvégzett teszt	776	596	592	190 (32)	337 (56,9)	65 (11)

9. táblázat: A laboratóriumunkban végzett direkt csöves koagulációs tesztek eredményei koaguláz negatív *Staphylococcus*ok esetén

Év	Összes koaguláz negatív <i>Staphylococcus</i> pozitív hemokultúrák száma	Koaguláz tesztek száma	Pozitív tesztek száma
2021	765	212	0
2022	440	178	0
2023	300	114	0

Bár a korábbi kutatásokban nem történt utalás arra vonatkozóan, hogy különbség lenne az aerob és az anaerob hemokultúra palackok teljesítményét illetően, a saját eredményeink alapján az anaerob palackok használatának előnyét tudtuk megfigyelni (10. táblázat). Ezzel kapcsolatban további vizsgálatok jelenleg is folyamatban vannak a laboratóriumunkban.

Abban az esetben, mikor egy személynek a mikroszkópos vizsgálat során több pozitív hemokultúrájában is *S. aureus*-szerű baktériumok voltak láthatóak (Gram szerint pozitívan festődő coccusok, csoportokban), a csöves koaguláz-tesztet legalább egy aerob, és egy anaerob palackból is elvégeztük. A 190 darab 2 órán belül pozitívan jelző teszt közül 116 anaerob és 74 aerob palack volt. 112 anaerob palacknak volt pozitív aerob párja is, míg a 74 aerob palack közül 72-nek volt pozitív anaerob párja is a teljes vizsgálat során, tehát vagy a 2 vagy a 4 órás vagy az éjszakán át történt inkubálás folyamán. 14 olyan pár volt melynek mind az aerob mind az anaerob palackja is 2 órán belül pozitív eredményt adott. A párral rendelkező palackok közül tehát összesen 156 olyan minta volt, amiknek csak az aerob vagy csak az anaerob palackja jelzett. A 2 órán belül pozitívan jelző és párral rendelkező palackok megoszlása tehát a következőképp alakult: 72 aerob (39,1%) és 112 anaerob (60,9%). Elmondható tehát, hogy az anaerob palackok a nagyjából 22%-nyi többségükkel a vizsgálat érzékenyebb és gyorsabb alapjául szolgálnak.

10. táblázat: A párral rendelkező aerob és anaerob hemokultúra palackok összehasonlítása a 2 órán belül pozitív eredményt adó minták között (pozitivitási arány)

Év	2 órán belül pozitív eredményt adó tesztek száma (n; (%))	2 órán belül pozitív eredményt adó aerob palackok száma (n; (%))	2 órán belül pozitív eredményt adó anaerob palackok száma (n; (%))
2021	50 (27)	18 (36)	32 (64)
2022	63 (31,5)	24 (38)	39 (62)
2023	71 (34,3)	30 (42,2)	41 (57,8)

A pozitív hemokultúra palackokból következő napon természetesen számos esetben koaguláz-negatív *Staphylococcus* sp. is kitenyészett, amelyek esetén a hasonló mikroszkópos kép alapján a csöves koaguláz-teszt szintén elvégzésre került, amely minden esetben negatívnak bizonyult.

A csöves koaguláz teszt előnye a tenyésztéssel szemben elsősorban a 4 órás inkubációs ablakon belül pozitív eredmény esetében van. A 11. táblázatban az összes teszt eredmény ennek megfelelően került feltüntetésre.

11. táblázat: Az összes elvégzett teszt eredményei a 4 órás inkubációs idő leteltéig, 2021-2023 között elvégzett tesztek (n=1100)

Tenyésztéssel megerősített eredmény	Összes elvégzett teszt	Összes pozitív teszt	2 órán belül pozitív teszt	2 órás inkubációt követően, de 4 órán belül pozitív tesztek	Negatív teszt
<i>Staphylococcus aureus</i>	596	592	190	337	69
Koaguláz-negatív <i>Staphylococcus</i>	504	0	0	0	504

A direkt koagulációs teszt használhatóságának megítéléséhez és a nemzetközi adatokkal való összehasonlíthatóság miatt a következőkben mintákra vonatkoztatva mutatjuk be az eredményeket, és erre végeztünk statisztikai számításokat. Egy pozitív mintának számít egy betegről származó hemokultúra palack pár (aerob+anaerob), ha mindkettő pozitív lett a vizsgálattal. Ez a megközelítés a klinikus felé történő eredményközlést veszi alapul.

12. táblázat: A direkt koagulációs tesztek eredményei a 4 órás inkubációs idő leteltéig a klinikus felé történő eredményközlést alapul véve.

	Összes elvégzett teszt mintákra vonatkozta tva	Összes pozitív minta	2 órán belül pozitív minta	2 órás inkubációt követően, de 4 órán belül pozitív minta	Negatív minta
<i>Staphylococcus aureus</i>	293	292	170	99	23
Koaguláz-negatív <i>Staphylococcus</i>	252	0	0	0	252



13. táblázat: A teljes vizsgálati időszak alatt elvégzett, összes *Staphylococcus aureus* pozitív eredmény összefoglalása mintánként és palacktípusonként.

Milyen hemokultúra palackból készült a teszt?	Összes pozitív minta (hemokultúra pár egy mintának számít)	2 órán belül pozitív			Csak 2-4 órás inkubációt követően pozitív			csak egy éjszakás inkubáció után pozitív		
		Mindkettő	Csak aerob palackból	Csak anaerob palackból	Mindkettő	Csak aerob palackból	Csak anaerob palackból	Mindkettő	Csak aerob palackból	Csak anaerob palackból
Aerob és anaerob palackból is	290	14	58	98	78	98	79	21	21	0
Csak aerob palackból	3		2			1			0	
Csak anaerob palackból	7			4			3			0

14. táblázat: *Staphylococcus aureus* pozitív eredménnyel rendelkező minták (290 hemokultúra pár, ahol mindkét palackból elvégzésre került a teszt) pozitív koaguláz teszt eredményének megoszlása palack típusonként, 0-2 órás leolvasási intervallum

Hemokultúra palack típus	Pozitív 0-2 órára	Negatív 0-2 órára
Aerob palack	72	218
Anaerob palack	112	178

15. táblázat: *Staphylococcus aureus* pozitív eredménnyel rendelkező minták (290 hemokultúra pár, ahol mindkét palackból elvégzésre került a teszt) pozitív koaguláz teszt eredményének megoszlása palack típusonként, 0-4 órás leolvasási intervallum

Hemokultúra palack típus	Pozitív 0-4 órára	Negatív 0-4 órára
Aerob palack	248	42
Anaerob palack	269	21

A 14. és 15. táblázatok adatai alapján mind 2 órán belül, mind 4 órán belül szignifikánsan nagyobb valószínűséggel (khi négyzet próba, $p \leq 0,005$) volt pozitív a hemokultúra párok anaerob tagja. Vizsgálataink eredményei egybevágóak a szakirodalomban megjelent adatokkal (16. táblázat).

16. táblázat: A módszert korábbi tanulmányokban alkalmazók eredményeinek összevetése a jelen vizsgálat eredményeivel

Szerző	Szenzitivitás (4 óra)	Specifititás (4 óra)	PPV (4 óra)	NPV (4 óra)	Szenzitivitás (overnight)	Specifititás (overnight)	PPV (overnight)	NPV (overnight)
Quian et al. (32)(hígítatlan módszer)	65%	99,7%	98,7%	88,6%				
Varettas et al. (33)(hígítatlan módszer)	62%	100%	100%	86,8%	91%	100%	100%	96,1%
Varettas et al. (33)(hígítási módszer)	89%	100%	100%	95%	98%	100%	100%	98,9%
Thirunavukkarasu et al. (34) (hígítási módszer)					95%	100%	100%	96,4%
Diab et al. (35)(hígítási módszer)					96%	100%	100%	96,9%
Jelen tanulmány	91,8%	100%	100%	91,3%	99,6%	100%	100%	99,6%

A táblázatban szereplő overnight adatok a vizsgálatok során pozitívvá váló összes tesztet tartalmazzák, azokat is melyek a 2 vagy 4 órás inkubálás során még negatív eredményt is adtak, tehát csak 4 óra elteltét követően váltak pozitívvá. PPV: pozitív prediktív érték, NPV: negatív prediktív érték

4. Összefoglalás

Eredményeinkből megállapítható, hogy a hígítással végzett direkt csöves koagulációs tesztet alkalmazva, a módszernek a laboratóriumunkban izolált *S. aureus*, és koaguláz-negatív *Staphylococcus* törzsekkel végzett vizsgálatok során a klinikus felé való eredményközlést alapul véve 91,8%-os érzékenységet és 100%-os specificitást lehetett megfigyelni 4 órán belüli értékelés alapján. Eredményeink és a szakirodalmi adatokra alapozva a módszert önmagában alkalmazva is ajánljuk pozitív hemokultúrákból végzett *S. aureus* azonosításhoz.

Pozitív hemokultúra esetén ajánlott a minél előbbi mikroszkópos vizsgálat, mely alapján már orientálhatóak a további vizsgálatok. Gram szerint pozitívan festődő coccus csoportok esetén – más gyors identifikációs módszer hiányában - a direkt csöves koagulációs teszt elvégzése javasolható. A palackból vett mintát tízszeresére hígítva fiziológiás sóoldattal (esetünkben 250 µL mintát kiegészítve 2,5 ml-re fiziológiás sóoldattal) 12 mm átmérőjű üvegcsőben lévő 1 ml hígítatlan vérplazmához pipetázzuk, majd 36°C-os termosztátba helyezzük. A csöveket fél óránként óvatos billegtetéssel ellenőrizzük. Pozitív eredmény esetén pedig már nincs szükség további inkubálásra. Ez esetben a klinikus értesíthető, és a pozitív hemokultúrából pedig elvégezhető az EUCAST által ajánlott gyors antibiotikum érzékenységi vizsgálat (RAST) is.

Abban az esetben, ha a hemokultúra pár mindkét palackja pozitívan jelzett, ajánljuk mindkettőből a teszt elvégzését, hogy a legnagyobb valószínűséggel kapjunk pozitív eredményt 4 órán belül. Azonban egyetlen palackból (ha a másik még nem jelzett, negatív maradt, vagy nem is áll rendelkezésre) elvégzett vizsgálat is várhatóan megfelelő eredményt ad 4 órán belül. Anaerob palack esetében a 2 órán belüli pozitivitás szignifikánsan nagyobb valószínűséggel várható, mint aerob palackokból.

A modern technikák árnyékában feledésbe merült metodikát laboratóriumunk is előszeretettel alkalmazza gazdaságossága, gyorsasága, és egyszerű kivitelezhetősége miatt, ezen módszer használatával bármely, szerényebb diagnosztikai lehetőségekkel és felszereltséggel rendelkező klinikai mikrobiológiai laboratórium is akár már 2 órán belüli eredményt szolgáltathat a klinikus részére.

A szerző ez úton mond köszönetet a Zala Vármegyei Szent Rafael Kórház Mikrobiológiai laboratórium munkatársainak a vizsgálatokban való asszisztáláshoz, továbbá az Országos Vérellátó Szolgálat Zalaegerszegi Területi Vérellátójának a szükséges vérplazma beszerzéséért.

5. Irodalomjegyzék

1. Viscoli, C. Bloodstream Infections: The peak of the iceberg. *Virulence*. 2016; 18;7(3):248–251.
2. Schöneweck, F, Roland PH, Rissner, F, Scherag, A, Löffler, B, Pletz, M, Brunkhorst, M, Hagel, S. The epidemiology of bloodstream infections and antimicrobial susceptibility patterns in Thuringia, Germany: a five-year prospective, state-wide surveillance study (AlertsNet). *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2021; 10,132
3. UK Health Security Agency. Official Statistics
Surveillance of bloodstream infections in critical care units, England: May 2016 to March 2024 report. 2024.
4. Laupland, KB, Lyytikäinen, O, Søgaard, M, Kennedy, KJ, Knudsen, JD, Ostergaard, C, Galbraith, JC, Valiquette, L, Jacobsson, G, Collignon, P, Schonheyder, HC. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. *Clin Microbiol Infect*, 2013; 19(5):465-71.
5. Nambiar, K, Seifert, H, Rieg, S, Kern, WV, Scarborough, M, Gordon, NC, Kim, HB, Song, KH, Tilley, R, Gott, H, Liao, CH, Edgeworth, J, Nsutebu, E, Cortés, LEL, Morata, L, Walker, AS, Thwaites, G, Llewelyn, MJ, Kaasch, AJ. Survival following *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: A prospective multinational cohort study assessing the impact of place of care. *J Infect*, 2018; 77(6):516-525.
6. Ishikawa, K, Furukawa, K. *Staphylococcus aureus* bacteremia due to central venous catheter infection: A clinical comparison of infections caused by methicillin-resistant and methicillin-susceptible strains. *Curues*, 2021; 13(7):e16607.
7. Horváth, A, Dobay, O, Sahin-Tóth, J, Juhász, E, Pongrácz, J, Iván, M, Fazekas, E, Kristóf, K. Characterisation of antibiotic resistance, virulence, clonality and mortality in MRSA and MSSA bloodstream infections at a tertiary-level hospital in Hungary: a 6-year retrospective study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2020; 7;19:17.
8. Thammavongsa, V, Keun Kim, H, Missiakas, D, Schneewinf, O. Staphylococcal manipulation of host immune responses. *Nat Rev Microbiol*, 2015; 13(9):529–543.
9. Hogan S, Zapotoczna, M, Stevens, NT, Humphreys, H, O’Gara, JP, O’Neill, E. Eradication of *Staphylococcus aureus* catheter-related biofilm infections using ML:8 and Citrox. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(10): 5968–5975.
10. Bravo-Santano, N, Ellis, JK, Mateos, LM, Calle, Y, Keun, HC, Behrends, V, Letek, M. Intracellular *Staphylococcus aureus* modulates host central carbon metabolism to activate autophagy. *Mosphere* 2018; 3(4): e00374-18

11. Tuscherr, L, Medina, E, Hussain, M, Völker, W, Heitmann, V, Niemann, S, Holzinger, D, Roth, J, Proctor, RA, Becker, K, Peters, G, Löffler, B. *Staphylococcus aureus* phenotype switching: an effective bacterial strategy to escape host immune response and establish a chronic infection. *EMBO Mol Med*. 2011; 3(3): 129–141.
12. Tande, AJ, Palraj, BR, Osmon, DR, Berbari, EF, Baddour, LM, Lohse, CM, Steckelberg, JM, Wilson, WR, Sohail, MR. Clinical presentation, risk factors, and outcomes of hematogenous prosthetic joint infection in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Am J Med*. 2016;129(2): 221.e11-20.
13. Mason, CY, Sobti, A, Goodman, AL. *Staphylococcus aureus* bacteriuria: implications and management. *JAC Antimicrob Resist*, 2023; 11;5(1):dlac123.
14. Kramer, TS, Schlosser, B, Gruhl, D, Behnke, M, Schwab, F, Gastmeier, P, Leistner, R. *Staphylococcus Aureus* Bacteriuria as a Predictor of In-Hospital Mortality in Patients with *Staphylococcus Aureus* Bacteremia. Results of a Retrospective Cohort Study. *J Clin Med*, 2020; 13;9(2):508.
15. Tong, SY, Davis, JS, Eichenberger, E, Holland, TL, Fowler, VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev*. 2015; 28:603–61.
16. Az országos tisztifőorvos módszertani levele az érkatéterrel összefüggő véráramfertőzések megelőzésére. 2019, Bell, T, O’Grady, N. Prevention of Central Line-Associated Bloodstream Infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2017; 5;31(3):551–559.
17. Vos, FJ, Kullberg, BJ, Sturm, PD, Krabbe, PF, van Dijk, AP, Wanten, GJ, Oyen, WJG, Bleeker-Rovers, CP. Metastatic infectious disease and clinical outcome in *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* species bacteremia. *Medicine*. 2012; 91:86–94.
18. Döring, M, Richter, S, Hindricks, G. The diagnosis and treatment of pacemaker-associated infection. *Dtsch Arztebl Int*. 2018; 115:445–52.
19. Fowler, VG, Justice, A, Moore, C, Benjamin, DK, Woods, CW, Campbell, S, Reller, LB, Corey, GR, Day, NPJ, Peacock, SJ. Risk factors for hematogenous complications of intravascular catheter-associated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2005; 40:695–703.
20. Horino, T, Hori, S. Metastatic infection during *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2020; 26(2):162-169.
21. Rasmussen, RV, Høst, U, Arpi, M, Hassager, C, Johansen, HK, Korup, E, Schønheyder, HC, Berning, J, Gill, S, Rosenvinge, FS, Fowler Jr, VG, Møller, JE, Skov, RL, Larsen, CT, Hansen, TF, Mard, S, Smit, J, Andersen, PS, Bruun, NE. Infective endocarditis prevalence in

patients with *Staphylococcus aureus* bacteraemia: the value of screening with echocardiography. *J Echocardiogr.* 2011; 12:414–20.

22. Waldvogel, FA, Medoff, G, Swartz, MN. Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. *N Engl J Med*, 1970; 282:198–322.

23. Oryan, A, Alidadi, S, Moshiri, A, Maffulli, N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res* 2014, 17;9(1):18.

24. Cheng, AG, DeDent, AC, Schneewind, O, Missiakas, D. A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. *Trends Microbiol*, 2011; 25;19(5):225–232.

25. Loof, TG, Morgelin, M, Johansson, L, Oehmcke, S, Olin, AI, Dickneite, G, Norrby-Teglund, A, Theopold, U, Herwald, H. Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense. *Blood*. 2011; 118:2589–2598

26. Loeb, L. The influence of certain bacteria on the coagulation of the blood. *J Med Res.* 1903; 10:407–419.

27. McAdow, M, Missiakas, DM, Schneewind, O. *Staphylococcus aureus* secretes coagulase and von Willebrand factor binding protein to modify the coagulation cascade and establish host infections. *Journal of innate immunity*. 2012; 4:141–148.

28. Friedrich, R, Panizzi P, Fuentes-Prior, P, Richter, K, Verhamme, I, Anderson, PJ, Kawabata, S, Huber, R, Bode, W, Bock, PE. Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature*. 2003; 425:535–539.

29. López-Cortés, LE, Del Toro, MD, Gálvez-Acebal, J, Bereciartua-Bastarrica, E, Fariñas, MC, Sanz-Franco, M, Natera, C, Corzo, JE, Lomas, JM, Pasquau, J, Arco, AD, Martínez, MP, Romero, A, Muniain, MA, Cueto, M, Pascual, A, Rodríguez-Baño, J. Impact of an evidence-based bundle intervention in the quality-of-care management and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2013; 57:1225–33.

30. Hagel, S, Kaasch, AJ, Weis, S, Seifert, H, Pletz, MW, Rieg, S. *Staphylococcus-aureus*-Blutstrominfektion – eine interdisziplinäre Herausforderung. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2019; 54:206–16.

31. Chapin, K, Musgnug, M. Evaluation of three rapid methods for the direct identification of *staphylococcus aureus* from positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(9):4324–7

32. Qian, Q, Eichelberger, K, Kirby, JE. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by use of the direct tube coagulase test. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(7): 2267–2269.



33. Varetas, K, Mukerjee, C, Taylor, PC. Anticoagulant carryover may influence clot formation in direct tube coagulase tests from blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(9):4613-5.
34. Thirunavukkarasu, S, Rathish, K C. Evaluation of direct tube coagulase test in diagnosing staphylococcal bacteremia. *J Clin Diagn Res.* 2014; 8(5): DC19-21.
35. Diab, M, El-Damarawy, M, Shemis, M. Rapid identification of methicillin-resistant staphylococci bacteremia among intensive care unit patients. *Medscape J Med.* 2008; 28;10(5):126.