

dc_112_10

β -laktám rezisztens Gram-negatív baktériumok vizsgálata

Doktori tézisek

Dr. Szabó Dóra

Budapest

2011

TARTALOMJEGYZÉK

1. IRODALMI HÁTTÉR	2
2. CÉLKITŰZÉSEK	2
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	4
3.1. Általános bakteriológiai módszerek	4
3.2. Biokémiai vizsgáló módszerek	4
3.3. Genetikai módszerek	5
3.4. Epidemiológiai vizsgálatok	6
3.5. Állatkísérletek	7
4. EREDMÉNYEK	8
4.1. Epidemiológiai vizsgálatok	8
4.2. ESBL enzimek újabb fenotípusos és genotípusos detektálási lehetősége	10
4.3. Új ESBL enzimek izolálása és karakterizálása	12
4.4. Az ESBL termelés és a csökkent kinolon érzékenység kapcsolata	12
4.5. Gram-negatív baktériumok karbapenem rezisztenciájának vizsgálata	13
4.6. ESBL-termelő törzsek által okozott fertőzések terápiás lehetőségei kísérletes állatmodellekben	15
5. A TÉZISEK LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI	17
6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	19
7. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK	20
7.1. A tézisek alapjául szolgáló tudományos közlemények	20
7.2. A tézisekhez nem kapcsolódó tudományos közlemények	22

1. IRODALMI HÁTTÉR

A β -laktám antibiotikumok (penicillinek, cefalosporinok, karbapenemek, monobaktámok) szerkezetében β -laktám gyűrű található. Antibakteriális hatásuk ezen gyűrű épségéhez kötött. A β -laktám antibiotikumok a baktériumsejtfal peptidoglikán vázának a felépítését gátolják több támadásponton keresztül. A velük szemben kialakult rezisztencia hátterében többféle mechanizmus állhat: β -laktamáz termelés, permeabilitás változás (külső membrán fehérje változás), target megváltozás (penicillin-kötő fehérjék megváltozása), efflux mechanizmus, illetve ezek a mechanizmusok együttesen is jelen lehetnek a baktériumban. A leggyakoribb rezisztencia mechanizmus azonban a baktériumok β -laktamáz enzim termelése. A β -laktamáz enzimek osztályozása hidrolízisuk alapján, gátlószerekkel szembeni érzékenyséjük, genetikai hátterük (kromoszomális, illetve extrakromoszomális), illetve molekuláris szerkezetük (A-D) alapján történik. A jelenleg elfogadott osztályozás a Bush-Jacoby-Medeiros féle osztályozás, mely a felsorolt szempontok alapján a β -laktamáz enzimeket 4 (1-4) nagy csoportba osztja.

A széles spektrumú cefalosporinokra kiterjedő rezisztencia a Gram-negatív baktériumok között, különös tekintettel az *Enterobacteriaceae* család tagjaira, az egész világra kiterjedő problémává vált a kiterjedt spektrumú β -laktamázok (extended-spectrum β -lactamase, ESBL-ek) és az AmpC-típusú β -laktamázok megjelenését követően. Ma már több, mint 300 különböző ESBL enzim ismert. Ezek az enzimek világszerte jelen vannak, elsősorban plazmid által kódoltak, és az *Enterobacteriaceae* család tagjai között elterjedtek, de *Pseudomonas aeruginosa* törzsekben is megfigyelték őket. Jelenleg a TEM- és SHV-típusú ESBL-ek között több, mint 300 variánst, a CTX-M ESBL-nél több, mint 65 típust és az ún. minor ESBL-ek (VEB, GES, PER, SFO-1, TLA-1, TLA-2, BES-1, BEL-1) esetében több, mint 20 félélt írtak le. Az ESBL enzimek hidrolizálják a Gram-negatív ellenes penicillin származékokat, az első, második, harmadik és negyedik generációs cefalosporinokat és a monobaktámokat. Nem képesek hidrolizálni a cephamecineket és a karbapenemeket. Aktivitásuk különböző enzim gátlószerekkel - klavulánsav, tazobaktám, szulbaktám - jól gátolható.

Az ESBL-termelő, multirezisztens *Enterobacteriaceae* törzsek terjedésével a karbapenemek váltak a Gram-negatív baktériumok okozta súlyos fertőzések antibiotikum terápiájának egyik utolsó hatékony eszközévé. Azonban a megemelkedett karbapenem használat következtében egyre gyakoribbak az e szerekkel szemben is rezisztens baktériumok. A karbapenem rezisztens nem-fermentáló Gram-negatív kórokozók (*Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*) megjelenése után, karbapenem rezisztens *Enterobacteriaceae* törzseket is izoláltak már. A legjelentősebb karbapenemázok a szerin típusú *K. pneumoniae* karbapenemase (KPC) enzimek, melyek klavulánsavval gátolhatók; illetve metallo- β -laktamázok (MBL), melyek aktivitása EDTA-val függeszthető fel. Az MBL csoport legjelentősebb tagjai a VIM-, IMP- típusú MBL-ek.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Epidemiológiai vizsgálatok

A TEM- és SHV-típusú ESBL-t termelő *Klebsiella pneumoniae* törzsek (ESBL-KP) fontos kórokozókká váltak a kórházi fertőzésekben, multirezisztenciájuk miatt, illetve mert egyre több járványt okoznak a kórházakban elsősorban a koraszülött intenzív osztályokon (PIC).

1. Célunk volt jellemezni Magyarországon az első ESBL-*K. pneumoniae* törzsek által okozott járványt molekuláris epidemiológiai szempontból.
2. Célunk volt továbbá egy ötéves követéses molekuláris epidemiológiai vizsgálat során meghatározni az ESBL-termelő *Klebsiella* fajok molekuláris epidemiológiáját

a Semmelweis Egyetem II. PIC-en. Egyidejűleg, retrospektív módon vizsgálni a fertőzések rizikófaktorait és a mortalitást is.

ESBL enzimek újabb fenotípusos és genotípusos detektálási lehetősége

A Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) és az European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) által meghatározott ESBL fenotípusos szűrővizsgálatok csak *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli* és *Proteus mirabilis* törzsekre tartalmaznak ajánlásokat. A kromoszómális AmpC-típusú β -laktamáz termelő törzsek ESBL termelésének kimutatására azonban még nincsenek ajánlások.

3. Vizsgálni kívántuk, hogy kromoszómális AmpC-típusú β -laktamázt is termelő *Enterobacter cloacae* törzsekben, milyen módon tudjuk detektálni a párhuzamos ESBL termelést, ha a hagyományos tesztek a kromoszómális β -laktamáz enzim jelenléte miatt nem értékelhetők.

A Gram-negatív baktériumok gyakran többféle β -laktamáz enzimet termelnek. Abban az esetben, ha egy baktérium több, azonos csoportba és azonos izoelektromos ponttal rendelkező β -laktamáz enzimet termel, azoknak a detektálása különös gondot okoz.

4. Célunk volt azonos típusba tartozó többféle β -laktamáz enzimek genotípusos azonosítására megfelelő módszer kidolgozása.

Új ESBL enzimek izolálása és karakterizálása

Az antibiotikumok szelekciós hatása következtében egyre több és újabb ESBL variánsok kerülnek izolálásra.

5. Célunk volt új TEM-, SHV-, CTX-M típusú ESBL változatok leírása, jellemzése.
6. Továbbá megpróbáltuk jellemezni az újonnan leírt TEM-131 és SHV-30 enzimet szubsztrátprofiljuk és a megfigyelhető mutációk hatása alapján.

ESBL termelés és a csökkent kinolon érzékenység kapcsolata

Annak ellenére, hogy a kinolon rezisztencia általában kromoszómán kódolt, világszerte emelkedik a ciprofloxacin rezisztens ESBL-termelő törzsek aránya. Az utóbbi években több plazmidon kódolt kinolon rezisztencia gént (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* és *aac(6')-Ib-cr*) írtak le.

7. Vizsgálatunk célja volt a *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* és *aac(6')-Ib-cr* gének prevalenciájának meghatározása magyarországi ESBL-termelő izolátumok között, illetve a *qnr* gének mobilitásának vizsgálata.

Gram-negatív baktériumok karbapenem rezisztenciájának vizsgálata

A karbapenem rezisztenciáért elsősorban a baktériumok karbapenemáz termelése felelős, de egyéb mechanizmusok is szerepet játszhatnak.

8. Vizsgálni kívántuk egy a terápia során ertapenem-rezisztenssé vált *E. cloacae* klinikai izolátum antibiotikum rezisztencia-mechanizmusait.
9. Vizsgáltuk egy ertapenem rezisztens *K. pneumoniae* és egy szintén ertapenem rezisztens *K. oxytoca* antibiotikum rezisztencia mechanizmusait.
10. Szintén tisztázni kívántuk egy korábban külföldön kezelt betegből izolált karbapenem rezisztens *P. aeruginosa* és *Acinetobacter baumannii* törzsek rezisztencia viszonyait is.

ESBL-termelő törzsek által okozott fertőzések terápiás lehetőségei kísérletes állatmodellekben

Az ESBL-termelő törzsek gyakran rezisztensek más antibiotikumokkal - aminoglikozidokkal, tetracyclinnel és trimethoprim/sulphametoxazollal - szemben is az azonos plazmidon

elhelyezkedő rezisztencia gének miatt. A keresztrezisztencia miatt az ESBL-termelő törzsek által okozott fertőzések esetén a terápiás lehetőségek korlátozottak.

11. Célunk az volt, hogy összehasonlítsuk az amikacin, a cefepim, az amikacin-cefepim és az imipenem hatását SHV-5 ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzzsel fertőzött szeptikus egerekben, magas kezdeti csíraszám alkalmazásával.
12. Célunk volt továbbá, hogy meghatározzuk és összehasonlítsuk a ciprofloxacín és a levofloxacín aktivitását is az SHV-5 ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzs ellen *in vitro* és *in vivo*.
13. Célunk volt egy új antibakteriális aktivitással is bíró peptid, az A3-APO, hatását összehasonlítani az imipenemmel ESBL-termelő *E. coli* törzzsel fertőzött szeptikus egerekben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Általános bakteriológiai módszerek

Baktériumtörzsek azonosítása, tárolása

A baktériumtörzsek biokémiai azonosítása a rendelkezésre álló identifikáló rendszerekkel, automatákkal történtek: ATB-teszt, API 20E, VITEK II, VITEK III. A baktérium törzseket 20 % glicerint tartalmazó Tryptic Soy Brothban (TSB) tároltuk -80°C-on. Tekintve, hogy munkánk során nagyszámú törzset használtunk, jelölésüket, forrásukat és releváns tulajdonságaikat a kísérletek jobb megértése okán azok leírásánál adjuk meg.

Antibiotikum érzékenység meghatározása

Az antibiotikum érzékenység meghatározása egyrészt korongdiffúziós módszerrel történt, illetve a minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározásával. MIC értékeket az antibiotikumokat meghatározott koncentrációgradiensben tartalmazó E-teszt csíkokkal, a gyártó előírásainak megfelelően alkalmazva (AB Biodisk, Solna, Svédország) határoztuk meg, illetve bizonyos esetekben mikrodilúciós módszerrel. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat a Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS) aktuális évi, érvényben lévő nemzetközi ajánlásai alapján végeztük. A vizsgálatok kivitelezése az ajánlásoknak megfelelően kontrolltörzsekkel ellenőrzött táptalajokon, nemzetközi standardoknak megfelelő körülmények között történtek.

A β -laktamáz enzim termelés detektálása antibiotikum érzékenység meghatározása alapján

Az indukálható, részlegesen derepresszált vagy derepresszált AmpC-termelés meghatározására a cefoxitin-cefotaxim antagonizmus-tesztet alkalmaztuk. Az ESBL termelés fenotípusos szűrését, illetve az ESBL termelés megerősítését a CLSI nemzetközi ajánlása alapján végeztük. A karbapenemáz termelés szűrését módosított Hodge-tesztrel végeztük el. Az MBL termelés fenotípusos szűrését, illetve az MBL termelés megerősítését szintén a CLSI nemzetközi ajánlása alapján végeztük.

3.2. Biokémiai vizsgáló módszerek

Analitikai és preparatív izoelektromos fókuszálás

Az analitikai izoelektromos fókuszáláshoz a baktériumokból a β -laktamáz enzimet lysozimes feltárással nyertük ki. A teljes sejtek és a sejttermék centrifugálással történő eltávolítása után a felülúszót használtuk az izoelektromos pont (pI) meghatározására. Az elektroforézishez előre elkészített pH 3-10 poliakrilamid géleket (BioRad) alkalmaztunk. A preparatív

izoelektromos fókuszáláshoz a baktériumokból a β -laktamáz enzimet Lin módszerével nyertük ki. A fehérjekoncentrációkat a Bio-Rad Protein Assay (BioRad) révén határoztuk meg, marha szérum albumin (BSA) standard alkalmazásával.

Enzimkinetikai vizsgálatok

Az SHV-30 β -laktamáz steady-state kinetikai paramétereit spektrofotométerrel határoztuk meg. A méréseket nitrocefinnel, cefotaximmal és cefepimmal végeztük el. A kinetikai paraméterek ($v_{\max}$ és K_M) meghatározását az adatok Michaelis-Menten egyenletbe történő illesztésével végeztük a nemlineáris legkisebb négyzetek elve szerint.

Enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat (ELISA) SHV β -laktamáz kimutatására

Az immunoassay lemezeket egy éjszakára 4 $\mu\text{g/ml}$ tisztított SHV-1 antitestet tartalmazó karbonát-pufferrel (pH 9,5) vontuk be. A standard 0,1 % BSA-ban 0,0015-100 ng/ml koncentrációra oldott tisztított SHV-1 volt. A minták egy éjszakán át növesztett baktériumtenyészetekből származó 100 μl -es aliquotok voltak, amelyeket 10 percig forraltunk és sorozatban hígítottuk. Jelölő anyagként streptavidin-tormaperoxidázt használtunk. Az OD₄₉₂ értékeket ELISA lemezolvasó segítségével kaptuk meg, és összehasonlítottuk a sorozathígítású, tisztított SHV-1 β -laktamázzal, amelyet belső referenciapontként használtunk.

Külső membrán fehérjék izolálása és kimutatása

A külső membrán fehérjék izolálása során a baktériumsejtek ultrahangos feltárását követően, a kapott fehérjéket sarkozilos kezelésnek vetettük alá. A különböző fehérjefrakciók centrifugálással történő szétválasztása után a külső membrán fehérjéket 11%-os tömörítő és 20%-os futtató SDS-PAGE géleken határoztuk meg. A géleket Coomassie Brilliant Blue R250-el festettük, hogy a fehérjéket láthatóvá tegyük.

3.3. Genetikai módszerek

Plazmid kimutatás, izolálás

A plazmidok rutinszerű kimutatásához az alkalikus lízis módszert használtuk, azonban néhány esetben a plazmidokat plazmid extrakciós kit segítségével nyertük ki (Wizard Plus Minipreps, DNA Purification System; Promega). A restrikciós enzimmal történő emésztés során az enzimeket - *EcoRI*, *HindIII* - a gyártó (BioLab) előírásainak megfelelően használtuk.

Transzformáció, konjugáció

A transzformáció során a baktérium törzsek extrahált plazmid DNS-ét *E. coli* DH5-alfa sejtekbe, illetve *E. coli* DH10B recipiens sejtekbe transzformáltuk. A transzformált baktériumokat a szelektáló antibiotikumot tartalmazó tápagon tenyésztettük. A konjugáció során recipiensként azid-rezisztens vagy rifampicin-rezisztens *E. coli* J53 törzset használtunk.

Pulzáló mezejű gélelektroforézis

A pulzáló mezejű gélelektroforézist (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) a Centers for Disease Control and Prevention PulseNet protokolljának megfelelően végeztük. A dendrogramokat Molecular Analyst (Bio-Rad) segítségével készítettük el, a Dice-együttható alkalmazásával, nem súlyozott pár csoport módszerrel (UPGMA), 1,3 %-os pozíció toleranciával.

Polimeráz láncreakció (PCR)

Az egy éjszakán át tenyésztett vizsgálandó izolátum 10 μl -es aliquotját vízzel 10-szeresére hígítottuk és 15 percig forraltuk, majd lecentrifugáltuk. A keletkezett felülúszót használtuk

bakteriális templát DNS-ként a PCR során. A PCR-eket RedTaq DNS-polimerázzal végeztük és különböző génekre specifikus megfelelő primereket használtunk. A PCR-terméket tartalmazó reakcióelegy 10 µl-ét elektroforézissel vizsgáltuk 0,8 w/v %-os gélben.

Klónozás

Az amplifikált *bla_{SHV}* termékeket klónoztuk a gyártó előírásai szerint egy pCR-XL-TOPO vektorba, amely egy kanamycin-rezisztencia determinánst kódolt.

Mutagenézis

A PCR-alapú site-directed mutagenesist a Stratagene QuikChange mutagenesis kit segítségével végeztük. Két komplementer oligonukleotidot állítottunk elő az SHV-1 β-laktamázban található 43-as és 238-as aminosavnak megfelelő helyen és site-directed mutagenesist hajtottunk végre. A mutagenézisnek alávetett DNS-t tartalmazó transzformált *E. coli* DH10B telepeket 20 mg/l kloramfenikolt tartalmazó Luria-Bertani (LB) agarra szélesztettük és a telepeket szűrtük a kívánt mutációkra.

DNS-szekvenálás

Az amplifikált termékeket ABI 4500 és ABI 3100 genetikai analizátorok segítségével szekvenáltuk a gyártó előírásai szerint. A szekvenáló reakciókat a különböző génekre specifikus megfelelő primerekkel végeztük, amelyeket az előzetes amplifikáció során is használtunk. A szekvencia-analízist a Lasergene DNASTAR szekvencia-analízis szoftverrel (DNASTar) végeztük. Minden génszekvencia azonosítása a GénBank és EMBL adatbázisokban elérhető szekvenciákkal összehasonlításban történt.

Real-time polimeráz láncreakció „single” nukleotid polimorfizmus (real-time PCR SNP)

A *bla_{SHV}* „single” nukleotid polimorfizmusainak detektálására az 5'-nukleáz assay-t alkalmaztuk. Két, csak egyetlen nukleotidban különböző oligonukleotidokból álló fluoreszcens próbát használtunk, melyeknek mindkét végen volt jelzőfesték (6-karboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaklorofluoreszcein [HEX] vagy 6-karboxi-fluoreszcein [FAM] és egy csillapító festék (6-karboxi-tetrametilrodamin [TAMRA]). A real-time PCR allél megkülönböztető assay-eket a Primer Express szoftverrel (Applied Biosystems) terveztünk. A real-time fluoreszcencia detektálását minden egyes ciklus 60 °C-os, hibridizációs-szintetikus szakaszában végeztük. ABI allélmegkülönböztető szoftvert alkalmaztunk a genotípusok ábrázolására, amely két-paraméteres ábrázoláson alapult a FAM és a HEX intenzitását használva 40 cikluson át.

Valósídejű reverz transzkriptáz PCR

Valósídejű reverz transzkriptáz PCR-t (RT-PCR) végeztünk az *ompD* és *ompF* porin gének és az *acrB* efflux pumpa génnek a *rpoB* housekeeping génhez viszonyított relatív expressziójának meghatározása céljából. A baktériumokból nyert RNS felhasználásával reverz transzkripció révén egyszálú cDNS-t készítettünk, melyek mennyiségét valósídejű PCR-amplifikációval határoztuk meg, a külső membránfehérjék (OMP) és az efflux pumpa génekre specifikus primereket alkalmazva. Az expressziós szinteket minden izolátum esetén az *rpoB* (housekeeping gén) transzkripció szintjéhez viszonyítva standardizáltuk. Az *ompD*, *ompF* és *acrB* gének expressziójában bekövetkező relatív változásokat a referencia és a célpont hányadosaként számítottuk ki a $2^{-\Delta\Delta C_T}$ módszer segítségével, ahol C_T a ciklusküszöb.

3.4. Epidemiológiai vizsgálatok

Epidemiológiai fogalmak

Azokat az eseteket vizsgáltuk, amikor az ESBL-termelés genotipizálással és izoelektromos fókuszálással megerősítésre került. Az izolátumok ismétlődése akkor merült fel, ha

ugyanabból a betegből kerültek kitenyésztésre és genotipizálással nem voltak megkülönböztethetők a korábbi izolátumoktól. Fertőzésnek tekintettük azt az esetet, ha a beteg fertőzés jelét vagy tünetét mutatta és a véréből, vizeletéből, liquorából, bronchoalveolaris lavage-ából vagy bármilyen egyéb fiziológiásan steril testfolyadékából *Klebsiella spp.* volt izolálható. Kolonizációnak tekintettük azt az esetet, ha *Klebsiella spp.* volt izolálható a betegből, de a beteg nem mutatta a fertőzés klinikai jeleit vagy tüneteit.

A kórtörténetek áttekintése

A *Klebsiella*-fertőzéseket retrospektív módon elemeztük a kórtörténetek áttekintésével. A demográfiai és klinikai adatokat minden egyes újszülöttre vonatkozóan összegyűjtöttük, beleértve a szülés módját, az egyedüli vagy ikerterhességet, a nemet, a kort, a születési súlyt, a más mikrobák által okozott koinfekciók jelenlétét, a gépi lélegeztetést és a fertőzés kimenetelét.

3.5. Állatkísérletek

Állatmodell

Minden kísérletben 30-35 g tömegű CD-1 egereket használtunk. Az egereket 10^7 CFU/gr SHV-5-termelő *K. pneumoniae* törzzsel fertőztük intraperitoneálisan (i.p.). Az állatokat a Laboratóriumi Állatok Gondozása és Alkalmazása Irányelveinek megfelelően tartottuk, a kísérleteket pedig a Semmelweis Egyetem (Budapest) Állatgondozási Bizottsága hagyta jóvá minden esetben.

Antibiotikum kezelés

A kezelés 3 órával a fertőzés után kezdődött és 24 óráig tartott. Két dózis amikacint (7,5 mg/kg 10,5 óránként), három dózis cefepimet (80 mg/kg 7 óránként), a monoterápiával megegyező dózisú amikacin-cefepimet ill. négy dózis imipenemet (40 mg/kg 5,25 óránként) adtunk i.p.. A cisplatint (18 mg/ttkg) szintén i.p. injekcióval adtunk be a fertőzés előtt 3 nappal, a veseműködés leállítására céljából az imipenemmel, cefepimmal illetve amikacinnal kezelt csoportokban. 20 mg/kg ciprofloxacint és 50 mg/kg levofloxacint adtunk i.p. minden 6 órában 24 óráig.

Antibiotikum szérumszintek meghatározása egerekben

Véletlenszerűen kiválasztott CD-1 egereket (30-35 g) használtunk az antibiotikumok szérumszintjének a meghatározásához. Az egyszeri amikacin (7,5 mg/kg), cefepim (80 mg/kg), imipenem (40 mg/kg), ciprofloxacint (20 mg/kg) és levofloxacint (50 mg/kg) dózist intraperitoneálisan adtuk. Vérmintákat a beadás után 15 és 30 perccel ill. 1,2 és 3 órával vettünk. Az imipenem és cefepim szérumszinteket papírkorongos módszerrel, az amikacin szérumszinteket fluoreszcens polarizációs immunassay-vel és a ciprofloxacint és levofloxacint szérumszinteket magas nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) határoztuk meg. A farmakokinetikai féleletidő-értékeket ($T_{1/2}$), a csúskoncentrációt (C_{max}), a C_{max} első megjelenését (T_{max}), a végtelenbe extrapolált koncentráció-idő görbe alatti területet (AUC) és a koncentráció-idő görbe 0-24 óra közötti görbe alatti területét (AUC_{0-24}) a nonkompartmentalissal módszerrel számítottuk ki.

Baktérium csíraszám meghatározása az egerek vérében

Vért vettünk az egerektől a fertőzés után különböző időpontokban. A sorozathígítások után a mintákat kvantitatív módon tenyésztettük MH agar lemezekre. Egy éjszakán át 37 °C-on történő inkubáció után az élő baktériumokat megszámoltuk és $\log_{10}$ CFU/ml vér középértékben fejeztük ki. A baktériumnövekedés elmaradása esetén a kimutathatóság

határát, azaz 300 CFU/ml-t helyettesítettünk be. A számításokat SPSS 7.5 program segítségével végeztük el.

Túlélési elemzés

Az utánkövetés a túlélés megfigyelésével történt, az elhullást tekintettük végpontnak. A Kruskal-Wallis tesztet követően Mann-Whitney U-tesztet alkalmaztunk statisztikai elemzésre, $P < 0,05$ értéket tekintve szignifikánsnak. A kezelési időszakot a kumulatív valószínűség megbecsülése alapján határoztuk meg a Kaplan-Meier túlélési görbe használatával. A $P < 0,05$ értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak. A túlélést 24, 48 óra és 1 hét után vizsgáltuk a letalitás kiszámításához, a 24 órás túlélést pedig a kumulatív valószínűség megbecsülésével állapítottuk meg a Kaplan-Meier túlélési görbe felhasználásával. A csoportok közötti relatív kockázatot a hazard hányados segítségével becsültük meg (megfelelő 95 %-os konfidencia-intervallummal) a megfigyelt és a számított elhullás összehasonlításával. A log sor tesztet használtuk a statisztikai elemzéshez, a $P < 0,05$ értéket fogadva el szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Epidemiológiai vizsgálatok

Az első magyarországi ESBL-termelő K. pneumoniae törzsek által okozott esethalmozódás molekuláris epidemiológiai jellemzése

Magyarországon az első dokumentált ESBL járvány során az első ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzset 1998. június 30-án észlelték egy szolnoki kórház perinatális intenzív osztályán (PIC). A retrospektív vizsgálat 1997. január 1-ig nem mutatott ki multirezisztens *K. pneumoniae* izolátumot a PIC anyagában, azonban az első észlelést követően 1998. novemberéig további 14 primer és öt ismételt ESBL-termelő izolátumot detektáltak. Augusztusban ESBL-termelő *S. marcescens* bukkant fel egy 1 héttel korábban ESBL-termelő *K. pneumoniae*-vel kolonizált koraszülöttnél, továbbá egy ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzset izoláltak a fürdőszappanból. Az összes törzs ESBL termelését izoelektromos fókuszálással és PCR vizsgálattal konfirmáltuk. Az összes ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzs kétféle kromoszóma mintázatot mutatott AP-PCR módszerrel ERIC-2 primert használva. Az 1-14 klinikai ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumok és a környezeti törzs A1 mintával rendelkezett, a 15-ös ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátum A2 mintát mutatott. A tizennégy ESBL-termelő *K. pneumoniae* klinikai izolátum (az 1-14 izolátumok), a környezeti ESBL-termelő *K. pneumoniae* és a *S. marcescens* izolátum azonos rezisztencia-mintázattal rendelkezett, míg a 15. ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumé eltérő volt; a cefepimre, cefpiromra, trimetoprim/sulfamethoxazolra és a tetracyclinre vonatkozó MIC értéke sokkal alacsonyabb volt, mint a többi törzsé. A plazmid elemzés alapján az összes primer klinikai törzs, a környezeti ESBL-termelő *K. pneumoniae* és a *S. marcescens* törzs egyetlen nagy plazmiddal rendelkezett és a 1-14 klinikai ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátum, a környezeti ESBL-termelő *K. pneumoniae* és a *S. marcescens* izolátum azonos restriktációs plazmid DNS profillal rendelkezett, ami megerősítette, hogy a törzsek ugyanazt a plazmidot hordozzák. Az SHV-t kódoló gén jelenlétét a plazmidon mindegyik esetben megerősítettük. Az 1-14 ESBL-KP izolátumok ESBL-kódoló plazmidja átvihető volt az *E. coli* J53-2 Rif^r törzsbe konjugáció révén és az *E. coli* DH5- α -ba transzformációval. A Tfl1-Tfl4 transzformált *E. coli* MIC értékei kissé alacsonyabbak voltak, mint a donor törzseké, de a β -laktám rezisztencia mintázata az ESBL-termeléssel azonos volt a donor törzsekével. A transzformált törzsek szintén rezisztenssé váltak gentamicinre, tobramycinre, netilmicinre és

trimethoprim/sulfamethoxazolra, ami arra utalt, hogy az ezekre az antibiotikumokra vonatkozó rezisztenciát kódoló gének ugyanazon a plazmidon helyezkedtek el, mint az SHV-gén.

ESBL-termelő *Klebsiella* spp. öt éves követéses molekuláris epidemiológiai vizsgálatának eredménye a Semmelweis Egyetem II. Perinatális Intenzív Centrumában

Az SE II. Perinatális Intenzív Centrumából (PIC) 2001. január és 2005. decembere között összesen 101 *Klebsiella* törzset izoláltunk újszülöttekből (egy beteg—egy izolátum). Az ESBL-termelő *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* törzseket két időszakban izoláltuk, két éves időközönsséggel. Az első időszakban (2001. januártól 2003. júniusig) 25 ESBL-termelő *K. pneumoniae* és 9 ESBL-termelő *K. oxytoca* törzset izoláltunk, a második időszakban (2005. júniustól decemberig) 12 ESBL-termelő *K. oxytoca* törzset került izolálásra különböző betegekből. Noha a törzsek két különböző időszakból származtak igen hasonló érzékenységi profillal rendelkeztek. Az ESBL-termelő *Klebsiella* spp. által termelt β -laktamáz enzimek, azok izoelektromos pontja és plazmid analízisük eredménye az 1. táblázatban látható.

1. táblázat A I. PIC-en izolált *Klebsiella* törzsek jellemzői

Törzsek	Izolálás ideje	Fertőzött betegek száma	Kolonizált betegek száma	PFGE	Izoelektromos pont (pI)	PCR és szekvenálási eredmények	Plazmidok
<i>K. pneumoniae</i>	2001 február és 2002 április között	14	2	A	8.2	SHV-5	P1
<i>K. pneumoniae</i>	2002 május és október között	7	0	B	8.2	SHV-5	P1
<i>K. oxytoca</i>	2002 augusztus és 2003 január között	7	0	C	5.4, 7.6, 8.2	TEM-1, SHV-12	P2
<i>K. oxytoca</i>	2003 január	2	0	D	5.4, 8.2	TEM-1, SHV-12	P3
<i>K. pneumoniae</i>	2004 január	2	0	E	8.2	SHV-5	P4
<i>K. oxytoca</i>	2005 július és november között	7	5	F	7.6, 8.2	SHV-5	P5

A 2001. február és 2003. január között izolált ESBL-termelő *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* törzsek további vizsgálata három különböző PFGE-mintázatú SHV-5 termelő *K. pneumoniae* (A, B, E) és két különböző mintázatú SHV-12 termelő *K. oxytoca* (C, D) izolátumot derített fel, melyeknek plazmidprofilja is eltérő volt (1. táblázat). 2005. július és november között egy újabb PFGE típusba tartozó (F) SHV-5 termelő *K. oxytoca* törzs jelent meg. Az ESBL-termelő törzsek molekuláris epidemiológiai vizsgálata során a PIC-en nem egy domináns törzs jelenlétét, hanem több domináns törzs jelentős időbeli változását észleltük.

2001. január és 2005. december között 46 újszülöttről izoláltunk ESBL-termelő *Klebsiella* törzseket, 55 újszülöttről pedig nem ESBL-termelő *Klebsiella* törzseket. A klinikai tünetek alapján ESBL-termelő *K. pneumoniae* okozta fertőzéseket állapítottunk meg 23 újszülöttnél, 2 esetben pedig kolonizációt. ESBL-termelő *K. oxytoca* fertőzést 16 újszülöttnél állapítottunk meg, kolonizációt öt esetben. 37 újszülöttnél volt nem ESBL-termelő *K. pneumoniae* és nyolcnak nem ESBL-termelő *K. oxytoca* okozta fertőzése, 10 esetben pedig nem ESBL-termelő *Klebsiella* törzsekkel való kolonizációt tapasztaltunk. A vizsgált kockázati tényezők tekintetében - nem, gesztációs idő, ikerterhesség, születési súly, centrális vénás katéter, gépi lélegeztetés, mesterséges táplálás, polimikrobás fertőzés, császármetszés, transzfúzió—nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget az előbb részletezett csoportoknak megfelelően az ESBL-termelő és a nem ESBL-termelő *Klebsiella* spp. között. Ugyan a nem ESBL-termelő *Klebsiella* fajokkal fertőzött betegek esetében nagyobb volt a túlélési arány (mortalitási arány: 2/45, 4,4%), mint az ESBL-termelő *Klebsiella* fajokkal fertőzötteknél (mortalitási arány: 6/39, 15%), ez a különbség szintén nem volt statisztikailag szignifikáns.

4.2. ESBL enzimek újabb fenotípusos és genotípusos detektálási lehetősége

ESBL enzimek fenotípusos detektálási lehetősége Enterobacter cloacae törzsekben

2003. március és 2004. július között a Pittsburgh-i Egyetem Orvosi Központjában (UPMC) izolált 45 hemokultúrából származó *E. cloacae* törzseket vizsgáltunk. Az *E. cloacae* izolátumok harmada (15) SHV-típusú ESBL-t - SHV-2, -5, -7, -12, -14, és -30-t is termelt az AmpC-típusú β -laktamázok túltermelése mellett. Az ESBL-termelők döntő része (11/15) TEM-1 β -laktamázt is termelt. Az *E. cloacae*-re vonatkozó CLSI ESBL-szűrési korongdiffúziós kritériumokat alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy 23 izolátum esetén kaptunk

2. táblázat A cefepim ESBL-termelés indikátoraként történő alkalmazása

	Kategóriák (No. izolátumok)		Szenzitivitás	Specifititás
	ESBL	nem-ESBL		
Korong-diffúziós szűrőteszt*				
pozitív	13	0	0.87	1
negatív	2	30		
Korong-diffúziós megerősítő teszt**				
pozitív	11	0	0.73	1
negatív	4	30		
Kettős-korong diffúziós teszt 20 mm				
pozitív	13	0	0.87	1
negatív	2	30		
Kettős-korong diffúziós teszt 30 mm				
pozitív	8	0	0.53	1
negatív	7	30		
Érzékenység alapján szűrőteszt (MIC)***				
pozitív	14	0	0.93	1
negatív	1	30		
Érzékenység alapján megerősítő teszt (MIC)****				
pozitív	8	0	0.53	1
negatív	7	30		

* <27 mm indikálhatja az ESBL termelést a vizsgálatban

** >5 mm növekedés a gátlási zóna átmérőjében klavulánsav hatására

*** A cefepim breakpointja 1 $\mu\text{g/ml}$ volt a vizsgálat során

**** A MIC érték > 3 koncentráció csökkenése klavulánsav jelenlétében

xim korongot használtunk, ritkán voltak pozitívnak. A cefepim érzékenységi eredményeknek az ESBL-termelés markereként történő alkalmazása jóval hasznosabbnak bizonyult (2. táblázat). Mind a 13 izolátum, melynek cefepim MIC-e 2 $\mu\text{g/ml}$ vagy nagyobb volt, ESBL-termelőnek mutatkozott és 15/18 (83 %) izolátum, melynek cefepim MIC-e > 0,25 $\mu\text{g/ml}$ volt, bizonyult ESBL-termelőnek. A cefepim-klavulánsavas megerősítő teszt csak 73 %-ban volt szenzitív korong-diffúzió esetén és 53%-ban ≥ 3 MIC csökkenés esetén (2. táblázat). Kettő kivételével az összes ESBL-termelő *E. cloacae* törzs, de egyetlen nem ESBL termelő törzs sem rendelkezett ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ -es MIC-értékkel. Az ESBL-termelő törzsek cefepimre vonatkozó MIC-értéke 64 $\mu\text{g/ml}$ volt, míg a nem ESBL-termelők esetén 0,5 $\mu\text{g/ml}$. A CLSI cefepimre vonatkozó jelenlegi határértékei alapján az ESBL-termelő törzsek kétharmadát (10/15) lehetett volna cefepimre érzékenynek tekinteni.

ESBL enzimek újabb genotípusos detektálási lehetősége

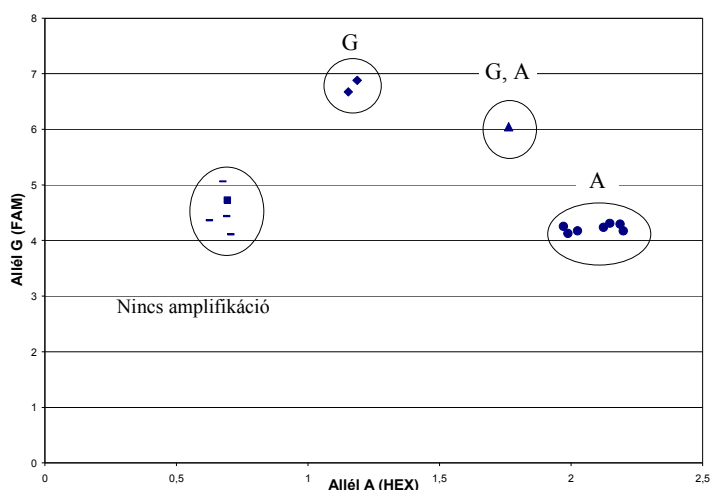
A real-time PCR SNP vizsgálatot dolgoztunk ki, hogy az SHV fehérje 240-es helyén található aminosavat érintő GAA (glutamát) és AAA (lizin) mutációkat detektálni tudjuk. A vizsgálatot a következő törzseken állítottuk be (3. táblázat): SHV-7 és SHV-30-termelő *E. cloacae* ES24;

„pozitív” eredményt, de ezek közül 9 izolátum nem volt ESBL-termelő (2. táblázat). A megerősítő eredmények pozitívak voltak 7/15 ESBL-termelő törzs esetén, de a nem ESBL-termelők esetén nem. A CLSI ESBL-szűrési MIC-kritériumok hasonló eredményekhez vezettek (2. táblázat), noha a megerősítő tesztek csak 2/15 ESBL-termelő törzs esetén voltak pozitívak. A szokványos kettős korongdiffúziós tesztek, melyeknél ceftazidim és cefota-

3. táblázat Az SHV-termelő izolátumok SHV szekvenciának összehasonlítása

SHV gén	Izolátumok száma	Eredet	SHV enzim szekvenciája (692.-711. nucleotid)	Allél diszkrimináció
SHV-30	1	Transzformáns <i>E. coli</i>	CC GGA GCT AGC G AA CGG GGT	Allél G
SHV-14	1	Klinikai <i>E. cloacae</i> izolátum	CC GGA GCT G GC G AA CGG GGT	Allél G
SHV-7, SHV-30	1	<i>E. cloacae</i> ES24	CC GGA GCT AGC K AA CGG GGT	Allél G,A
SHV-5	2	Klinikai <i>E. cloacae</i> izolátum	CC GGA GCT AGC A AA CGG GGT	Allél A
SHV-7	5	Klinikai <i>E. cloacae</i> izolátum	CC GGA GCT AGC A AA CGG GGT	Allél A
SHV-18	1	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	CC GGA GCT G C C A AA CGG GGT	Nem meghatározott
SHV-29	1	KPC-1 termelő <i>K. pneumoniae</i>	CC GGA GCT G C C G AA CGG GGT	Nem meghatározott

SHV-30-termelő plazmid-transzformált *E. coli* EP-MAX10B; SHV-18 termelő *K. pneumoniae* ATCC 700603; SHV-29-termelő KPC-1 termelő *K. pneumoniae*; *E. coli* EP-MAX10B; AmpC β -laktamáz termelő klinikai *E. cloacae*; SHV-5 és AmpC β -laktamáz termelő klinikai *E. cloacae*; SHV-7 és AmpC β -laktamáz termelő klinikai *E. cloacae*; SHV-14 és AmpC β -laktamáz termelő klinikai *E. cloacae*. Az SHV enzim 692 és 711 nukleotid pozíciójára tervezett próba egyik festék fluoreszcencia jelének (FAM fluoreszcencia a G allélra és HEX fluoreszcencia az A allélra) a másikhoz viszonyított fokozódása a G és az A allélek



1. ábra Allél diszkrimináció. ♦ SHV-30-termelő *E. coli* HB10B transzformáns, SHV-14-termelő *E. cloacae* törzs, ■ *E. cloacae* ES24, ● egy SHV-5-termelő és hét SHV-7-termelő *E. cloacae* törzs, – SHV-18-termelő *K. pneumoniae* ATCC700603, SHV-29-termelő KPC-1 törzs, *E. coli* DH10B, kromoszómális béta-laktamáz termelő *E. cloacae* törzs, ■ víz

homozigotáságára utalt a 703-as nukleotid pozícióban adott PCR allélra vonatkozóan. Mindkét jel növekedése heterozigotáságra utalt. Az eredmények az 1. ábrán láthatóak. Az *E. cloacae* ES24 izolátum jelentős emelkedést mutatott mind a FAM, mind a HEX festék fluoreszcenciájában. Az SHV-30 termelő plazmid-transzformált *E. coli* EP-MAX10B és az SHV-14 termelő klinikai *E. cloacae* izolátumok emelkedett FAM és változatlan HEX fluoreszcenciát mutattak, ami a FAM-specifikus G allélra vonatkozó homozigotáságra utal.

Csak a G volt jelent a 703-as

pozícióban (3. táblázat). Mindazonáltal az SHV-14 termelő *E. cloacae* izolátumok a 700-as helyzetű nukleotidban különbséget mutattak a próbához képest (3. táblázat). A két SHV-5 és az öt SHV-7 termelő klinikai *E. cloacae* izolátum csak a HEX festék fluoreszcenciájában mutatott emelkedést, ami a specifikus A allél jelenlétére utal a 703-as helyen (1. ábra). Az SHV-18 termelő *K. pneumoniae* ATCC 700603 izolátum és az SHV-29 termelő KPC-1 izolátum nem mutatott változást sem a FAM, sem a HEX fluoreszcenciájában (1. ábra). A szekvenálási eredmények alapján az SHV-18 termelő *K. pneumoniae* ATCC 700603 izolátumban a 703-mas helyen A, míg az SHV-29 termelő KPC-1 izolátumban G volt jelen; ennek ellenére nem volt növekedés az A allélra jellemző HEX, sem a G allélra jellemző FAM fluoreszcenciájában. Ennek az az oka, hogy mindkét izolátumban a 700-as és a 701-es helyen is eltérés volt a nukleotidszekvenciában a próbához képest (3. táblázat), aminek következtében a specifikus próba nem kötődött a DNS-hez. A *E. coli* EP-MAX10B és a kromoszómális AmpC β -laktamáz termelő *E. cloacae* izolátum esetén nem volt változás a fluoreszcencia intenzitásában sem a FAM, sem a HEX esetében (1. ábra), mivel nem tartalmazták a *bla*_{SHV} gént.

4.3. Új ESBL enzimek izolálása és karakterizálása

Új ESBL enzimek izolálása

Különböző vizsgálataink során több új ESBL enzimet sikerült azonosítanunk, melyek GénBank azonosítóval is rendelkeznek: a TEM-131-t (AY436361) *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *typhimurium*-ból; az SHV-30-t (AY661885) *E. cloacae*-ből izoláltuk, és *K. pneumoniae*-ből a CTX-M-59-t (DQ408762) és SHV-85-t (DQ322460). Ezek közül két enzimet, a TEM-131-t és az SHV-30-t vizsgáltuk meg részletesebben.

A TEM-131 és SHV-30 karakterizálása

A TEM-131 szekvenciájának aminosav-szubsztitúciói a TEM-1 β -laktamáz szekvenciájával összehasonlítva a Leu21Phe, Glu104Lys, Arg164Ser, Met182Thr és Ala237Thr voltak. A TEM-131 termelő transzformált törzsek a TEM-63 (Leu21Phe, Glu104Lys, Arg164Ser, Met182Thr) termelő transzformált törzsekhez képest kissé magasabb cefotaxim MIC értékkel rendelkeztek. Az emelkedett cefotaxim MIC értékekért az Ala237Thr szubsztitúció volt a felelős.

Az SHV-30 szekvenciájának aminosav szubsztitúciói az SHV-1 β -laktamáz szekvenciájával összehasonlítva Ile8Phe, Arg43Ser, Glu238Ser. Az SHV-30 β -laktamáz ceftazidimre (MIC = 16 μ g/ml), cefotaximra (MIC = 16 μ g/ml) és cefepimre (MIC = 2 μ g/ml) kiterjedő rezisztenciát okoz, az SHV-1-gyel összehasonlítva. Az SHV-30 β -laktamáz cefotaximra vonatkozó K_M -értéke alacsonyabb volt, mint az SHV-2 (Glu238Ser) esetében ($4.9 \pm 0.1 \mu$ M ill. $18 \pm 2.3 \mu$ M). Az Arg43Ser szubsztitúció hatására SHV-2 környezetben a piperacillin/tazobactamra vonatkozó MIC-ek megemelkednek az SHV-2-höz képest. A cefotaxim és a cefepim hidrolízisének katalitikus hatékonysága az SHV-30 esetén nagyobb volt, mint az SHV-2-nél. Az egy éjszakán át tartó növekedés során termelt β -laktamáz mennyisége nagyobb volt az Ile8Phe-Arg43Ser-Glu238Ser variánsban, mint a Glu238Ser variánsban.

4.4. Az ESBL termelés és a csökkent kinolon érzékenység kapcsolata

A vizsgálat során 2002 és 2006 között izolált 70 ESBL-termelő *E. coli*, 101 ESBL-termelő *K. pneumoniae*, 5 ESBL-termelő *Citrobacter freundii* és 61 ESBL-termelő *Enterobacter spp.* klinikai izolátum esetében vizsgáltuk a *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* és *aac(6')-Ib-cr* gének jelenlétét. A *qnr* determinánsok prevalenciája viszonylag magas volt a *K. pneumoniae* (8 %) és alacsony az *E. coli* izolátumokban (1,6 %) valamint az *Enterobacter* fajok esetén (0 %). Az ötből egy ESBL-termelő *C. freundii* izolátum volt *qnr*-pozitív (4. táblázat). A *qnrA1*, *qnrB2* és *qnrS1*

4. táblázat A *qnr*-pozitív ESBL-termelő törzsek által termelt béta-laktamázok jellemzése és a törzsek MIC értékei

Törzsek	Béta-laktamáz karakterizálás		<i>qnr</i> gének	MIC (ug/ml)		
	pI	PCR, szekvenálás		Nalidixsav	Ciprofloxacín	Levofloxacín
<i>E. coli</i> M136	5.4, 8.2	TEM-1, SHV-12	<i>qnr A1</i>	>32	>256	64
<i>K. pneumoniae</i> 124	5.4, 8.2	TEM-1, SHV-12	<i>qnr A1</i>	>32	64	64
<i>K. pneumoniae</i> 125	5.4, 8.2	TEM-1, SHV-12	<i>qnr A1</i>	>32	64	128
<i>K. pneumoniae</i> M88	8.2	SHV-5	<i>qnr A1</i>	>32	64	8-16
<i>K. pneumoniae</i> M140	5.4, 8.2	TEM-1, SHV-12	<i>qnr A1</i>	>32	256	128
<i>K. pneumoniae</i> M143	8.6, 8.9	CTX-M-15	<i>qnr A1</i>	>32	32	64
<i>K. pneumoniae</i> M95	5.4, 8.2	TEM-1, SHV-12	<i>qnr A1</i> , <i>qnrB2</i>	>32	>256	128
<i>C. freundii</i> M141	>9.0	nem meghatározott	<i>qnr B2</i>	2	<0.5	<0.5
<i>K. pneumoniae</i> 96	5.4, 7.6	TEM-1, SHV-2	<i>qnrS1</i>	>32	4	4

volt kimutatható és a *qnrA1*-nek volt a legnagyobb prevalenciája (3 %). Tanulmányunk szerint a *qnrA1* gén jelenléte kapcsolt volt az SHV-5, SHV-12 és CTX-M-15 enzimekkel. Az

összes ESBL-termelő izolátumból hatvanhárom (26,6 %) volt pozitív *aac(6')-Ib*-re, amelyből 19-ben (az összes 8 %-a)—16 *K. pneumoniae* és 3 *E. coli*—volt jelen az *aac(6')-Ib-cr* variáns. Egyetlen *qnr*-pozitív törzs sem hordozta az *aac(6')-Ib-cr* variánst. A *qnrA1*-pozitív törzsek—hat *K. pneumoniae* és egy *E. coli*—rezisztensek voltak nalidixsavra, norfloxacinra, ciprofloxacinnra és levofloxacinra, igen magas MIC-értékekkel, azonban a *qnrA1* gén jelenléte önmagában csupán alacsony szintű kinolon-rezisztenciát okozott (5. táblázat). A *qnrB* gént két izolátumban detektáltuk: egy *K. pneumoniae* és egy *C. freundii* esetén. Egy *K. pneumoniae* izolátum mind a *qnrA1*, mind a *qnrB2* géneket hordozta, de csak a *qnrA1* volt konjugációval átvihető (5. táblázat). Önmagában a *qnrA1* átvitele nem eredményezett jelentős változást a kinolon-érzékenységekben a transzkonjugációs esetekben (5. táblázat). A kizárólag a *qnrB2* gént hordozó *C. freundii* M141 érzékeny volt a vizsgált fluorokinolonokra, legalább 8-szor kisebb MIC-értékekkel, mint a CLSI által javasolt érzékenységi határértékek. A *qnrS1* gént csak egy *K. pneumoniae* törzsben detektáltuk, amely rezisztens volt a legtöbb vizsgált

5. táblázat A *qnr*-pozitív törzsek konjugálásának eredménye és a konjugált baktériumok jellemzői

Törzsek	Konjugálás	<i>qnr</i> gének jelenléte a konjugált sejtekben	A konjugát sejtek MIC (ug/ml) értékei		
			Nalidixsav	Ciprofloxacinn	Levofloxacin
<i>E. coli</i> M136	+	<i>qnr A1</i>	<0.5	<0.5	<0.5
<i>K. pneumoniae</i> 124	+	<i>qnr A1</i>	>32	16	16
<i>K. pneumoniae</i> 125	+	<i>qnr A1</i>	>32	8	16
<i>K. pneumoniae</i> M88	+	<i>qnr A1</i>			
<i>K. pneumoniae</i> M140	-	negatív			
<i>K. pneumoniae</i> M143	-	negatív			
<i>K. pneumoniae</i> M95	+	<i>qnr A1</i>	>32	8	8
<i>C. freundii</i> M141	+	negatív			
<i>K. pneumoniae</i> 96	+	negatív			

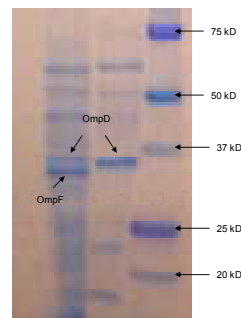
fluorokinolonra. Azonban a norfloxacin (16 mg/l) és a ciprofloxacinn (4 mg/l) MIC-értékei a CLSI által javasolt határértékek voltak. A levofloxacin MIC-értéke (4 mg/l) a két CLSI határérték (8 és 2 mg/l) között volt. A 19 *aac(6')-Ib-cr*-pozitív izolátumból 6 (32 %) volt érzékeny mind ciprofloxacinnra, mind levofloxacinra. A *aac(6')-Ib-cr* jelenléte nem eredményez nagy emelkedést a kinolonok MIC-értékeiben, bár jelentősen növeli a kromoszómális mutációk szelekciójának gyakoriságát.

4.5. Gram-negatív baktériumok karbapenem rezisztenciájának vizsgálata

Ertapenem rezisztens Enterobacter cloacae törzs vizsgálata

Egy betegből két különböző időpontban izolált ertapenem-érzékeny (ES24) és rezisztens (ER24) ESBL-termelő *E. cloacae* izolátumot vizsgáltunk meg. A két izolátum azonosságát a PFGE vizsgálat bizonyította. Bár az ER24 izolátumban kissé fokozottabb β -laktamáz termelést detektáltunk, nem volt különbség a két törzs által termelt β -laktamázok számában és típusában, mindkét törzs TEM-1, SHV-7, SHV-30 és MIR β -laktamáz enzimeket termelt. Az ES24 és ER24 ertapenem, imipenem, meropenem és ciprofloxacinn MIC értékeit összehasonlítva önmagukban és PA β N – efflux pumpa inhibitor – jelenlétében, ER24 esetében a PA β N jelentős mértékben csökkentette a MIC értékeket (ertapenem esetében >32→12 μ g/ml, imipenem 4→2 μ g/ml, meropenem 6→0.75 μ g/ml és ciprofloxacinn >32→3 μ g/ml-re). Az ES24 izolátumból mind OmpF és OmpD külső membrán fehérjét tudtunk izolálni, addig az ER24-ből csak OmpD-t (2. ábra). Valósídejű RT-PCR-rel vizsgálva az ER24 izolátumban az *ompF* és *ompD* gének transzkripció szintje 11-szer ill. 55-ször volt

alacsonyabb az ES24 izolátumhoz képest. Az *acrB* efflux pumpa génjének transzkripció szintjét vizsgálva azok megegyeztek a két törzsben (1,2-szer volt csak magasabb az ER24-ben, mint az ES24-ben). Az *ompF* és *ompD* gének csökkent mennyiségű RNS-transzkriptuma arra utalt, hogy az ER24 izolátum külső membránja kevésbé volt permeábilis, mint a ES24 törzsé, valószínűleg ez vezethetett egy pumpa által okozott magasabb szintű rezisztenciához anélkül, hogy annak hiperexpressziója önmagában szükséges lenne.



2. ábra . ES24 és ER24-ből izolált külső membrán fehérjék SDS-PAGE képe.

Ertapenem rezisztens Klebsiella pneumoniae és Klebsiella oxytoca törzs vizsgálata

A *K. pneumoniae* kromoszómálisan kódolt, nem-ESBL típusú *bla*_{SHV-11} gént és plazmidon kódolt *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1} géneket, illetve class-1 integronon elhelyezkedő *bla*_{VIM-4} gént tartalmazott. A *K. oxytoca* törzsben csak a class-1 integronon lévő *bla*_{VIM-4} gént találtuk. Mindkét integron azonos plazmidon helyezkedett el és két gén kazettát hordozott: az első pozícióban egy *aac*(6')-Ib (úgynevezett *aacA4*) gént és ezt követően egy *bla*_{VIM-4} gén kazettát. A PFGE és MLST vizsgálatok igazolták, hogy a *K. pneumoniae* törzs a korábban leírt ST11 klónba tartozott.

Karbapenem rezisztens Pseudomonas aeruginosa és Acinetobacter baumannii törzsek vizsgálata

Egy külföldön kórházba került magyar beteg hazaszállítása után, a beteg mintáiból az itthoni felvétel napján cefalosporin illetve karbapenem rezisztens *P. aeruginosa*, rezisztens *A. baumannii* és cefalosporin rezisztens *K. pneumoniae* törzs került izolálásra. A molekuláris vizsgálatok PER-1 termelő *P. aeruginosa*, PER-1 termelő *A. baumannii*, SHV-5 termelő *K. pneumoniae* és VIM-2 termelő *P. aeruginosa* jelenlétét igazolták. Az izolált Gram-negatív baktériumtörzsek jellemzői a 6. táblázatban láthatóak. A betegből származó *P.*

6. táblázat Az izolált Gram-negatív baktérium törzsek jellemzői

	TEM PCR	SHV PCR	PER PCR	OXA PCR	VIM PCR	PFGE	pl(s)
<i>P.aeruginosa</i> (PA1)	negatív	negatív	PER-1	OXA-10	negatív	A típus	5.3, 6.1, 8.0
<i>P.aeruginosa</i> (PA2)	negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	B típus	8.0
<i>P.aeruginosa</i> (PA3)	negatív	negatív	negatív	OXA-1	VIM-2	C típus	5.3, 7.4, 8.0
<i>A. baumannii</i>	TEM-1	negatív	PER-1	negatív	negatív	NM	5.3, 5.4, > 8.5
<i>K. pneumoniae</i>	TEM-1	SHV-5	negatív	negatív	negatív	NM	5.4, 8.2

NM: nem meghatározott

aeruginosa törzsek PFGE mintázatát összevetve a kórházban korábban előforduló *P. aeruginosa* törzsek PFGE mintázatával megerősítést nyert, hogy a PER-1 termelő *P. aeruginosa* és a VIM-2 termelő *P. aeruginosa* külső eredetű volt. A PER-1 termelő *P. aeruginosa* és *A. baumannii* törzsek eltűntek a kórházból, s azóta sem figyeltek meg további fertőzéseket ezekkel a törzsekkel.

4.6. ESBL-termelő törzsek által okozott fertőzések terápiás lehetőségei kísérletes állatmodellekben

A első vizsgálat sorozat során összehasonlítottuk az amikacin, a cefepim, az amikacin-cefepim és az imipenem hatását; illetve a ciprofloxacinn és levofloxacin hatását SHV-5 ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsszel fertőzött szeptikus egerekben, magas kezdeti csíraszám alkalmazásával. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok az eredménye 10^5 CFU/ml és 10^7 CFU/ml csíraszámot használva a 7. táblázatban láthatók. A farmakokinetikai elemzésből származó adatokat az 8. táblázatban adjuk meg.

7. táblázat Az antibiotikumok MIC ($\mu\text{g/ml}$) és MBC ($\mu\text{g/ml}$) értékei

Antibiotikum	10^5 CFU/ml		10^7 CFU/ml	
	MIC	MBC	MIC	MBC
Amikacin	0.5	0.5	0.5	0.5
Cefepim	1	1	>256	NM
Imipenem	0.125	0.125	0.5	1
Ciprofloxacinn	0.063	0.063	0.125	0.125
Levofloxacin	0.063	0.063	0.25	0.25

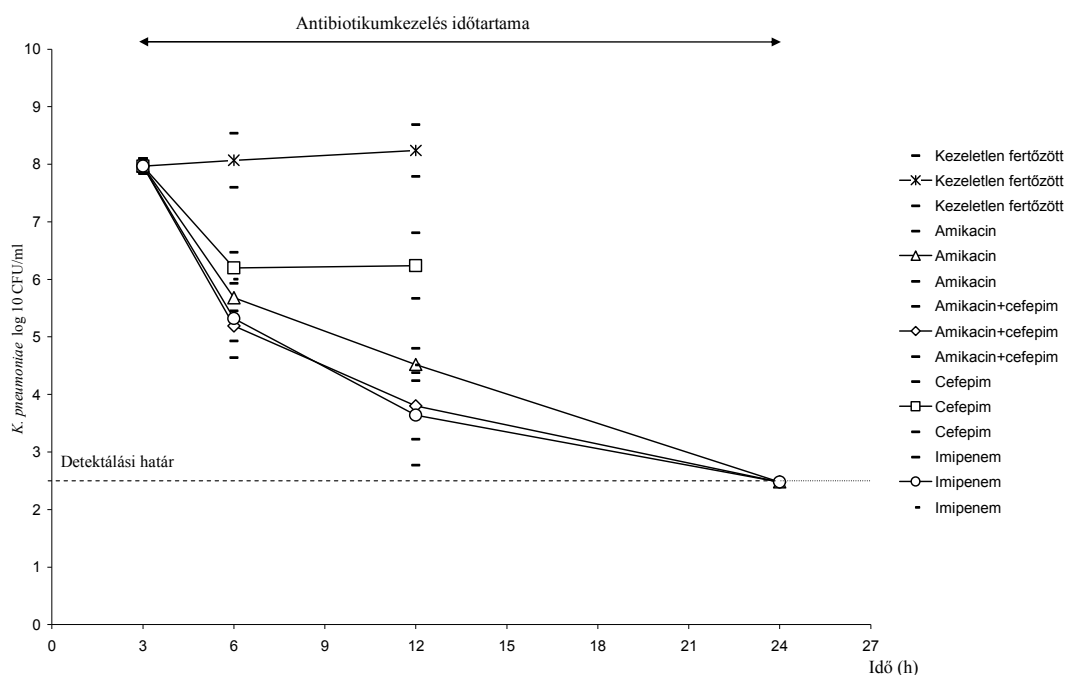
NM: nem meghatározott

8. táblázat Antibiotikumok farmakokinetikai paraméterei i.p. injekciót követően

Antibiotikum	$T_{1/2}$ (h)		$C_{\max}$ (mg/ml)		$T_{\max}$ (min)	$AUC(\text{mg} \times \text{h/ml})$	
	Átlag	$\pm\text{SD}$	Átlag	$\pm\text{SD}$		Átlag	$\pm\text{SD}$
Amikacin (7.5 mg/kg)	0.86	0.14	20.18	4.30	15	35.34	4.90
Cefepim (80 mg/kg)	1.01	0.07	195.00	45.00	15	260.97	12.67
Imipenem (40 mg/kg)	0.45	0.03	45.00	3.00	30	47.83	2.63
Ciprofloxacinn (20mg/kg)	0.69	0.17	8.52	2.25	NM	9.25	3.66
Levofloxacin (50mg/kg)	0.48	0.03	12.42	02.febr	NM	17.29	9.04

SD, standard deviáció; NM: nem meghatározott

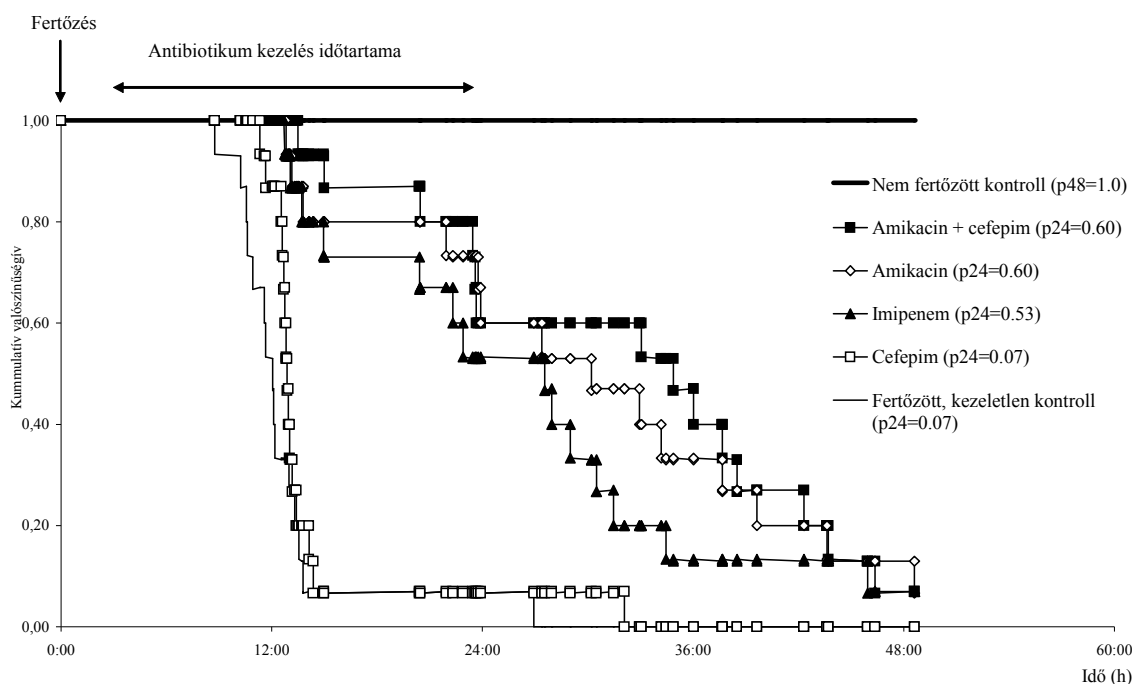
Az *in vivo* kísérlet során a magas csíraszámú 10^7 CFU/gr SHV-5-termelő *K. pneumoniae*-val i.p. fertőzött egerek túlélését és vérében a baktérium-jelenlétét vizsgáltuk. A vér



3. ábra Az egerek vérében a csíraszám alakulása

baktériumkoncentrációját detektálva, a baktérium koncentráció folyamatosan növekedését észleltük a kezeletlen csoportban; a cefepimmal kezelt csoportban kezdetben csökkent a vérben a csíraszám, de 6 óra elteltével a baktériumok számának emelkedése következett be, míg a többi csoportban –imipenemmel, amikacinnal és amikacin-cefepimmal kezelt csoportban - a vérben a csíraszám folyamatosan csökkent (3. ábra). Míg a cefepimmal kezelt csoport vér csíraszama statisztikailag is különbözött a többi kezelt csoporttól ($P < 0,05$), addig nem volt különbség az amikacint, az amikacin-cefepimet és az imipenemet kapott csoport között ($P > 0,37$). A vér baktérium-koncentrációját a ciprofloxacinnal $7,33 \log_{10}$ CFU/ml-ről $4,08 \log_{10}$ CFU/ml-re, a levofloxacinnal $3,60 \log_{10}$ CFU/ml-re csökkentette a fertőzés után 8 órával, ami szignifikánsan különbözött a fertőzött kezeletlen csoporttól.

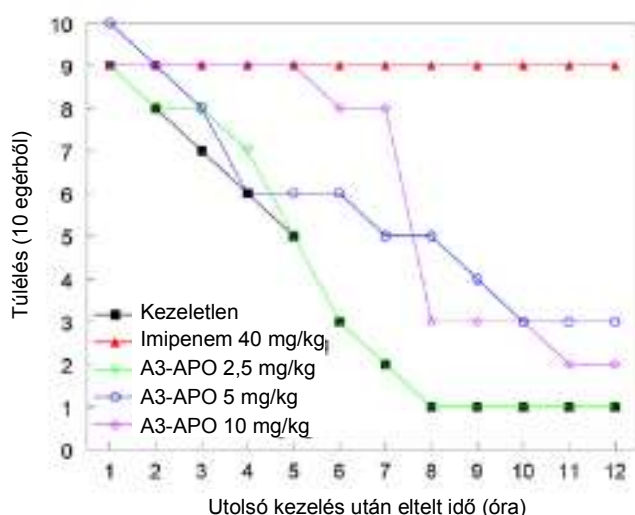
A túlélési elemzés során a nem fertőzött csoportban nem volt elhullás. 24 óra után a letalitás 14 volt a 15-ből a fertőzött kezeletlen csoportban, 6 a 15-ből az amikacinnal ill. amikacin-cefepimmal kezelt csoportokban, és 7 a 15-ből az imipenemmel kezelt csoportban (4. ábra).



4. ábra SHV-5-termelő *K. pneumoniae*-vel i.p. fertőzött, majd amikacinnal, cefepimmal, cefepim-amikacinnal és imipenemmel kezelt egerek túlélési görbéje.

A 24 órás túlélés 100 %, 93,3 % és 0 % volt a ciprofloxacinnal illetve a levofloxacinnal kezelt és a kezeletlen kontroll csoportban. A különbségek szignifikánsak voltak a kezelt csoportok és a kontroll csoport között ($p < 0,001$ mindkét kezelésnél). A ciprofloxacinnal és a levofloxacinnal is jelentősen meghosszabbította az egerek túlélését a fertőzött kezeletlen csoporttal összehasonlítva.

A második vizsgálat sorozatban meghatároztuk a toxikus dózisokat az A3-APO peptid i.p. bevitele esetén és tanulmányoztuk az A3-APO alkalmazását szisztémás fertőzések kezelésére i.p. alkalmazás esetén. Az egyszeri akut letális dózis 50 mg/kg volt, a Nem Kimutatható Káros Hatás Határértéke (NKKHH) pedig az egerekben $3 \times 20 \text{ mg/kg}$ volt. Az egereket az ESBL-termelő *E. coli* 5770 törzs $\text{LD}_{50} 2 \times 10^8 \text{ CFU/g}$ dózisával fertőztük i.p. A vizsgálat első szakaszában a fertőzött kezeletlen egerek (negatív kontroll) korai túlélése -19 órával a fertőzés után - 20% volt és a késői túlélése - 25 órával a fertőzés után - csak 10 %-os volt. A túlélési arány az imipenemmel ($3 \times 40 \text{ mg/kg}$) kezelt állatok esetében 90 % volt. Az A3-APO kezelés a dózis függvényében volt sikeres. A korai (19 órával a fertőzés után) túlélési arány 20%, 50%, illetve 80 % volt a $2,5 \text{ mg/kg}$, 5 mg/kg illetve a 10 mg/kg dózisoknál (5. ábra).



5. ábra *E. coli* 5770 törzsszel fertőzött majd A3-APO-val és imipenemmel kezelt egerek túlélése

Ugyanezeknél a dózisoknál (2,5, 5 és 10 mg/kg) a késői (25 óra) túlélési arány kevésbé volt látványos 10%, 30% illetve 20 % volt (5. ábra). A fertőzött kezeletlen állatokban a vér baktérium koncentrációja a fertőzés után 4 órával mért alacsony 10^7 CFU/g értékről 10^8 CFU/g-ra nőtt a fertőzés utáni 12. órában. Az A3-APO peptid első 10 mg/kg dózisa után a baktérium szám a 10^5 CFU/g alatti tartományra csökkent. A

peptid második dózisa után a baktériumok mennyisége tovább csökkent a kimutathatósági határ alá. A hosszú távú baktérium koncentrációk a közép-magas 10^4 CFU/g értékek körül voltak, hasonlóan a 40 mg/kg imipenemmel kezelt egerekből számolt értékekhez.

A cisplatinnal történő előzetes kezelés után a fertőzés ugyanolyan sikeres volt, mint ciszplatin kezelés nélkül. Amíg a fertőzött nem kezelt csoport túlélése 10 % volt 24 és 48 órával a fertőzés után, addig az imipenemmel (3x40 mg/kg) kezelt csoportban a túlélés csak 83 % és 56 % volt a fertőzést követően 24 illetve 48 óra múlva. A 10 mg/kg dózisban adott A3-APO nagyon hatékony volt: a túlélési arányok 70% és 40 % voltak a fertőzést követően 24 illetve 48 óra múlva. A kezeletlen egerek vérének baktérium koncentrációja folyamatosan emelkedett és 12 óra elteltével elérte a 6×10^7 CFU/ml-es maximumot. Az első dózis imipenem a vér baktérium koncentrációját 10^2 CFU/ml-rel csökkentette, és a második dózis után már közelítette a 10^3 CFU/ml-es értéket, ami a detektálás alsó határa. Az első adag 10 mg/kg és 20 mg/kg A3-APO esetén a baktériumkoncentráció 40, illetve 60-szoros csökkenése volt megfigyelhető. A második dózis A3-APO a baktérium koncentrációt szintén a 10^3 CFU/ml-es alsó határra csökkentette. A 10 mg/kg A3-APO esetében a második dózis után az egerek vérében a baktériumkoncentráció a detektálási határérték alá csökkent. A 20 mg/kg A3-APO dózis esetében pedig az egerek 40%-ban nem tudtunk baktériumot detektálni a vérben.

5. A TÉZISEK LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSAI

Epidemiológiai vizsgálatok

Az első magyarországi újszülött intenzív osztályon leírt ESBL-termelő (SHV-5)-termelő *K. pneumoniae* törzs által okozott járvány egy domináns klón jelenlétét igazolta, mely környezeti mintából is kimutatható volt. Egyetlen betegből történő ESBL-termelő *K. pneumoniae*, majd a hasonló plazmiddal rendelkező ESBL-termelő *S. marcescens* izolálása az SHV-5-t kódoló plazmid *in vivo* átvitelére utalt. Az *in vivo* illetve a kísérleti körülmények között megfigyelt plazmid átvitel az ESBL gének és a velük egy plazmidon elhelyezkedő egyéb rezisztencia gének elterjedése szempontjából komoly epidemiológiai problémát jelent.

Ötéves követéses epidemiológiai vizsgálatunk során kimutattuk, hogy az ESBL-termelő törzsek által okozott járványok epidemiológiája az évek során megváltozhat: egy járványt

okozó törzs eltűnhet és helyét újabb járványt okozó törzsek vehetik át hosszabb idő alatt. Mivel közös környezeti forrást nem sikerült bizonyítani, feltételezzük, hogy a fertőzés egy lehetséges forrása, a gyermekek édesanyja, akiknek normál bélflórájában jelen lehetnek ESBL-termelő törzsek, melyekkel a gyermekek szülés során kontaminálódhatnak. Ez a magyarázat választ adhat a multiklonalitás és az ismételt felbukkanás kérdésére is az ESBL-termelő törzsek esetében. A fentebb említett eredmények alapján javasolnánk az éretlen újszülöttek édesanyjának rutinszerű bélflóra-szűrését.

Mivel az ESBL-termelő organizmusok világszerte egyre több beteget érintenek, a PIC-en előforduló ESBL-termelő baktériumok molekuláris epidemiológiája még összetettebbé kezd válni. Sajnos az ESBL-termelés megjelenik olyan törzsekben, ahol korábban ez igen ritka volt pl: *S. marcescens*, *C. freundii*. Erre a helyzetre fel kell hívni a figyelmet, hogy az ezen törzsek elterjedésének megelőzését célzó intézkedések optimalizálhatók legyenek.

ESBL enzimek újabb fenotípusos és genotípusos detektálási lehetősége

E. cloacae esetében a CLSI által ajánlott cefotaximot vagy ceftazidimet alkalmazó ESBL-termelés detektálására szolgáló módszerek nem megbízhatóak a kromoszomális β -laktamáz enzim egyidejű termelése miatt. Mivel csupán 15 ESBL-termelő és 30 nem ESBL-termelő *E. cloacae* izolátumot vizsgáltunk, nem mondhatunk kategorikus ítéletet, de vizsgálataink azt mutatták, hogy a ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ -es MIC-érték az ESBL-termelés következetesen erőteljes markerének tekinthető *E. cloacae* törzsekben.

A real-time PCR SNP assay hasznosnak bizonyult azokban az esetekben, amikor a genomból történő amplifikálás és a primer PCR-termékek szekvenálása arra engedett következtetni, hogy több β -laktamáz is jelen volt egy baktériumban. A módszer igen jól reprodukálható és posztamplifikációs lépések nélkül is kivitelezhető. Ezzel a módszerrel próbákat lehet tervezni minden célhely azonosítására, még azokra is, amelyek nem képeznek restriktív endonukleáz hasítási helyeket, illetve kettőnél több allél is elkülöníthető. Ez különösen hasznos lehet nagy populációkon végzett követéses vizsgálatoknál, amelyek a β -laktamáz génnek molekuláris epidemiológiájának meghatározására irányulnak.

Új ESBL enzimek izolálása és karakterizálása

Az antibiotikumok, elsősorban a cefalosporinok szelekciós nyomásának hatására egyre újabb és újabb ESBL variánsok kialakulásával kell számolni. A létrejövő mutációk hatása az enzim aktivitásra segít megérteni az ESBL enzimek evolúcióját is. A részletesebben vizsgált SHV-30 enzim példája mutatja, hogy míg a Glu238Ser mutáció felelős a β -laktamáz enzim kiterjedt spektrumáért, a további Arg43Ser mutáció más cefalosporinok fokozottabb hidrolíziséért és a megnövekedett enzimtermelésért felelős. Valószínű, hogy az SHV-30 β -laktamáz egy prekursor enzim az SHV-7 felé és az Arg43Ser szubsztitúciónak bonyolult szerepe van az oxyimino-cefalosporin rezisztencia kialakulásában.

ESBL termelés és a csökkent kinolon érzékenység kapcsolata

Elsőként számoltunk be plazmid-mediálta kinolon-rezisztenciáról ESBL-termelő *Enterobacteriaceae* baktériumok között Magyarországon. A prevalencia alacsony volt: ~3 % a *qnrA*, 0,8 % a *qnrB*, 0,4 % a *qnrS*- és 8 % az *aac(6')-Ib-cr* génekre, emellett a legtöbb plazmid-kódolt rezisztencia-allélt a *K. pneumoniae* tartalmazta. Az eredmények mutatják, hogy a kiterjedt spektrumú cefalosporinokra és a kinolonokra vonatkozó rezisztencia átadásában részt vevő plazmidok megjelenésével számolni kell a klinikai izolátumokban.

Gram-negatív baktériumok karbapenem rezisztenciájának vizsgálata

Az izolált ertapenem rezisztencia hátterében a csökkent külső membrán permeabilitás mellett egy efflux pumpa jelenlétét is bizonyítani tudtuk. Valószínűleg a csökkent külső membrán

permeabilitás vezetett egy pumpa által okozott magasabb szintű ertapenem rezisztenciához anélkül, hogy annak hiperexpressziója önmagában szükséges lett volna. Elsőként bizonyítottuk, hogy az ertapenem rezisztenciában az efflux pumpáknak is szerepe van. Az efflux pumpák jelenléte további aggodalomra ad okot, több antibiotikum csoportot is érintő hatásuk miatt.

Kimutattuk, hogy az izolált *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* törzsek ertapenem rezisztenciájának hátterében VIM-4 MBL termelés állt. Így először mutattunk ki MBL termelést az *Enterobacteriaceae* család tagjai között Magyarországon, és először *K. oxytoca* törzsben a világon. A VIM-4 termelő *K. pneumoniae* a világszerte sikeres ST11 klónhoz tartozott, melyben először sikerült igazolnunk MBL gént is, ami komoly problémához vezethet.

Vizsgálatunk megerősítette a PER-1 termelő *P. aeruginosa* és *A. baumannii* izolátumok, VIM-2 termelő *P. aeruginosa* törzsek megjelenését Magyarországon. Ezen túlmenően szemlélteti a β -laktamáz mediálta rezisztencia-mechanismusok országok ill. földrészek közötti terjedésének lehetőségét. Valószínűleg a PER-enzim elterjedése a világon gyakoribb, mint gondolnánk, hiszen a *P. aeruginosa* törzsek ESBL-termelésének rutin tesztelése megoldatlan probléma. Vizsgálatunk jellemzi az antibiotikum-rezisztencia földrészek közötti terjedését, rámutatva a gondos szűrés és a külföldről érkező betegek elkülönítésének jelentőségére.

ESBL-termelő törzsek által okozott fertőzések terápiás lehetőségei kísérletes állatmodellekben

Eredményeink alapján az imipenem, amikacin, illetve ciprofloxacin, levofloxacin lehet a választandó kezelés ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek által okozott fertőzések esetében, abban az esetben, ha standard csíraszámot vizsgálva a fent említett antibiotikumok érzékenynek mutatkoznak. Azonban eredményeink alapján a cefepim nem javasolható ESBL-termelő törzsek kezelésére még érzékenységet mutató organizmusok esetében sem a kísérleteink során bizonyítottan *in vivo* is megfigyelhető inokulum hatás miatt.

Jelen tanulmányban sikerült meghatározni az A3-APO Nem Kimutatható Káros Hatás Határértékét (NKKHH) az egerekben, ami 3x20 mg/kg volt. Továbbá sikerült bizonyítani, hogy ESBL-termelő *E. coli* által okozott szisztémás fertőzés esetében az A3-APO biztonságos dózisokban hatékony volt, mind az egerek túlélését tekintve, mind az egerek vérében a baktérium csíraszám csökkenést tekintve, hasonlóan, mint a kontroll antibiotikum, az imipenem. Mivel a jól-tolerált dózisokban az A3-APO hatékony, potenciális jelöltje a preklinikai és klinikai fejlesztésnek a rezisztens fertőzések elleni kezelésben önmagában vagy hagyományos antibiotikumokkal való kombinációban.

6. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönetemet fejezem ki mindazoknak, akik szakmai és tudományos munkámat mindenkor segítették: Prof. Anderlik Piroska, Prof. Robert A. Bonomo, Prof. Giuseppe Cornaglia, Dr. Cser Viktória, Dr. Ivelina Damjanova, Dr. Dobay Orsolya, Dr. Filetóth Zsolt, Andrea M. Hujer, Dr. Jeney Csaba, Prof. Kalász Huba, Dr. Kamotsay Katalin, Kapás Mónika, Katona Katalin, Dr. Kristóf Katalin, Dr. Konkoly-Thege Marianne, Prof. Kocsis Béla, Dr. Kocsis Béla, Dr. Kocsis Erika, Komka Kinga, Dr. Krizsán Gergő, Dr. Máthé András, Prof. Nagy Károly, Prof. Nász István, Dr. Ostorházi Eszter, Prof. Ötvös László, Prof. David L. Paterson, Pesti Natasa, Dr. Rókusz László, Prof. Rozgonyi Ferenc, Dr. Szentandrassy Júlia, Dr. Tóth Ákos.

7. TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

7.1. A tézisek alapjául szolgáló tudományos közlemények

Folyóiratcikkek

1. **Szabó D**, Barcs I, Rozgonyi F. Extended spectrum β -lactamases: An actual problem of hospital microbiology (a review). *Acta Microbiol Immunol Hung* 44(4): 309-324, 1997.
2. **Szabó D**, Filetóth Z, Szentandrassy J, Némedi M, Tóth E, Jeney C, Kispál G, Rozgonyi F. Molecular Epidemiology of a Cluster of Cases Due to *Klebsiella pneumoniae* Producing SHV-5 Extended-spectrum β -Lactamase in the Perinatal Care Unit of a Hungarian Hospital. *J Clin Microbiol* 37(12):4167-9, 1999. **IF: 3,67**
3. **Szabó D**, Máthé A, Filetóth Z, Anderlik P, Rókusz L, Rozgonyi F. *In vitro* and *in vivo* activities of amikacin, cefepime, amikacin plus cefepime and imipenem against an SHV-5 extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 45(4):1287-91, 2001. **IF: 4,562**
4. **Szabó D**, Máthé A, Lengyel J, Anderlik P, Rókusz L, Rozgonyi F. *In vitro* and *in vivo* activities of ciprofloxacin and levofloxacin against an SHV-5 extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Curr Med Chem* 9(4):437-42, 2002. **IF: 4,966**
5. Kruger T, **Szabó D**, Keddy KH, Deeley K, Marsh JW, Hujer AM, Bonomo RA, Paterson DL. Infections with non-typhoidal *Salmonella* species, producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 48(11):4263-70, 2004. **IF: 4,216**
6. **Szabo D**, Silveira F, Fujitani S, Paterson DL. Mechanisms of resistance of bacteria causing ventilator-associated pneumonia. *Clin Chest Med* 26(1):75-9, 2005. **IF:1,456**
7. **Szabó D**, Melan MA, Hujer AM, Bonomo RA, Hujer KM, Bethel CR, Kristóf K, Paterson DL. Molecular analysis of the simultaneous production of two SHV-type extended-spectrum β -lactamases in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* by using single-nucleotide polymorphism genotyping. *Antimicrob Agents Chemother* 49(11):4716-20, 2005. **IF: 4,379**
8. **Szabó D**, Bonomo RA, Silveira F, Pasculle AW, Baxter C, Linden PK, Hujer AM, Hujer KM, Deeley K, Paterson DL. SHV-type extended-spectrum β -lactamase production is associated with reduced cefepime susceptibility in *Enterobacter cloacae*. 2005. *J Clin Microbiol* 43(10):5058-64, 2005. **IF: 3,537**
9. Bonomo RA, **Szabó D**. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 1;43:S49-56, 2006. **IF: 6,186**
10. Máthé A, Komka K, Forczig M, **Szabó D**, Anderlik P, Rozgonyi F. The effect of different doses of cisplatin on the pharmacokinetic parameters of cefepime in mice. *Lab Anim* 40(3):296-300, 2006. **IF: 0,76**

11. **Szabó D**, Silveira F, Hujer AM, Bonomo RA, Hujer KM, Marsh JW, Bethel CR, Doi Y, Deeley K, Paterson DL. Outer membrane protein changes and efflux pump expression together may confer resistance to ertapenem in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 50(8):2833-5, 2006. **IF:4,153**
12. Kristóf K, **Szabó D**, Marsh JW, Cser V, Janik L, Rozgonyi F, Nobilis A, Nagy K, Paterson DL. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella spp.* in a neonatal intensive care unit: risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 26(8):563-70, 2007.**IF: 2,309**
13. Máthé A, **Szabó D**, Anderlik P, Rozgonyi F, Nagy K. The effect of amikacin and imipenem alone and in combination against an extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. Diagn Microbiol Infect Dis. 58(1):105-10, 2007. **IF: 2,448**
14. Garcia Dde O, Doi Y, **Szabó D**, Adams-Haduch JM, Vaz TM, Leite D, Padoveze MC, Freire MP, Silveira FP, Paterson DL. Multiclonal Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum β -Lactamases CTX-M-2 and Novel Variant CTX-M-59 in a Neonatal Intensive Care Unit in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 52(5):1790-3, 2008. **IF: 4,716**
15. **Szabó D**, Kocsis B, Rókusz L, Szentandrassy J, Katona K, Kristóf K, Nagy K. First detection of plasmid-mediated quinolone resistance determinants: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in Budapest, Hungary. J Antimicrob Chemother 62(3):630-2, 2008. **IF:4,328**
 Idézetek száma: 5 Független idézetek száma: 5
16. **Szabó D**, Szentandrassy J, Juhász Z, Katona K, Nagy K, Rókusz L. Imported PER-1 producing *Pseudomonas aeruginosa*, PER-1 producing *Acinetobacter baumannii* and VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in Hungary. Ann Clin Microbiol Antimicrob 30;7:12, 2008.
17. Rozgonyi F, **Szabó D**, Kocsis B, Ostorházi E, Abbadessa G, Cassone M, Wade JD, Otvos L Jr. The antibacterial effect of a proline-rich antibacterial peptide A3-APO. Curr Med Chem. 16(30):3996-4002, 2009 **IF:4,708**
18. Kristóf K, Toth A, Damjanova I, Janvari L, Konkoly-Thege M, Kocsis B, Koncan R, Cornaglia G, Szego E, Nagy K, **Szabó D**. Identification of a *bla_{VIM-4}* gene in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone and in a *Klebsiella oxytoca* strain in Hungary. J Antimicrob Chemother 65(6):1303-1305, 2010 **IF:4,352**
19. **Szabó D**, Ostorhazi E., Binasc A., Rozgonyi F., Kocsis B., Cassoned M., Wade JD., Noltec O., Otvos L Jr. The designer proline-rich antibacterial peptide A3-APO is effective against systemic *Escherichia coli* infections in different mouse models Int J Antimicrob Agents. 35(4):357-361, 2010 **IF:3,032**

Idézhető kongresszusi absztraktok

1. **Szabó D**, Glatz K, Jeney C, Berek Z, Csukás Z, Kamotsay K, Rozgonyi F. Resistance to ceftazidime in a Hungarian Hospital. Clin Microbiol Infections 5: Suppl 3: 241, 1999
2. **Szabó D**, Filetóth Z, Szentandrassy J, Némedi M, Kispál G, Tóth E, Jeney C. Rozgonyi F. Molecular epidemiology of cluster of cases of SHV-5 extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-KP) Infektol Klin Mikrobiol 6: (Suppl 1): 1999.
3. Szentandrassy J, Némedi M, Tóth E, **Szabó D**, Filetóth Z, Jeney C, Rozgonyi F. SHV-5 extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-KP) in a perinatal intensive care unit (PICU) of a Hungarian hospital Acta Microbiol Immunol Hung 47:(2-3) 199, 2000.
4. Szabó D, Máthé A, Filetóth Z, Anderlik P. Rozgonyi F. Effect of different doses of cisplatin on the pharmacokinetic parameters of cefepime in mice. Spanish J Chemother 13: (Suppl 2): 42, 2000
5. (Máthé A, Filetóth Z, **Szabó D**, Anderlik P, Rozgonyi F. Modelling the human pharmacokinetic parameters of cefepime in mice. Magyar Kemoterápiái Társaság XV. Konferenciája, Hajdúszoboszló, 2000. jún. 7-9. Summary 51.
6. **Szabó D**, Filetóth Z, Máthé A, Lengyel J, Anderlik P, Rókusz L, Rozgonyi F. In vitro and in vivo effectiveness of ciprofloxacin and levofloxacin against an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumonia* strain. Int J Antimicrob Agents 17: (Suppl.)1 152 2001.
7. **Szabó D**, Kristóf K, Harmath Á, Hazai G, Rozgonyi F. Occurrence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a neonatal intensive care unit, Budapest. Clin Microbiol Infect 9: (Suppl. 1) 247 2003.
8. **Szabó D**, Pesti N, Kristóf K, Rókusz L, Szentandrassy J, Katona K, Nagy K. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants: *qnrA*, *qnrB* and *qnrS* in extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* strains in Hungary Clin Microbiol Infect 13: (Suppl. 1) S225 2007.
9. **Szabó D**, Rókusz L, Juhász Z, Szentandrassy J, Katona K, Nagy K. The first isolation of PER-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains in Hungary Clin Microbiol Infect 13: (Suppl. 1) S378 2007.
10. **Szabó D**, Rozgonyi F, Nagy K. Association of beta-lactamase production with other particularly quinolon resistance mechanisms. Acta Microbiol Immunol Hung 54: (Suppl.) 120 2007.

7.2. A tézisekhez nem kapcsolódó tudományos közlemények

1. Glatz K, **Szabó D**, Szabó G, Boriszova D, Rozgonyi F. Emergence of extremely high penicillin and cefotaxime resistance and high level levofloxacin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. J Antimicrob Chemother 48(5):731-4, 2001. **IF: 3,49**
2. Gál Z, **Szabó D**, Kovács P, Hernádi F, Tóth-Martinez B, Rozgonyi F. β -lactam susceptibility patterns and investigation of cephalosporin hydrolysing β -lactamases of Gram-negative extraintestinal clinical isolates. Int J Antimicrob Agents 16 (4):395-400, 2000. **IF:1,141**
3. Potoski BA, Adams J, Clarke L, Shutt K, Linden PK, Baxter C, Pasculle AW, Capitano B, Peleg AY, **Szabó D**, Paterson DL. Epidemiological profile of linezolid-resistant coagulase-negative staphylococci. Clin Infect Dis 43(2):165-71, 2006. **IF:6,186**
4. Pope J, Adams J, Doi Y, **Szabo D**, Paterson DL. KPC type β -lactamase, rural Pennsylvania. Emerg Infect Dis 12(10):1613-4, 2006. **IF.:5,094**
5. Noto PB, Abbadessa G, Cassone M, Mateo GD, Agelan A, Wade JD, **Szabó D**, Kocsis B, Nagy K, Rozgonyi F, Otvos L Jr. Alternative stabilities of a proline-rich antibacterial peptide in vitro and in vivo. Protein Sci 17(7):1249-55, 2008. **IF: 3,115**
6. Szász M, Lehotkai N, Kristóf K, **Szabó D**, Nagy K. Prevalence and antimicrobial resistance of uropathogens in different inpatient wards. Acta Microbiol Immunol Hung. 56(4):375-87, 2009
7. Kádár B, Szász M, Kristóf K, Pesti N, Krizsán G, Szentandrassy J, Rókusz L, Nagy K, **Szabó D**. In vitro activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* strains. Acta Microbiol Immunol Hung. 57(3):235-245, 2010
8. Kristóf K, Janik L, Konka K, Harmath Á, Hajdú J, Nobilis A, Rozgonyi F, Nagy K, Rigó J Jr, **Szabó D**. Clinical microbiology of neonatal candidiasis in Hungary. Acta Microbiol Immunol Hung. 57(3):407-417, 2010
9. Ostorházi E, Rozgonyi F, **Szabó D**, Binas A, Cassone M, Wade JD, Nolte O, Bethel CR, Bonomo RA, Otvos L Jr. Intramuscularly administered peptide A3-APO is effective against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in mouse models of systemic infections. Biopolymers. 2010 May 26. **IF: 2,605***
10. Ostorházi E, Rozgonyi F, Sztodola A, Harmos F, Kovalszky I, **Szabó D**, Knappe D, Hoffmann R, Cassone M, Wade JD, Bonomo RA, Otvos L Jr. Preclinical advantages of intramuscularly administered peptide A3-APO over existing therapies in *Acinetobacter baumannii* wound infections. J Antimicrob Chemother. 65(11):2416-22. 2010 **IF: 4,352***
11. Kristóf K, Kocsis E, **Szabó D**, Kardos S, Cser V, Nagy K, Hermann P, Rozgonyi F. Significance of methicillin-teicoplanin resistant *Staphylococcus haemolyticus* in bloodstream

infections in patients of the Semmelweis University hospitals in Hungary Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Jan 11 **IF: 2,605***

Magyar nyelvű közlemények jegyzéke

1. **Szabó D.** Kiterjedt-spektrumú β -lactamase termelés jelentősége (Detektálási lehetőségek és epidemiológia). Infektológia. 3:94-100, 2003
2. Kristóf K, **Szabó D.** Antibiotikum-rezisztencia a gyakorlatban. Gyógyszerész továbbképzés 4(6): 174-177, 2010

Tudományos könyvek és könyvfejezetek

1. **Szabó D,** Paterson D. Proteus species, In: Yu VL, Weber R, Raoult D. (eds): Antimicrobial Therapy and Vaccines, Apple Trees Productions, LLC, New York, 537-544, 2002.