

**β -laktám rezisztens Gram-negatív baktériumok
vizsgálata**

Doktori értekezés

Dr. Szabó Dóra

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	10
2. TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE	13
3. ÁBRÁK JEGYZÉKE	16
4. BEVEZETÉS	18
4.1. A penicillin története	18
4.2. β-laktám antibiotikumok	19
4.2.1. Penicillinek	19
4.2.2. Cefalosporinok	20
4.2.3. Karbapenemek	20
4.2.4. Monobaktámok	21
4.2.5. β -laktamáz gátlók	21
4.3. Az antibiotikum-rezisztencia alapja	21
4.4. A β-laktám rezisztencia	21
4.3.1. A β -laktamáz termelés	22
4.3.1.1. Széles-spektrumú β -laktamázok	22
4.3.1.2. Kromoszomális enzimek	24
4.3.1.3. Kiterjedt-spektrumú β -laktamázok- extended-spectrum β -lactamase - ESBLs	25
4.3.1.3.1. TEM- és SHV-típusú ESBL-ek	26
4.3.1.3.2. CTX-M-típusú ESBL-ek	26
4.3.1.3.3. OXA-típusú ESBL-ek	27
4.3.1.3.4. Minor ESBL-ek	27
4.3.1.4. Karbapenemázok	27
4.3.1.4.1. <i>K. pneumoniae</i> karbapenemáz (KPC)	28
4.3.1.4.2. Metallo- β -laktamázok	28
4.3.2. Csökkent permeabilitáson alapuló rezisztencia	28
4.3.3. Efflux mechanizmuson alapuló rezisztencia	30
4.3.4. A penicillin-kötő fehérjék megváltozásán alapuló rezisztencia	30
5. CÉLKITŰZÉSEK	31

5.1. Epidemiológiai vizsgálatok	31
5.2. ESBL enzimek újabb fenotípusos és genotípusos detektálási lehetőségei	31
5.3. Új ESBL enzimek izolálása és karakterizálása	32
5.4. ESBL termelés és a csökkent kinolon érzékenység kapcsolata	32
5.5. Gram-negatív baktériumok karbapenem rezisztenciájának vizsgálata	32
5.6. ESBL-termelő törzsek által okozott fertőzések terápiás lehetőségei kísérletes állatmodellekben	33
6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	34
6.1. Általános bakteriológiai módszerek	34
6.1.1. Baktériumtörzsek	34
6.1.2. Baktériumtörzsek identifikálása	34
6.1.3. A baktériumtörzsek tárolása	34
6.1.4. Tenyésztés, táptalajok	34
6.1.5. A csíraszám beállítása	34
6.2. Antibiotikum érzékenység meghatározása	35
6.2.1. Antibiotikum érzékenység meghatározása korongdiffúziós módszerrel	35
6.2.2. Antibiotikum érzékenység vizsgálata minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározásával	35
6.2.2.1. MIC érték meghatározása E-teszttel	35
6.2.2.2. MIC érték meghatározása mikrodilúciós módszerrel	35
6.2.2.3. MIC érték meghatározása agardilúciós módszerrel	36
6.2.3. Antibiotikum érzékenység vizsgálata minimális baktericid koncentráció (MBC) meghatározásával	36
6.2.4. A β -laktamáz enzim termelés detektálása antibiotikum érzékenység meghatározása alapján	36
6.2.4.1. AmpC termelés fenotípusos vizsgálata	36
6.2.4.2. ESBL termelés fenotípusos szűrése	37
6.2.4.3. ESBL termelés fenotípusos megerősítése	37
6.2.4.4. MBL termelés fenotípusos szűrése	37
6.2.4.5. MBL termelés fenotípusos megerősítése	37
6.3. Biokémiai vizsgáló módszerek	38

6.3.1. Analitikai izoelektromos fókuszálás	38
6.3.2. β -laktamáz tisztítás	38
6.3.3. Enzimkinetikai vizsgálatok	38
6.3.4. Enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat SHV β -laktamáz kimutatására	39
6.3.5. Külső membrán fehérjék izolálása és kimutatása	40
6.3.6. Molekuláris ábrázolások	40
6.4. Genetikai módszerek	40
6.4.1. Plazmid kimutatás, izolálás	40
6.4.2. Transzformáció, konjugáció	40
6.4.3. Emésztés restrikciós enzimmel	41
6.4.4. Pulzáló mezejű gélelektroforézis	41
6.4.5. DNS próba és hibridizáció	41
6.4.6. Polimeráz láncreakció (PCR)	42
6.4.7. Multi-lókusz szekvencia tipizálás	42
6.4.8. Klónozás	42
6.4.9. Mutagenézis	43
6.4.10. DNS-szekvenálás	43
6.4.11. Egy pontos nukleotid polimorfizmusok detektálása	43
6.4.12. Valósidejű reverz transzkriptáz PCR	44
6.5. Epidemiológiai vizsgálatok	45
6.5.1. Epidemiológiai meghatározások	45
6.5.2. A kórtörténetek áttekintése	46
6.6. Állatkísérletek	46
6.6.1. Állatmodell	46
6.6.2. Antibiotikum szérumszint meghatározása egerekben	46
6.6.2.1. Cefepim és imipenem szérumszint meghatározása	47
6.6.2.2. Amikacin szérumszint meghatározása	47
6.6.2.3. Ciprofloxacín és levofloxacín szérumszint meghatározása	47
6.6.3. Farmakokinetikai változók meghatározása	47
6.6.4. Baktérium csíraszám meghatározása az egerek vérében	48
6.6.5. Túlélési elemzés	48
7. EREDMÉNYEK	49
7.1. Epidemiológiai vizsgálatok	49
7.1.2. Az első magyarországi ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> törzs által okozott esethalmozódás molekuláris epidemiológiai jellemzése	49
7.1.2.1. Baktérium törzsek	49

7.1.2.2. Epidemiológiai vizsgálatok eredményei	50
7.1.2.3. Plazmid profil meghatározás	51
7.1.2.4. Antibiotikum érzékenység meghatározása	52
7.1.2.5. Izoelektromos fókuszálás	53
7.1.2.6. Molekuláris epidemiológiai vizsgálat	53
7.1.2.7. Epidemiológiai intézkedések	54
7.1.2. ESBL-termelő <i>Klebsiella spp.</i> ötéves követéses molekuláris epidemiológiai vizsgálatának eredménye a Semmelweis Egyetem II. Perinatalis Intenzív Centrumában	55
7.1.2.1. Baktérium törzsek	55
7.1.2.2. A fertőzés kockázati tényezői	56
7.1.2.3. Antibiotikum érzékenység meghatározás	57
7.1.2.4. Analitikai izoelektromos fókuszálás	58
7.1.2.5. Pulzáló mezejű gélelektroforézis	58
7.1.2.6. Plazmid DNS preparálás és restrikciós elemzés	59
7.1.2.7. PCR amplifikálás és szekvenálás	59
7.2. ESBL enzimek jelenlétének detektálási lehetőségei az <i>Enterobacteriaceae</i> család tagjai között	61
7.2.1. ESBL enzimek fenotípusos detektálása <i>Enterobacter cloacae</i> törzsekben	61
7.2.1.1. β -laktamáz termelés vizsgálata	61
7.2.1.2. Antibiotikum érzékenység meghatározása	62
7.2.1.3. A törzsek azonosságának vizsgálata	64
7.2.1.4. A törzsek plazmid-profiljának meghatározása	64
7.2.1.5. Fenotípusos ESBL-szűrő módszerek alkalmazása	65
7.2.2. ESBL enzimek újabb genotípusos detektálási lehetősége	69
7.2.2.1. A vizsgálat során használt törzsek	69
7.2.2.2. Az <i>E. cloacae</i> ES24 törzs antibiotikum érzékenysége	70
7.2.2.3. Az <i>E. cloacae</i> ES24 plazmid profilja	71
7.2.2.4. Az <i>E. cloacae</i> ES24 törzs izoelektromos fókuszálásának eredménye	71
7.2.2.3. Az <i>E. cloacae</i> ES24 szekvenálási eredményei	72
7.2.2.3. Real-time PCR SNP genotipizálás	72
7.3. Új ESBL enzimek izolálása	75
7.3.1. A TEM-131 jellemzése	75
7.3.1.1. A TEM-131 antibiotikum érzékenysége	75
7.3.2. Az SHV-30 enzim karakterizálása	76
7.3.2.1. A bla_{SHV-7} , bla_{SHV-30} , $bla_{(SHV-1) R43S}$ és $bla_{(SHV-1) I8F-R43S}$ előállítás	77
7.3.2.2. Antibiotikum-érzékenység meghatározása agardilúcióval	77

7.3.2.3. Antibiotikum-érzékenység meghatározása E-teszttel	79
7.3.2.4. Kinetikai elemzés	80
7.3.2.5. A termelt enzim mennyiségi meghatározása	82
7.3.3. CTX-M-59 jellemzése	83
7.3.3.1 CTX-M-2-t és CTX-M-59-et egyaránt termelő <i>E. coli</i> klónok antibiotikum érzékenysége	83
7.3.4. SHV-85 jellemzése	83
7.4. Plazmidon kódolt kinolon rezisztencia (<i>qnrA</i>, <i>qnrB</i>, <i>qnrS</i> és <i>aac(6')</i>-<i>Ib-cr</i>) gének vizsgálata ESBL-termelő <i>Enterobacteriaceae</i> törzsekben	84
7.4.1. ESBL-termelő törzsek kinolon érzékenysége	84
7.4.2. A <i>qnrA,B,S</i> és <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i> pozitív ESBL-termelő törzsek jellemzése	86
7.4.2.1. A <i>qnr</i> és <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i> gének prevalenciája	86
7.4.2.2. A <i>qnrA</i> -pozitív törzsek jellemzése	86
7.4.2.3. A <i>qnrB</i> -pozitív törzsek jellemzése	87
7.4.2.4. A <i>qnrS</i> -pozitív törzsek jellemzése	88
7.4.2.5. A <i>aac(6')</i> - <i>Ib-cr</i> -pozitív törzsek jellemzése	88
7.4.2.6. A <i>qnr</i> -pozitív törzsek által termelt β -laktamáz enzimek jellemzői	88
7.5. Karbapenem rezisztens Gram-negatív baktériumok vizsgálata	90
7.5.1. Ertapenem rezisztens <i>Enterobacter cloacae</i> törzs vizsgálata	90
7.5.1.2. Antibiotikum érzékenység meghatározása	90
7.5.1.3. Külső membránfehérjék izolálása	91
7.5.1.5. Az ES24 és ER24 <i>E. cloacae</i> törzs azonosságának vizsgálata	92
7.5.1.6. A <i>ompD</i> , <i>ompF</i> és <i>acrB</i> gének relatív expressziójának meghatározása	92
7.5.2. Ertapenem rezisztens <i>Klebsiella pneumoniae</i> és <i>Klebsiella oxytoca</i> törzs vizsgálata	94
7.5.2.1. Baktérium törzsek	94
7.5.2.2. A <i>Klebsiella</i> törzsek antibiotikum érzékenysége	94
7.5.2.3. A <i>Klebsiella</i> törzsek által termelt β -laktamáz enzimek	95
7.5.2.4. A metallo- β -laktamáz termelő <i>Klebsiella</i> törzsek plazmidjainak jellemzése	95
7.5.2.5. A <i>Klebsiella</i> törzsek klonális vizsgálata	95
7.5.3. Karbapenem rezisztens <i>Pseudomonas aeruginosa</i> és <i>Acinetobacter baumannii</i> törzsek vizsgálata	97
7.5.3.1. Esetleírás	97

7.5.3.2. Antibiotikum érzékenység meghatározás	98
7.5.3.3. PCR vizsgálatok és szekvenálás	99
7.5.3.4. Izoelektomos fókuszálás	100
7.5.3.5. PFGE vizsgálat	100

7.6. ESBL-termelő törzsek által okozott fertőzések terápiás lehetőségei kísérletes állatmodellekben **101**

7.6.1. A ciszplatin hatása az egér farmakokinetikai paramétereire	101
7.6.1.1. A kísérlet menete	102
7.6.1.2. Laboratóriumi paraméterek	102
7.6.1.3. A túlélés elemzése	102
7.6.1.4. Farmakokinetikai eredmények	103
7.6.2. Imipenem, cefepim és amikacin hatékonyságának vizsgálata SHV-5 típusú ESBL-termelő <i>Klebsiella pneumoniae</i> törzsben	104
7.6.2.1. Kísérlet leírása	104
7.6.2.2. Az állatkísérletben alkalmazott <i>K. pneumoniae</i> törzs antibiotikum érzékenységi vizsgálatának eredményei	105
7.6.2.3. Farmakokinetikai eredmények	105
7.6.2.4. Ölési görbe	106
7.6.2.5. Az egerek vérében a baktérium koncentráció meghatározása	107
7.6.2.6. Túlélési analízis	108
7.6.3. Ciprofloxacín és levofloxacín hatékonyságának vizsgálata SHV-5 típusú ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> törzsben	110
7.6.3.1. Kísérlet leírása	110
7.6.3.2. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredménye	110
7.6.3.3. Ölési görbe	111
7.6.3.4. Farmakokinetikai adatok	111
7.6.3.5. Az egerek vérében a baktérium koncentráció meghatározása	112
7.6.3.6. Túlélési analízis	112
7.6.4. A3-APO peptid hatékonyságának vizsgálata szisztémás <i>Escherichia coli</i> fertőzésekben különböző egérmodellekben	114
7.6.4.1. Kísérletek leírása	114
7.6.4.2. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredménye	114
7.6.4.3. Toxicitási vizsgálat	114
7.6.4.4. A3-APO hatékonyságának vizsgálata bacteraemia modellel	115
7.6.4.5. Túlélési analízis	115
7.6.4.6. Az egerek vérében a baktérium koncentráció meghatározása	116
7.6.4.7. A3-APO hatékonyságának vizsgálata ciszplatinnal előkezelt bacteraemia modellel	116
7.6.4.8. Túlélési analízis	117
7.6.4.9. Az egerek vérében a baktérium koncentráció meghatározása	117

8.MEGBESZÉLÉS	119
8.1. Epidemiológia	119
8.1.1. Az első magyarországi ESBL-termelő <i>Klebsiella pneumoniae</i> törzsek által okozott esethalmozódás molekuláris epidemiológiai jellemzése	119
8.1.2. ESBL-termelő <i>Klebsiella spp.</i> ötéves követéses molekuláris epidemiológiai vizsgálatának eredménye a Semmelweis Egyetem II. Perinatalis Intenzív Centrumában	120
8.2. ESBL enzimek újabb fenotípusos és genotípusos detektálási lehetősége	122
8.2.1. ESBL enzimek fenotípusos detektálása <i>Enterobacter cloacae</i> törzsekben	122
8.2.2. ESBL enzimek újabb genotípusos detektálási lehetősége	124
8.3. Új ESBL enzimek izolálása és karakterizálása	126
8.4. Plazmidon kódolt kinolon-rezisztencia (<i>qnrA</i>, <i>qnrB</i>, <i>qnrS</i> és <i>aac(6')-Ib-cr</i>) gének vizsgálata ESBL-termelő <i>Enterobacteriaceae</i> törzsekben	129
8.5. Karbapenem rezisztens Gram-negatív baktériumok vizsgálata	131
8.5.1. Ertapenem rezisztens <i>Enterobacter cloacae</i> törzs vizsgálata	131
8.5.2. Ertapenem rezisztens <i>Klebsiella pneumoniae</i> és <i>Klebsiella oxytoca</i> törzs vizsgálata	132
8.5.3. Karbapenem rezisztens <i>Pseudomonas aeruginosa</i> és <i>Acinetobacter baumannii</i> törzsek vizsgálata	133
8.6. ESBL-termelő törzsek által okozott fertőzések terápiás lehetőségei kísérletes állatmodellben	136
8.6.1. A ciszplatin hatása az egér farmakokinetikai paramétereire	136
8.6.2. Imipenem, cefepim és amikacin hatékonyságának vizsgálata SHV-5 típusú ESBL-termelő <i>Klebsiella pneumoniae</i> törzsben	137
8.6.3. Ciprofloxacin és levofloxacin hatékonyságának vizsgálata SHV-5 típusú ESBL-termelő <i>Klebsiella pneumoniae</i> törzsben	138
8.6.4. A3-APO peptid hatékonyságának vizsgálata szisztémás <i>Escherichia coli</i> fertőzésekben különböző egérmodellekben	139
9. A TÉZISEK LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSA	141
9.1. Epidemiológiai vizsgálatok	141

9.2. ESBL enzimek újabb fenotípusos és genotípusos detektálási lehetősége	141
9.3. Új ESBL enzimek izolálása és karakterizálása	142
9.4. ESBL termelés és a csökkent kinolon érzékenység kapcsolata	142
9.5. Gram-negatív baktériumok karbapenem rezisztenciájának vizsgálata	143
9.6. ESBL-termelő törzsek által okozott fertőzések terápiás lehetőségei kísérletes állatmodellekben	143
10. IRODALOMJEGYZÉK	145
11. A DISSZERTÁCIO ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK ÉS ELŐADÁSOK	169
11.1. Közlemények	169
11.2. Idézhető kongresszusi absztraktok	172

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AP-PCR: arbitrarily primed polimerase chain reaction

AUC_{0-3h}: the area under the concentration-time curve from time zero to 3 hours; a koncentráció–idő görbe alatti területe a kiindulási időponttól 3 óráig

AUC₀₋₂₄: the area under the concentration-time curve from time zero to 24 hours; a koncentráció–idő görbe alatti területe a kiindulási időponttól 24 óráig

AUC_{0-∞}: the total area under the concentration-time curve from zero to infinity; a koncentráció–idő görbe alatti területe a kiindulási időponttól a végtelenig

AUC_{3h-∞}: the AUC from 3 hours to infinity; a koncentráció–idő görbe alatti területe a 3 órától a végtelenig

ÁEK: Állami Egészségügyi Központ

BEL: Belgium extended-spectrum β -lactamase

BES-1: Brazilian extended-spectrum β -lactamase

BSA: bovine serum albumin; marha szérum albumin

C_{max}: peak plasma concentration; a plazma csúskoncentrációja

C_{3h}: the concentration measured at 3 hours of treatment; három órás kezelést követően a koncentráció

CCCP: carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone

CD-1: egér species

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

CFU: colony forming unit

CI: confidence interval; konfidencia intervallum

CL: total body clearance; teljes test clearance

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CTX-M: cefotaximáz-Munich

DIM: Dutch imipenemase

DNA: deoxynucleid acid

dNTP: deoxynucleotid-triphosphat

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

ELISA: enzyme linked immunosorbent assay; enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat

ESBL: extended-spectrum β -lactamase, kiterjedt-spektrumú β -laktamáz

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

dc_112_10

FAM: 6-karboxi-fluoreszcein
FRET: fluorescence resonance transfer; fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer
GES: Guiana extended-spectrum
GIM: Germany imipenemase
HEX: 6-karboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaklorofluoreszcein
HPLC: high pressure liquid chromatography
IMI: imipenem-hydrolyzing β -lactamases
IMP: imipenemase
i.p.: intraperitoneális
ICU: intensive care unit; intenzív osztály
KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
LA: Luria agar
LB: Luria-Bertani
IEF: isoelectric focusing; izoelektromos fókuszálás
K_{el}: terminális eliminációs fázis
MBC: minimal bactericid concentration; minimális ölő koncentráció
MIC: minimal inhibitory concentration; minimális gátló koncentráció
MBL: Metallo- β -laktamáz
MH: Mueller-Hinton
MLST: multilocus sequence typing; multi-lókusz szekvencia tipizálás
MRT: mean residence time; közepes fennmaradási idő
NB: nutrient broth
NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards
NMC: not metalloenzyme carbapenemases
NMD: New-Delhi metallo- β -laktamáz
OMP: outer membrane protein; külső membrán fehérje
OXA: oxacillináz
PA β N: fenilalanil-arginil- β -naftilamid
PBP: penicillin-binding protein; penicillin-kötő fehérje
PIC: perinatal intensive centrum; perinatális intenzív osztály
pI: izoelektromos pont
PCR: polimerase chain reaction; polimeráz láncreakció
PER: *Pseudomonas* extended resistance
PFGE: pulsed field gel electrophoresis; pulzáló mezejű gélelektroforézis

dc_112_10

RFLP: restriction fragment length polymorphism; restrikciós fragmenthossz polimorfizmus

RR: relatív rizikó

RT-PCR: reverz transzkriptáz PCR

SDS-PAGE: sodium dodecyl szulfát polyacrylamid gél elektroforézis

SE: Semmelweis Egyetem

SFO: *Serratia fonticola*

SHV: sulfhydryl-variáns

SIM: Seoul imipenemase

SME: *Serratia marcescens* enzim

SNP: single-nucleotide polymorphism; egy pontos nukleotid polimorfizmus

SPM: San Paolo metallo- β -laktamase

TAMRA: 6-karboxi-tetrametilrodamin

TEM: Temoniera (beteg neve)

TLA: TLAhuicas (beteg neve)

$T_{1/2}$: féleletidő

TSB: Tryptic Soy Broth

UV: ultraviola

VEB: Vietnamese extended-spectrum β -lactamase

VIM: Verona-imipenemase

2. TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE

1. táblázat	A bakteriális β -laktamáz enzimek klasszifikációja	23
2. táblázat	Real-time PCR SNP genotipizálás során használt primerek és próbák	44
3. táblázat	Real-time PCR során használt primerek	45
4. táblázat	Az izolált ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> törzsek jellemzése	52
5. táblázat	Az ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> törzsek (ESBL-KP), az ESBL-termelő <i>S. marcescens</i> és az <i>E. coli</i> Dh5 α MIC (μ g/ml) értékei	53
6. táblázat	Az ESBL-termelő <i>Klebsiella</i> speciesek által okozott fertőzések rizikófaktorainak összehasonlítása	56
7. táblázat	A nem ESBL-termelő <i>Klebsiella</i> speciesek által okozott fertőzések rizikófaktorainak összehasonlítása	57
8. táblázat	Az ESBL-termelő <i>Klebsiella</i> törzsek antibiotikum érzékenysége	58
9. táblázat	Az SE II. PIC-en izolált <i>Klebsiella</i> törzsek jellemzői	58
10. táblázat	ESBL-termelő <i>E. cloacae</i> izolátumok tulajdonságai	62
11. táblázat	A nem ESBL-termelő <i>E. cloacae</i> törzsek antibiotikum érzékenysége, MIC (μ g/ml)	63
12.a táblázat	Az ESBL-termelő <i>E. cloacae</i> izolátumok MIC értékei	63
12.b táblázat	Az ESBL-termelő <i>E. cloacae</i> izolátumok MIC értékei	64
13. táblázat	A különböző korongdiffúziós módszerek eredményének megoszlása	66
14. táblázat	A NCCLS által ajánlott érzékenységi tesztek eredményei versus az E-tesztek alapján megállapított MIC-értékek megoszlása, mint az ESBL detektálás és a fenotípusos megerősítés eszköze	66
15. táblázat	A cefepim alkalmazása az ESBL-termelés indikátoraként	68
16. táblázat	Az SNP vizsgálat során használt törzsek és az általuk termelt β -laktamáz enzimek	70
17. táblázat	Az ES24 és a transzformáns <i>E. coli</i> EP-MAX10B antibiotikum érzékenysége	70
18. táblázat	SHV pozitív izolátumok 692 és 711 pozíció közötti nukleotid szekvenciáinak összehasonlítása és az allél diszkriminációs vizsgálat eredménye	73
19. táblázat	TEM-63 és TEM-131-termelő <i>Salmonella</i> spp. MIC értékei (μ g/ml)	75

20. táblázat	Különböző plazmidokat tartalmazó <i>E.coli</i> DH5 α törzs antibiotikum érzékenysége, MIC ($\mu\text{g/ml}$) plazmid nélkül (Tf-) és plazmiddal (Tf+)	76
21. táblázat	SHV-típusú β -laktamáz enzimek aminosav szekvenciája a különböző pozíciókban	77
22.a táblázat	Különböző SHV mutánsokat tartalmazó pBCSK plazmiddal rendelkező <i>E. coli</i> DH10B MIC ($\mu\text{g/ml}$) értékei mikrodilúcióval meghatározva	78
22.b táblázat	Különböző SHV mutánsokat tartalmazó pBCSK plazmiddal rendelkező <i>E. coli</i> DH10B MIC ($\mu\text{g/ml}$) értékei mikrodilúcióval meghatározva	78
23.a táblázat	Különböző SHV mutánsokat tartalmazó pBCSK plazmiddal rendelkező <i>E. coli</i> DH10B MIC ($\mu\text{g/ml}$) értékei E-tesztel meghatározva	79
23.b táblázat	Különböző SHV mutánsokat tartalmazó pBCSK plazmiddal rendelkező <i>E. coli</i> DH10B MIC ($\mu\text{g/ml}$) értékei E-tesztel meghatározva	80
24. táblázat	Az SHV-1, SHV-2 és SHV-30 kinetikai paraméterei	80
25. táblázat	A tisztított SHV-1, SHV-2 és SHV-30 tazobaktámra vonatkozó K_d értékei	81
26. táblázat	A termelt SHV enzim mennyiségének meghatározása ELISA-val	82
27. táblázat	Az <i>E. coli</i> DH10B törzs MIC értékei a <i>bla</i> _{CTX-M-2/59} plazmidokkal	83
28. táblázat	A <i>qnr</i> -pozitív törzsek MIC értékei	87
29. táblázat	A konjugált baktériumok jellemzői	88
30. táblázat	A <i>qnr</i> -pozitív törzsek által termelt β -laktamáz enzimek jellemzői	89
31. táblázat	A PA β N efflux-pumpa inhibitor hatása különböző <i>E. cloacae</i> törzsek antibiotikum érzékenységére	90
32. táblázat	Az <i>acrB</i> , <i>ompD</i> és <i>ompF</i> expresszió RT-PCR elemzése	92
33. táblázat	A <i>K. pneumoniae</i> KP3686, <i>K. oxytoca</i> KO5294/9, <i>E. coli</i> DH5 α és transzformált <i>E. coli</i> DH 5 α törzsek jellemzői	96
34. táblázat	A <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i> és <i>K. pneumoniae</i> törzsek antibiotikum érzékenysége	99
35. táblázat	Az izolált Gram-negatív baktérium törzsek jellemzői	99
36. táblázat	Az egerek plazma kreatinin, urea nitrogén és fehérvérsejt száma különböző ciszplatin dózisoknál	102
37. táblázat	80 mg/kg i.p. cefepim dózis farmakokinetikai paraméterei (középérték $\pm$ standard eltérés) egerekben különböző dózisú ciszplatin előkezelés után	103

38.a táblázat Antibiotikumok farmakokinetikai paraméterei i.p. injekciót követően csökkent vesefunkciójú nem fertőzött egereknél	105
38.b. táblázat Antibiotikumok farmakokinetikai paraméterei i.p. injekciót követően csökkent vesefunkciójú nem fertőzött egereknél	106
39. táblázat Az ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> törzs ciprofloxacin és a levofloxacin MIC- és MBC-értékei (µg/ml)	110
40. táblázat A ciprofloxacin és levofloxacin farmakokinetikai paraméterei i.p. injekciót követően egerekben	111

3. ÁBRÁK JEGYZÉKE

1. ábra	A β -laktám gyűrű	19
2. ábra	A β -laktamáz enzim hatásmechanizmusa	22
3. ábra	ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> , nem ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> izolátumok, illetve egyéb <i>Enterobacteriaceae</i> izolátumok gyakorisága a szolnoki PIC-en 1998. január és november között	49
4. ábra	Az ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> fertőzések száma és incidenciája a szolnoki PIC-en 1998. májusa és novembere között	50
5. ábra	Az ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> -val (A1-es pattern) fertőzött betegek felvételének és elbocsátásának epidemiológiai grafikonja a szolnoki PIC-en	51
6. ábra	A szolnoki PIC-en izolált 15 klinikai és az egy környezeti eredetű ESBL termelő <i>K. pneumoniae</i> törzsek ERIC-2 primerrel végzett AP-PCR-es képe	54
7. ábra	ESBL-termelő <i>Klebsiella</i> törzsek időbeli eloszlása a SE II. PIC-en	59
8. ábra	Az ESBL-termelő <i>E. cloacae</i> törzsekből származó plazmidok	65
9. ábra	A vizsgált <i>E. cloacae</i> törzsek MIC értékeinek eloszlása	67
10. ábra	Plazmid izolálás az <i>E. cloacae</i> ES24 törzsből	71
11. ábra	Izoelektromos fókuszálás	71
12. ábra	Az <i>E. cloacae</i> ES24 törzs szekvenciája az SHV enzim génjének 691-es és 711 pozíciója között	72
13. ábra	Allél diszkrimináció	74
14. ábra	Az Arg43Ser-Gly238Ser és Ile8Phe- Arg43Ser-Gly238Ser SHV-variánsokat tartalmazó <i>E. coli</i> DH10B sejtek immunoblottolásának eredménye	82
15. ábra	Az ESBL-termelő <i>Enterobacter</i> spp. kumulatív MIC ($\mu\text{g/ml}$) értéke	85
16. ábra	Az ESBL-termelő <i>Klebsiella</i> spp. kumulatív MIC ($\mu\text{g/ml}$) értéke	85
17. ábra	Az ESBL-termelő <i>E. coli</i> törzsek kumulatív MIC ($\mu\text{g/ml}$) értéke	86
18. ábra	Az ES24 és ER24 <i>E. cloacae</i> izolátumokból izolált külső membrán fehérjék SDS-PAGE képe	91
19. ábra	Az ES24 és ER24 <i>E. cloacae</i> izolátumok által termelt β -laktamáz enzimek izoelektromos pontjainak meghatározása	91
20. ábra	Az OmpD és OmpF fehérjék relatív transzkripció szintje	93
21. ábra	Cefepim szérumkoncentráció középértékek egerekben ciszplatin előkezeléssel és anélkül és a humán adatok	104

22. ábra	ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> ölési görbék antibiotikum nélküli, cefepimmal, amikacinnal, imipenemmel és amikacin-cefepimmal történő inkubáció esetén	107
23. ábra	Baktérium-koncentrációk közéértéke kezeletlen, illetve amikacinnal, amikacin-cefepimmal, cefepimmal és imipenemmel kezelt egerek vérében ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> -vel történő fertőzés után	107
24. ábra	ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> -vel fertőzött, amikacinnal, cefepimmal, cefepim-amikacinnal és imipenemmel kezelt egerek túlélési görbéje	108
25. ábra	Antibiotikum nélkül, ciprofloxacinnal és levofloxacinnal inkubált ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> in vitro ölési görbéi	111
26. ábra	ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> -vel történő fertőzést követő baktérium koncentrációk kezeletlen és ciprofloxacinnal illetve levofloxacinnal kezelt egerekben	112
27. ábra	ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> -vel fertőzött, ciprofloxacinnal illetve levofloxacinnal kezelt egerek túlélési görbéje	113
28. ábra	<i>E. coli</i> 5770 törzzsel fertőzött majd A3-APO-val és imipenemmel kezelt egerek túlélése	115
29. ábra	A vérben a baktérium koncentrációk az A3-APO-val kezelt <i>E. coli</i> 5770 törzzsel fertőzött CD-1 egerekben cisplatinos előkezelés nélkül	116
30. ábra	A vérben a baktérium koncentrációk az A3-APO-val kezelt <i>E. coli</i> 5770 törzzsel fertőzött CD-1 egerekben cisplatinos előkezeléssel	117
31. ábra	Az SHV-1 β -laktamáz enzim háromdimenziós szerkezete	127

4. BEVEZETÉS

4.1. A penicillin története

Már az ősi kultúrákban is ismerték a penészgomba jótékony hatását. Az egyiptomiak, ókori görögök is használtak már gombákat és növényeket fertőzések kezelésére. I.e. 150 évvel Sri-Lankán a katonák a tűzhely kürtőjében szárított olajos pogácsát használtak sebeik kezelésére. Feltehetően a sütemények egyszerre szolgáltak nedvszívóként és antibakteriális szerként is.

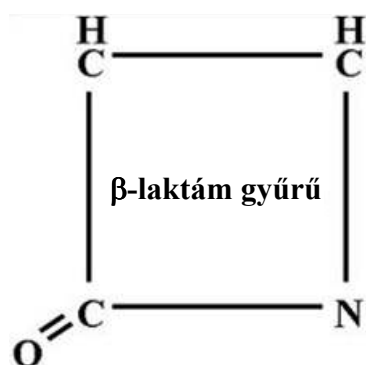
A penicillin felfedezését rendszerint a skót Alexander Fleming nevéhez kötik, habár korábban már mások is - Sir John Scott Burdon-Sanderson, Joseph Lister, Louis Pasteur, Ernest Duchesne - észrevették a *Penicillium* antibakteriális hatását. 1928-ban Fleming azt tapasztalta, hogy a *Staphylococcus* tenyészetében a kék-zöld penész körül gátlási zóna alakult ki. A gombát magát *Penicillium notatum*ként azonosította. Fleming kezdetben nagyon optimista volt a penicillin fertőzésekkel szembeni hatékonyságát illetően, ráadásul a szernek minimális toxikus hatása volt az akkori szerekhez képest. Már ebben a korai szakaszban megállapították, hogy a penicillin leginkább a Gram-pozitív baktériumok ellen hatásos, ellenben a Gram-negatív szervezetekre és a gombákra hatástalan. További kísérletei után azonban Fleming úgy vélte, hogy a penicillin nem tud elegendően hosszú ideig az emberi szervezetben maradni ahhoz, hogy a patogén baktériumokat elpusztítsa. Ezért 1934-ben kezdte újra a klinikai kísérleteket és 1940-ben sikerült tisztított formában előállítani a szert. 1939-ben az ausztrál tudós Howard Walter Florey és kutatócsapata az Oxfordi Egyetem Patológiai Intézetében nagy előrelépést tett, kísérleteik alátámasztották a penicillin ártalmatlanságát, sőt egereken sikeresen alkalmazták a szert. A humán felhasználásra tett kísérleteik azonban kudarcot vallottak, mivel nem állt rendelkezésre elegendő mennyiségű hatóanyag. A penicillin első kísérleti felhasználására az oxford-i Radcliffe kórházban került sor. Embert a világon először 1942. március 14-én John Bumstead és Orvan Hess kezelt sikeresen penicillinnel.

A penicillin kémiai struktúráját Dorothy Crowfoot Hodgkin határozta meg az 1940-es évek elején, lehetővé téve így a szer szintetikus előállítását. Az ausztrál Howard Walter Florey vezetésével valamint Ernst Boris Chain és Norman Heatley részvételével egy oxfordi kutatócsoport fedezte fel, hogyan lehet a penicillint ipari méretekben előállítani.

Florey és Chain 1945-ben Fleminggel megosztva kaptak orvosi Nobel-díjat. Azóta is a penicillin a legszélesebb körben használt antibiotikum, melyet ma is számos Gram-pozitív baktérium által okozott fertőzésnél használnak.

4.2. β -laktám antibiotikumok

Valamennyi β -laktám antibiotikumok közös szerkezeti eleme β -laktám gyűrű, mely integritása szükséges az antibakteriális hatáshoz. Több támadásponton keresztül gátolják a baktériumsejtfal peptidoglikán vázának a felépítését, így a baktériumfal szintézise megszakad (baktericid hatás). Csak azokra a kórokozókra hatnak, amelyek osztódásukkor aktív peptidoglikán-szintézist folytatnak. A nem szaporodó mikroorganizmusok, illetve a sejtfal nélküliek (L-forma) ellenállóak. A Gram-pozitív



baktériumok peptidoglikánja könnyen hozzáférhető a β -laktámok számára, a Gram-negatív baktériumok peptidoglikánját fehérjeréteg védi, ezért gyakrabban ellenállóak.

Ide soroljuk a penicillineket, cefalosporinokat, karbapenemeket és monobaktámokat.

1. ábra A β -laktám gyűrű

4.2.1. Penicillinek

Az eredeti penicillin G a *Penicillium notatum* anyagcsereterméke, szerkezetében β -laktám- és tiazolidin-gyűrű is van, melynek 6-os szénatomjához oldallánc kapcsolódik. A szemisztetikus penicillineknél az oldallánc-mentes 6-amino-penicillánsavhoz csatolják a különböző oldalláncokat. A különböző módosításokkal létrehozott készítmények a retard készítmények (pl.: procain penicillin), az orálisan adható készítmények (pl.: penicillin-V, a laktamáz-stabil penicillinek (pl.: methicillin), az aminopenicillinek (pl.: ampicillin, amoxycillin), az egyéb szélesspektrumú penicillinek (pl.: carbenicillin) és ureidopenicillinek (pl.: piperacillin).

4.2.2. Cefalosporinok

Az első cefalosporint Brotzu izolálta 1945-ben egy szennyvízcsatornából kitenyésztett gombából a *Cephalosporium acremonium*, ma *Acremonium brotzu*-ból. Ezután közel húsz év telt el mire az első gyógyszerként alkalmazott cefalosporin származék, a cephalotin forgalomba került.

A cefalosporinok alapvegyülete a 7-amino-cefalosporánsav. Akárcsak a penicillinek, a baktériumsejtfal felépítését akadályozzák a PBP-hez (penicillin binding protein, penicillin-kötő fehérje) való kötődésükkel. Széles spektrumú, baktericid hatású, jó farmakokinetikájú, nem toxikus antibiotikumok; a penicillinnél kevésbé allergizálnak, széles antimikróbás hatásspektrumuk és atoxicitásuk következtében széleskörben használtak.

A cefalosporinokat megjelenésük időpontja és meghatározó tulajdonságaik szerint generációkba sorolják. Az egyes generációk hatásspektruma eltér egymástól, de az azonos generációhoz tartozó készítmények spektruma hasonló, a szerek egymástól farmakokinetikai tulajdonságaikban különbözhetnek.

Az első generációs származékok legerősebben a *Staphylococcusok* PBP-jeihez kötődnek, míg a második és még inkább a harmadik, negyedik generáció tagjai a Gram-negatív pálcák PBP-jéhez kötődnek.

A cefalosporinok ellenállnak a *Staphylococcus* által termelt β -laktamáz hatásának; a második és harmadik generációs származékok már fokozódó mértékben stabilak a Gram-negatív pálcák (sőt, egyesek – pl. cefoxitin – bizonyos anaerobok) β -laktamázaival szemben is.

4.2.3. Karbapenemek

A karbapenemek alapváza hasonlít a penicillinekéhez, de a tiazolidin gyűrűben egy kettős kötés található és szén helyettesíti a kén atomot. Eddig négy származék került klinikai felhasználásra, időrendben az imipenem, meropenem, ertapenem és a doripenem.

A PBP-hez való kötődés révén a baktériumfal felépítését gátolják. A baktériumok β -laktamáz enzimeivel szemben rendkívül ellenállóak, ugyanakkor indukálják termelődésüket.

4.2.4. Monobaktámok

Az aztreonam az első monobaktám antibiotikum. Egyetlen β -laktám-gyűrűből áll, amelyhez hatásfokozó oldalláncok csatlakoznak.

A Gram-negatív baktériumok PBP-jához kötődik, Gram-pozitív baktériumokra és anaerobokra nem hat.

4.2.5. β -laktamáz gátlók

A β -laktamáz gátlók – klavulánsav, tazobaktám, szulbaktám – olyan β -laktám vegyületek, melyek saját antibakteriális hatása kicsi, de hatástalanítják a baktériumok β -laktamáz enzimeit.

4.3. Az antibiotikum-rezisztencia alapja

Rezisztens baktériumnak nevezzük azt a baktériumot, amely valamely adott antibiotikum jelenlétében is szaporodásra, fertőzésre képes. A rezisztencia egy adott baktériumra jellemző tulajdonság. A kórokozók antibiotikum rezisztenciájának alapvetően két típusát ismerjük: a természetes és a szerzett rezisztenciát. A természetes rezisztencia állandó örökletes tulajdonság, speciesekre vagy nagyobb rendszertani egységekre jellemző és ismert előre látható tulajdonság pl. a baktérium szerkezeti tulajdonsága miatt ellenálló az adott antibiotikummal szemben.

Problémát elsősorban a szerzett antibiotikum rezisztencia jelent, melynek során a baktériumok alkalmazkodnak és megtanulnak együtt élni a számukra kedvezőtlen kémiai környezettel. Ezáltal az antibiotikumok részben vagy teljes mértékben elveszítik hatékonyságukat az adott baktérium fajjal vagy törzsszel szemben. Ez a természetes érzékenységi spektrum örökletes megváltozásával jár egy generáción belül.

4.4. A β -laktám rezisztencia

A penicillinek felfedezését követően hamarosan megjelentek a rezisztens törzsek, már Fleming maga is észlelt penicillinre rezisztens törzseket. A β -laktám antibiotikumokkal szemben kialakult rezisztencia hátterében többféle mechanizmus állhat: β -laktamáz

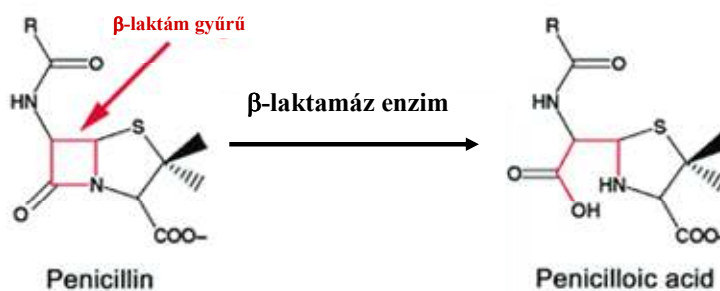
termelés, permeabilitás változás (külső membrán fehérje változás), target megváltozás (PBP megváltozása), efflux mechanizmus, illetve ezek a mechanizmusok együttesen is jelen lehetnek.

4.3.1. A β -laktamáz termelés

A leggyakoribb rezisztencia mechanizmus a baktériumok β -laktamáz enzim termelése.

A Gram-negatív baktériumok által termelt β -laktamáz enzim a periplazmatikus térben, intracellulárisan helyezkedik el. Az enzimek a

2. ábra A β -laktamáz enzim hatásmechanizmusa



β -laktám gyűrűt hidrolízissel hasítják, majd acetilált enzim jön létre, melyből a β -laktamáz enzim felszabadul, regenerálódik és képes újabb antibiotikum molekulához kötődni (292).

A β -laktamáz enzimek osztályozása történhet hidrolízisük alapján, gátlószerekkel szembeni érzékenységük, izoelektromos pontjuk, aminosav szekvenciájuk, génszekvenciájuk, genetikai hátterük (kromoszómális, illetve extrakromoszómális), illetve molekuláris szerkezetük (A-D) alapján. A legfrissebb osztályozás a Bush-Jacoby féle osztályozás, melyben az előbb felsorolt szempontok alapján az enzimeket négy (1-4) nagy csoportba osztják (32) (**1. táblázat**).

Jelenleg az ismert β -laktamáz enzimek száma meghaladja a négyszázat. A továbbiakban részletesen csak azok az enzimek kerülnek ismertetésre, melyekkel munkánk során találkozunk, így a kromoszómális AmpC enzimek, a széles-spektrumú β -laktamázok, a kiterjedt-spektrumú β -laktamázok és a karbapenemázok közül a KPC karbapenemáz és a metallo- β -laktamázok.

4.3.1.1. Széles-spektrumú β -laktamázok

Az első klinikai mintából izolált plazmidon kódolt széles-spektrumú β -laktamáz enzimet (Bush 2b csoport) - TEM-1 enzimet - először az 1960-as években Görögországban izolálták *Escherichia coli* törzsből (67). A TEM elnevezés a beteg nevéből - Temoniera

1. táblázat A bakteriális β -laktamáz enzimek klasszifikációja

Bush-Jacoby féle felosztás (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros féle felosztás (1995)	Molekuláris osztály	Elsődleges szubsztát	Gátlószer		Jellegzetes tulajdonság	Jellegzetes enzim
				CA vagy TZP	EDTA		
1	1	C	Cephalosporinok	Nem	Nem	Jobban hidrolizálja a cephalosporinokat, mint a benzylpenicillint, hidrolizálja a cephamycineket	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NT	C	Cephalosporinok	Nem	Nem	Ceftazidim és gyakran más oxyimino cephalosporinok nagyobb mértékű hidrolizise	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillinek	Igen	Nem	Jobban hidrolizálja a benzylpenicillint, mint a cephalosporinokat	PC2
2b	2b	A	Penicillinek, korai cephalosporinok	Igen	Nem	Benzylpenicillin és cephalosporinok azonos mértékű hidrolizise	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Kiterjedt-spektrumú cephalosporinok, monobaktámok	Igen	Nem	Oxyimino- β -laktámok (cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxon, cefepim, aztreonam) megnövekedett hidrolizise	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillinek	Nem	Nem	Klavulánsav, szulbaktám és tazobaktám rezisztens	TEM-30, SHV-10
2ber	NT	A	Kiterjedt-spektrumú cephalosporinok, monobaktámok	Nem	Nem	Oxyimino- β -laktámok megnövekedett hidrolizise klavulánsav, szulbaktám és tazobaktám rezisztenciával	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Igen	Nem	Carbenicillin megnövekedett hidrolizise	PSE-1, CARB-3
2ce	NT	A	Carbenicillin, cefepime	Igen	Nem	Carbenicillin, cefepim és cefpirom megnövekedett hidrolizise	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Változó	Nem	Cloxacillin vagy oxacillin megnövekedett hidrolizise	OXA-1, OXA-10
2de	NT	D	Kiterjedt-spektrumú cephalosporinok	Változó	Nem	Cloxacillin vagy oxacillin és oxyimino- β -laktámok hidrolizise	OXA-11, OXA-15
2df	NT	D	Karbapenemek	Változó	Nem	Cloxacillin vagy oxacillin és karbapenemek hidrolizise	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Kiterjedt-spektrumú cephalosporinok	Igen	Nem	Cephalosporinok hidrolizise, aztreonamot nem hidrolizálja, klavulánsavval gátolható	CepA
2f	2f	A	Karbapenemek	Változó	Nem	Karbapenemek, oxyimino- β -laktámok, cephamycinek megnövekedett hidrolizise	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Karbapenemek	Nem	Igen	Széles spektrumú hidrolizis, ami érinti a karbapenemeket is, de a monobaktámokat nem	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	3	B (B3)	Karbapenemek	Nem	Igen	Karbapenemek hidrolizise	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
NT	4	B (B2)	Karbapenemek	Nem	Igen	Karbapenemek hidrolizise	CphA, Sfh-1

CA: klavulánsav; TZP: tazobaktám; NT: nem tartalmazza

– származik (177). A TEM-1 enzim, illetve a belőle mutációval kialakult TEM-2 enzim gyorsan elterjedt egyéb baktérium fajok között is. A TEM-1, TEM-2 enzimet világszerte kimutatták az *Enterobacteriaceae* család különböző specioseiben, valamint *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, és *Neisseria gonorrhoeae* törzsekben. A másik szintén plazmidon terjedő széles-spektrumú β -laktamáz enzimet, az

SHV-1 enzimet (mely az enzim aktív helyen elhelyezkedő sulhydryl csoportról kapta a nevét) elsősorban *Klebsiella pneumoniae* és *E. coli* törzsekben figyelték meg. Míg a legtöbb *K. pneumoniae* törzsben a *bla_{SHV}* gén integrálódott a bakteriális kromoszómába, addig az *E. coli* törzsekben általában plazmidon kódolt maradt. A TEM-1, TEM-2 és SHV-1 típusú széles-spektrumú β -laktamáz enzimek hidrolizálni képesek a Gram-negatív ellenes penicillin származékokat (kivéve temocillint), az első és második generációs cefalosporinokat, azonban a harmadik generációs cefalosporinok, a cephamicinek, a monobaktámok és a karbapenemek stabilak maradtak velük szemben.

A TEM és SHV típusú enzimek elsősorban *E. coli* és *K. pneumoniae* (297, 304) törzsekben fordulnak elő, azonban az *Enterobacteriaceae* család egyéb tagjai között is leírták, mint például: *Enterobacter* spp. (14, 102, 134, 170, 270, 279), *Morganella morganii* (7, 273), *Proteus mirabilis* (221), *Proteus rettgeri* (172), *Providencia* spp., *Salmonella* spp. (28, 108, 143, 184, 296), valamint *P. aeruginosa* speciesben is (171, 187, 230, 282).

Az OXA-enzimek egy viszonylag új csoportja a β -laktamáz enzimeknek. Nagy mértékben különböznek a TEM illetve SHV csoporttól, kevesebb, mint 20% szekvencia azonosság figyelhető meg. Aktivitásuk klavulánsavval nem gátolható, ellentétben a TEM, SHV és CTX-M típusú ESBL enzimekkel. Számos OXA-enzim (OXA-1, OXA-2, OXA-10) is széles-spektrumú aktivitással bír. Elsősorban *P. aeruginosa* törzsekben figyelhető meg (45, 126, 128, 162, 182, 303) de *Salmonella* törzsekben is leírták (108).

4.3.1.2. Kromoszomális enzimek

A Gram-negatív baktériumok között elterjedt a kromoszomális gének által kódolt β -laktamáz enzimek termelése is. A speciesek egy része a class A” enzimet termeli, de sokkal inkább elterjedt a “class C” típusú enzim termelése.

A leggyakoribb ilyen enzim az ún. AmpC, mely termelésének mértéke és típusa az egyes fajoknál különböző. Az *E. coli* és a *Shigellák* kis mennyiségben és elhanyagolható aktivitással intrinsic módon, azaz velük született tulajdonságként termelik (199, 268). A *Proteus morganii*-ra az enzim túltermelése, hiperprodukcója jellemző. Más fajok, pl.: *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. és *Citrobacter freundii* az enzimet intrinsic és indukálható módon termelik (258). Ez azt jelenti, hogy alacsony szintű enzimtermelés bizonyos antibiotikum jelenlétében magas szintűvé válik. Az enzimtermelés mértéke

antibiotikum függő, az antibiotikumok lehetnek erős és gyenge induktorok. A baktériumokban kialakuló rezisztencia képet az antibiotikum indukáló képessége és az AmpC enzimmel szembeni hatékonysága határozza meg. pl. a karbapenemek erős induktorok, de ellenállnak az AmpC enzimnek, így hatékonyak maradnak; a III. generációs cefalosporinok ugyan elbomlanak az enzim hatására, de gyenge induktorok (258).

Az indukálható β -laktamáz termelő törzsekből a III. generációs cefalosporinok hatására ún. derepresszált mutánsok szelektálódnak, melyekre már az AmpC enzim magas szintű és állandó termelése a jellemző. Ezek a törzsek csak a karbapenemekre és alkalmanként a IV. generációs cefalosporinokra maradnak érzékenyek (164).

Az AmpC enzimet kódoló génnek egyre gyakrabban kerülnek át plazmidokra különböző Gram-negatív speciosekben. Ilyenkor az AmpC termelése magas szintű és állandó, így ezeknek a baktérium törzseknek rezisztenciája megegyezik a derepresszált mutáns törzsek rezisztenciájával (25, 108, 272).

4.3.1.3. Kiterjedt-spektrumú β -laktamázok- extended-spectrum β -lactamase -ESBLs

Több olyan β -laktám antibiotikumot fejlesztettek ki a Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzések kezelésére, melyek ellenállnak az előbb említett széles-spektrumú β -laktamáz enzimek hidrolitikus hatásának. Az egyik ilyen csoport, az oxyimino-cefalosporinok csoportja, melyeket az 1980-as években kezdtek széles körben alkalmazni a klinikumban. Hamarosan megjelentek azonban az ezekre is rezisztenciát mutató mikrobák. Az első olyan β -laktamáz enzimet, mely képes volt hidrolizálni az oxyimino-cefalosporinokat is, 1985-ben izolálták Németországban *K. pneumoniae* törzsből (138). Szubsztrátspektruma alapján extended-spectrum β -lactamase (kiterjedt-spektrumú β -laktamáznak)-ESBL-nek nevezték el (Bush csoport 2be). Ezen enzimek hidrolizálják a Gram-negatív ellenes penicillin származékokat, az első, második, harmadik és negyedik generációs cefalosporinokat és a monobaktámokat is. Nem képesek azonban hidrolizálni a cephamycineket és a karbapenemeket. Aktivitásuk *in vitro* különböző enzim gátlószerekkel - klavulánsav, tazobaktám, szulbaktám - jól gátolható (222). Ma már több mint 400 különböző ESBL enzim ismert. Ezek az enzimek világszerte jelen vannak, elsősorban plazmid által kódoltak. Főleg az

Enterobacteriaceae család tagjai között elterjedtek, de *P. aeruginosa* törzsekben is megfigyelték őket.

4.3.1.3.1. TEM- és SHV-típusú ESBL-ek

A ESBL enzimek nagy csoportja az ún. TEM illetve az SHV csoportba tartozik. Ma már több, mint 190 féle TEM enzim és több, mint 150 SHV enzim ismert (www.lahey.org, <http://www.laced.uni-stuttgart.de/>, http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/beta_lact_en.html.) Ezen enzimek aminosav szekvenciája nagyon hasonló az ún. “parent” enzimek TEM-1, TEM-2 és SHV-1 aminosav szekvenciájához, csak 1-7 aminosav eltérés figyelhető meg (32). Bár ez a mutáció kevesebb, mint 2%-os változást jelent a fehérje molekulában, de mivel ezek az enzim aktív helyét érintik, a változás elég ahhoz, hogy az enzim szubsztrát spektrumának kiszélesedését, a kiterjedt spektrum megjelenését okozzák (32, 121, 265).

Az *Enterobacteriaceae* családban az ESBL termelés többféleképpen alakulhat ki. Egyrészt a TEM és SHV típusú β -laktamázok aktív helyének szerkezetét befolyásoló mutációkkal, a β -laktamáz enzim széles-spektrumú szubsztrát specificitásának bővítésével, illetve horizontális transzferrel az ESBL termelésért felelős gének felvételével.

Az 1990-es évek végéig Európában a legtöbb ESBL TEM- és SHV- típusú volt, és többnyire intenzív osztályokon kialakult nozokomiális járványból származott (11, 88, 91, 105, 206, 239). A TEM- és SHV- típusú ESBL termelés prevalenciája a *K. pneumoniae* törzsek között volt a legmagasabb, de gyakran fordult elő *Enterobacter* spp.-ben és *E. coli* törzsekben is (24, 43, 83, 167, 304). Azonban idővel sajnos az ESBL-termelés megjelent olyan törzsekben, mint a *K. oxytoca*, ahol korábban ez igen ritka volt (289).

4.3.1.3.2. CTX-M-típusú ESBL-ek

Az utóbbi években az ESBL-ek egy új csoportja, az ún. cefotaximase (cefotaximase-Munich: CTX-M) típusú ESBL enzimek jelentek meg, melyeknek elsődleges szubsztrátja a cefotaxim és ceftriaxon, és nem hidrolizálják a ceftazidimet (9). Az CTX-M típusú ESBL elsődleges gátlószere a tazobaktám. A CTX-M típusú β -laktamázokat kódoló gének (*bla*_{CTX-M}) a *Kluyvera* genus kromoszómális génjéből származnak (252). Öt csoportjuk - a CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 és CTX-M-25 - ismert, illetve ezeknek a származékaik. Jelenleg több mint 85-féle CTX-M típusú enzim ismert, melyek mutációval alakultak ki az eredeti enzimből (18). Ezeknek az enzimeknek az

aminosav szekvenciája csak 40%-ban azonos a TEM és SHV típusú β -laktamázokkal. A *bla*_{CTX-M} gén horizontális terjedése az *Enterobacteriaceae* családban plazmid útján történik és gyakran egyéb rezisztencia géneket is hordoz (3). Az utóbbi 15 évben a CTX-M típusú ESBL-ek körében gyors és globális terjedés tapasztalható (184). Gyakran fordul elő Ázsiában, ritkábban Észak-Amerikában (114, 129, 186, 190, 195, 209). Európában a CTX-M-15-t termelő *E. coli* O25:H4-ST131 klón a domináns közösségekben szerzett infekciókban (15, 47, 82, 145, 195, 253).

4.3.1.3.3. OXA-típusú ESBL-ek

Az OXA-11, OXA-14, OXA-16 és OXA-17, OXA-18, OXA-28 stb kiterjedt-spektrumú aktivitással bírnak és a klavulánsav nem gátolja az aktivitásukat (45, 63-66, 106, 126, 162, 182, 223, 228, 229, 276, 303).

4.3.1.3.4. Minor ESBL-ek

Egyéb ritkán előforduló ESBL enzimek az ún. minor ESBL enzimek. Ezen enzimek esetében több, mint 20 félért írtak le: VEB- (Vietnamese extended-spectrum β lactamase) (226, 236); GES-, (Guiana extended-spectrum) (19, 141, 227); PER- (*Pseudomonas* extended resistance) (100, 198); SFO-1, (*Serratia fonticola*) (84, 176); TLA-, (TLAhuicas) (99, 263); BES-1, (Brazilian Extended-Spectrum β -lactamase) (17); BEL- (Belgium Extended-spectrum β -Lactamase) (231, 234), illetve ezek származékait, melyek csak 20-50%-os homológiát mutatnak a többi csoporttal. Ellentétben a TEM-, SHV- és CTX-M- típusú enzimekkel nem rendelkeznek progenitor enzimmal, melyből mutációval kialakulhattak volna, eredetük többségében még nem tisztázott.

A PER-1 termelő *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Salmonella enterica* törzseket leggyakrabban Törökországban írták le (36, 62, 161, 284-286), a PER-2 termelő törzseket pedig Dél-Amerikában (40, 214, 290).

4.3.1.4. Karbapenemázok

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.

4.3.1.4.1. *K. pneumoniae* karbapenemáz (KPC)

Az egyik legjelentősebb karbapenemáz az „A” molekuláris osztályba tartozó szerin típusú KPC (*K. pneumoniae* karbapenemáz) karbapenemáz enzim, melyet 2001-ben először *K. pneumoniae* törzsből izoláltak. A KPC enzimek klavulánsavval gátolhatók. A KPC enzim az *Enterobacteriaceae* család karbapenem rezisztenciájának leggyakoribb oka az Egyesült Államokban (26, 240, 283).

4.3.1.4.2. Metallo- β -laktamázok

Szintén nagyon jelentős karbapenemázok a „B” molekuláris osztályba tartozó metallo β -laktamázok (MBL), melyek a monobaktám kivételével az összes β -laktám antibiotikumra kiterjedő rezisztenciát okoznak és aktivitásuk EDTA-val (etilén-diamin-tetraecetsav) függeszthető fel. Az MBL-enzimek számos típusát azonosították: IMP- (imipenemase) (52, 74), VIM- (Verona imipenemase) (53, 251), SPM- (San Paolo metallo- β -lactamase) (255, 275), GIM- (Germany imipenemase) (38), DIM (Dutch imipenemase) (235); SIM- (Seoul imipenemase) (150), NDM- (New-Delhi metallo- β -lactamase) (307). A különböző típusok között 32-67% szekvencia azonosság figyelhető meg.

Az MBL-gének általában a class-1 integron részei, más rezisztencia-géneket tartalmazó géncsoportokkal együtt. Az MBL enzimek számos típusát azonosították *P. aeruginosa*-ban, amelyek közül a VIM-típusú enzim prevalenciája tűnik a legnagyobbnak. Európában is a VIM-enzimek a leggyakoribbak (21, 53, 74, 101, 118, 237, 251, 293).

Annak ellenére, hogy mind az MBL, mind a KPC enzimek jól bontják a karbapenemeket, az *Enterobacteriaceae* törzseknél sokszor nem alakítanak ki rezisztens fenotípust, ezért felismerésük problémát jelent a mindennapi gyakorlatban.

4.3.2. Csökkent permeabilitáson alapuló rezisztencia

A permeabilitás változás, a membránpermeabilitás csökkenése megakadályozza az antibiotikum bejutását a baktériumba, így ott hatékony koncentráció nem képes kialakulni. Ez a mechanizmus általában több, egymással össze nem függő antibiotikum csoporttal szemben okoz rezisztenciát, jellemzően társrezisztenciában, multirezisztenciában nyilvánul meg.

β -laktám antibiotikumok a baktériumok külső membránjában található speciális proteineken, vízzel töltött proteincsatornákon az ún. porinokon keresztül jutnak el a sejt

citoplazma membránjához. A Gram-negatív baktériumokban a külső membrán korlátozza a hidrophil vegyületek bejutását a baktériumba. A porinok csökkent expressziója és/vagy mutációja következtében megváltozott szerkezete a β -laktám antibiotikumok iránti csökkent érzékenységhez, vagy rezisztenciához vezethet, különösen, ha más rezisztencia mechanizmusok (pl: β -laktamázok) is jelen vannak. A csökkent permeabilitáson alapuló rezisztencia izoláltan karbapenemekkel, elsősorban imipenemmel szembeni rezisztenciát okoz.

A csökkent permeabilitáson alapuló rezisztencia az *Enterobacteriaceae* családba tartozó specieseknél ritka jelenség. Számos tanulmányban részletesen vizsgálták az *E. coli* K-12 törzs porinjainak - az OmpF és az porinoknak - a szerkezetét és szabályozását (12, 308). Mutáció következtében ezek a porinok eltűnhetnek, ami a β -laktám antibiotikumok iránti csökkent érzékenységhez, vagy rezisztenciához vezethet.

A *K. pneumoniae* két fő porinja az OmpK35 és az OmpK36. Érdekes módon azonban sok ESBL termelő *K. pneumoniae* izolátum nem rendelkezik OmpK35 fehérjével. Mind az OmpK35 és az OmpK36 elvesztése az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsekben cefoxitin rezisztenciát okoz, fokozza a rezisztenciát a kiterjesztett spektrumú cefalosporinokkal szemben, és csökkent érzékenységet okoz karbapenemekkel, különösen ertapenemmel szemben (122, 173, 175).

Hasonló eredményre jutottottak az *Enterobacter spp.* vizsgálata során is, ahol az *E. coli* az OmpF és OmpC porinjainak az OmpD és OmpF porinok feleltek meg. A porinok elvesztése csökkentheti az érzékenységet nem- β -laktám vegyületek, mint például a fluorokinolonokkal szemben is (51).

A csökkent permeabilitáson alapuló rezisztencia a nem fermentáló baktériumok, azok között is elsősorban a *Pseudomonas spp.*-ben gyakran fordul elő. A *P. aeruginosa* porinjának elvesztése az oka e baktérium karbapenemekkel, elsősorban imipenemmel szembeni rezisztenciájának. Az OprD elvesztése nem érinti az egyéb β -laktám antibiotikumok iránti érzékenységet, mert azok más porinokon keresztül jutnak be a baktériumsejtbe (256).

4.3.3. Efflux mechanizmuson alapuló rezisztencia

A baktériumok számos efflux-pumpával rendelkeznek, melyeknek a baktérium normális működéséhez elengedhetetlen élettani szerepük van a sejt homeosztázis szabályozásában, a környezeti mérgező anyagok eltávolításában. Az effluxhoz szükséges energiát a baktériumok a transzmembrán elektrokémiai gradiensekből aktív transzporttal nyerik a protonok, vagy a nátrium-ionok, vagy ATP hidrolízis segítségével. Mindezek mellett azonban az efflux pumpák közvetett módon hozzájárulnak a baktériumok virulenciájához is, mert az aktív transzport mediálta efflux-pumpa rendszer(ek) túlműködése egy, vagy akár több antibiotikum csoporttal szembeni rezisztenciát is okozhat.

A Gram-negatív baktériumokban az efflux pumpák általában többkomponensű rendszerek, amelyekben a belső membránban található efflux pumpa egy periplazmatikus fúziós fehérjével és egy külső membrán faktorral együtt működik. Leggyakrabban előforduló efflux pumpák például az *E. coli*, *K. pneumoniae* AcrB pumpája vagy a *P. aeruginosa* MexB pumpája (254).

Az eddig ismert efflux pumpa gátlók a fenilalanil-arginil- β -naftilamid (PA β N), carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP) és a rezerpin, melyek azonban nem pumpa-specifikusak és toxikusak az eukariota sejtekre.

4.3.4. A penicillin-kötő fehérjék megváltozásán alapuló rezisztencia

A target megváltozása során a rezisztens baktérium az antibiotikum támadáspontjának megváltoztatásán keresztül teszi hatástalanná az antibiotikumot. Jellemző példája ennek a PBP-k megváltozása. A PBP-k a β -laktámáz enzimekkel evolúciós és funkcionális rokonságban levő peptidázok. A baktérium citoplazma membránján helyezkednek el, az enzimek a transzglikozilezésért (murein egységek polimerizálása) és transzpeptidációért (keresztkötődés) felelősek. A normál PBP-ken végbemehetnek olyan módosulások, amelyek az enzimnek egy-, vagy több β -laktám antibiotikumhoz való kötődését gyengítik. Ezen esetekben a PBP-k a sejtfalszintézis folyamatában zavartalanul tudnak résztvenni: a baktérium rezisztenssé válik az adott β -laktám antibiotikummal szemben. Ilyen típusú rezisztenciát gyakrabban észlelünk a Gram-pozitív, mint a Gram-negatív baktériumok esetében.

5. CÉLKITŰZÉSEK

5.1. Epidemiológiai vizsgálatok

A TEM- és SHV-típusú ESBL-t termelő *K. pneumoniae* törzsek fontos kórokozók a kórházi fertőzésekben, egyrészt multirezisztenciájuk miatt, illetve mert egyre több kórházi járvány kórokozói, elsősorban a koraszülött intenzív osztályokon (perinatal intensive centrum, 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.

5.2. ESBL enzimek újabb fenotípusos és genotípusos detektálási lehetőségei

A Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) és az European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) által meghatározott ESBL fenotípusos szűrővizsgálatok csak *Klebsiella spp.*, *E. coli* és *P. mirabilis* törzsekre tartalmazznak ajánlásokat (48, 79). Azonban a kromoszómális AmpC-típusú β -laktamázt is termelő törzsek esetében ezek az ajánlások nem kidolgozottak.

1. Vizsgálni kívántuk, hogy kromoszómális AmpC-típusú β -laktamázt is termelő *E. 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 β -laktamáz enzimeknek a detektálása különös gondot okoz.

2. Célunk volt azonos típusba tartozó többféle β -laktamáz enzim genotípusos detektálásához megfelelő módszer kidolgozása.

5.3. Új ESBL enzimek izolálása és karakterizálása

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

1. Célunk volt új TEM-, SHV-, CTX-M típusú ESBL variánsok leírása, jellemzése.
2. Továbbá jellemeztük az újonnan leírt TEM-131 és SHV-30 enzimeket szubsztrátprofiljuk alapján és vizsgáltuk a megfigyelhető mutációk hatását az enzim aktivitására.

5.4. ESBL termelés és a csökkent kinolon érzékenység kapcsolata

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

1. 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.

5.5. Gram-negatív baktériumok karbapenem rezisztenciájának vizsgálata

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

1. Vizsgálni kívántuk egy a terápia során ertapenem-rezisztenssé vált *E. cloacae* klinikai izolátum antibiotikum rezisztencia-mechanizmusait.
2. Vizsgáltuk egy ertapenem rezisztens *K. pneumoniae* és egy szintén ertapenem rezisztens *K. oxytoca* antibiotikum rezisztencia mechanizmusait.
3. Tisztázni kívántuk egy korábban külföldön kezelt betegből izolált karbapenem rezisztens *P. aeruginosa* és *A. baumannii* törzsek rezisztencia viszonyait is.

5.6. 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 génnek miatt. A keresztrezisztencia miatt az ESBL-termelő törzsek által okozott fertőzések esetén a terápiás lehetőségek korlátozottak.

1. Célunk az volt, hogy összehasonlítsuk az amikacin, a cefepim, az amikacin-cefepim és az imipenem hatását *in vitro* és *in vivo* SHV-5 ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzzsel fertőzött szeptikus egerekben, magas kezdeti csíraszám alkalmazásával.
2. 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*.
3. Célunk volt egy új antibakteriális aktivitással is bíró peptid, az A3-APO és az imipenem hatását is összehasonlítani ESBL-termelő *E. coli* törzzsel fertőzött szeptikus egerekben.

6. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

6.1. Általános bakteriológiai módszerek

6.1.1. Baktériumtörzsek

Tekintve, hogy munkánk során nagyszámú törzset használtunk, jelölésüket, forrásukat és releváns tulajdonságaikat a kísérletek jobb megértése okán azok leírásánál adjuk meg.

6.1.2. Baktériumtörzsek identifikálása

A baktérium törzsek biokémiai azonosítása a rendelkezésre álló identifikáló rendszerekkel, automatákkal történtek: ATB-teszt, API 20E, VITEK II, VITEK III (BioMerieux).

6.1.3. A baktériumtörzsek tárolása

A baktérium törzseket 20% glicerint tartalmazó Tryptic Soy Brothban (TSB) tároltuk - 80°C-on. A fagyasztócsövekbe szilárd véresagaron nőtt éjszakás tenyészetekről szuszpendáltuk a baktériumokat, a csöveket vortexeltük, majd a fagyasztás előtt egy óra hosszat 37°C-on állni hagytuk.

6.1.4. Tenyésztés, táptalajok

A törzsek rutinszerű tenyésztését véres agaron végeztük 37°C-on. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatokhoz Mueller-Hinton (MH) táptalajt, illetve MH broth-ot használtunk. Farmakokinetikai vizsgálatokhoz, az antibiotikumok – imipenem illetve cefepim – szérumszintjének a meghatározásához antibiotikum média 1-et (Beckton Dickinson) használtunk. A molekuláris vizsgálatokhoz a baktériumokat Luria-Bertani (LB) levesben vagy agaron, illetve Nutrient broth (NB) levesben növesztettük.

6.1.5. A csíraszám beállítása

Amennyiben a kísérlethez beállított csíraszámhoz volt szükség, azt előzőleg elkészített CFU/OD₆₀₀ kalibrációs görbék segítségével denzitometriás módszerrel állítottuk be. Minden törzsre külön kalibrációs görbét használtunk. Amennyiben a kísérletekhez a mérési határ alatti csíraszámra volt szükség, a szuszpenziós töménységet 10⁸/ml-re állítottuk, és ebből a törzs-szuszpenzióból végeztünk hígítást.

6.2. Antibiotikum érzékenység meghatározása

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat a CLSI és a National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) aktuális évi, érvényben lévő nemzetközi ajánlásai alapján végeztük (48, 49, 192). A vizsgálatok kivitelezése az ajánlásoknak megfelelően kontrolltörzsekkel ellenőrzött táptalajokon, nemzetközi standardoknak megfelelő körülmények között történtek.

6.2.1. Antibiotikum érzékenység meghatározása korongdiffúziós módszerrel

A Kirby-Bauer-féle korongdiffúziós vizsgálatok során az alábbi antibiotikum-tartalmú korongokat alkalmaztuk: ceftazidim, ceftazidim+klavulánsav, cefotaxim, cefotaxim+klavulánsav, cefepim, ceftriaxon, ceftriaxon/klavulánsav és aztreonam. A kapott zónaátmérőt a kontrolltörzsekkel végzett standardizált körülmények között kapott eredményéhez hasonlítva kaptunk érzékeny, mérsékelten érzékeny és rezisztens eredményt. Az epidemiológiai összegzéseknél a baktériumoknak az adott antimikrobás szerre való érzékenységének megadásakor két kategóriát használtunk: érzékeny és nem érzékeny (mérsékelten érzékeny és rezisztens).

6.2.2. Antibiotikum érzékenység vizsgálata minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározásával

6.2.2.1. MIC érték meghatározása E-teszttel

Az ampicillin, ampicillin/szulbaktám, amoxycillin/klavulánsav, piperacillin, piperacillin/tazobaktám, cefuroxim, ceftazidim, ceftazidim/klavulánsav, cefotaxim, cefotaxim/klavulánsav, ceftriaxone, cefpodoxim, cefepim, cefepim/klavulánsav, cefoxitin, ertapenem, imipenem, imipenem/EDTA, meropenem, aztreonam, nalidixsav, ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, tetracyclin, trimethoprim-sulfamethoxazol, chloramphenicol, gentamicin, netilmicin, amikacin, tobramycin, tigecyclin, colistin MIC-értékeit az antibiotikumokat meghatározott koncentrációgradiensben tartalmazó csíkokkal, a gyártó előírásainak megfelelően alkalmazva (AB Biodisk, Solna, Svédország) határoztuk meg.

6.2.2.2. MIC érték meghatározása mikrodilúciós módszerrel

Az ampicillin, cefepim, imipenem, amikacin, ciprofloxacin, levofloxacin és A3-APO MIC értékeinek mikrodilúciós meghatározásához a mikrotitráló lemez vájadataiban kationnal kiegészített MH levest alkalmaztunk 0.1 ml végtérfogatban. A hígítási

sorozatot úgy terveztük meg, hogy a kiinduló koncentráció a várható MIC-értéknél 3-4-szer nagyobb, illetve a sorozat utolsó hígításának koncentrációja a várható legkisebb MIC-értéknél 3-4-szer kisebb legyen.

Bizonyos esetekben a standard 10^5 CFU/ml baktérium koncentrációval párhuzamosan 10^7 CFU/ml baktérium koncentráció esetében is meghatároztuk a MIC értéket.

6.2.2.3. MIC érték meghatározása agardilúciós módszerrel

Antibiotikum tartalmú MH agarlemezeket készítettünk, az antibiotikumok hígítási sorozatával. A vizsgálandó baktériumokat a MH agarokon tenyésztettük, majd overnight tenyésztés után a baktérium növekedést detektáltuk. Agardilúciót használtunk az ampicillin, ampicillin/klavulánsav, amoxycillin/klavulánsav, piperacillin, piperacillin/tazobaktám, cephalotin, ceftriaxon, ceftazidim, ceftazidim/klavulánsav, cefotaxim, cefotaxim/klavulánsav és cefepim MIC értékeinek meghatározásához.

6.2.3. Antibiotikum érzékenység vizsgálata minimális baktericid koncentráció (MBC) meghatározásával

A MIC érték mikrodilúciós technikával történő meghatározása után, a mikrotiter lemez azon vályulataiból, amelyekben nem volt baktériumnövekedés véres táptalajra kioltottunk és egyéjszakás inkubálás után meghatároztuk, azt a legkisebb antibiotikum koncentrációt, ahol már nem volt baktérium növekedés.

Bizonyos esetekben a standard 10^5 CFU/ml baktérium koncentrációval párhuzamosan 10^7 CFU/ml baktérium koncentráció esetében is meghatároztuk az MBC értéket.

6.2.4. A β -laktamáz enzim termelés detektálása antibiotikum érzékenység meghatározása alapján

6.2.4.1. AmpC termelés fenotípusos vizsgálata

Az *E. cloacae* osztályozását az indukálható, részlegesen derepresszált vagy derepresszált AmpC-termelés alapján Sanders és munkatársainak módszere alapján végeztük (257), amelyben a cefoxitin-cefotaxim antagonizmus-tesztet alkalmaztuk (210, 257). Az *E. cloacae* izolátumokat az alábbiak szerint kategorizáltuk: derepresszált AmpC mutánsoknak tekintettük, ha a cefoxitin MIC-értéke ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ volt, a cefotaximé ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ és a cefoxitin-cefotaxim antagonizmus teszt negatív volt; részlegesen derepresszált AmpC mutánsoknak tekintettük, ha azonos jellegzetességeket tapasztaltunk, mint a derepresszált mutánsok esetében, azonban a cefoxitin-cefotaxim

antagonizmus teszt pozitív volt; indukálható AmpC-termelő törzseknek tekintettük a baktériumot, ha a cefotaxim MIC-értéke $\leq 8 \mu\text{g/ml}$ volt és a cefoxitin-cefotaxim antagonizmus teszt pozitív (210).

6.2.4.2. ESBL termelés fenotípusos szűrése

ESBL-termelés szűrésére végzett kettős-korong diffúziós teszt során az MH agaron elkészített baktériumpázsitra egymástól 20-30 mm-re (középpont a középponttól) helyeztünk klavulánsavat tartalmazó korongot és ceftazidim, cefepim, ceftriaxon, cefotaxim, aztreonam korongot. Az inkubációs idő után a β -laktám antibiotikumok körüli gátlási zóna jellemző torzulása („kulcslyuk” jelenség) jelezte az ESBL jelenlétét.

6.2.4.3. ESBL termelés fenotípusos megerősítése

Fenotípusos konfirmáló tesztként a cefalosporin mellett klavulánsavat is tartalmazó speciális (kettős, kombinált) korongokat alkalmaztuk: ceftazidim-klavulánsav, cefotaxim-klavulánsav, ceftriaxon-klavulánsav (minden esetben 30/10 μg ; BioRad). Pozitív eredménynek vettük, ha az antibiotikumot önmagában tartalmazó korong körül mért gátlási zónához képest (ceftazidim 30 μg , cefotaxim 30 μg , ceftriaxon 30 μg) az antibiotikum-klavulánsav körüli gátlászóna átmérője kevesebb, mint 5mm-rel nőtt. E-teszttel is meghatároztuk a pozitív kettős korongdiffúziós tesztet eredményező törzsek esetén a cefotaxim, a ceftazidim és a cefepim MIC-értékét és összehasonlítottuk a ceftazidim-klavulánsav, cefotaxim-klavulánsav és a cefepim-klavulánsav tartalmú E-tesztcsíkok esetén kapott értékekkel. A kombinált antibiotikum használata esetében a legalább hármas léptékű MIC koncentráció csökkenést értékeltük pozitívnak.

6.2.4.4. MBL termelés fenotípusos szűrése

MBL-termelés szűrésére végzett kettős korong diffúziós teszt során technikailag ugyanúgy jártunk el, mint az ESBL-szűrésnél, azonban cefepim, ertapenem, imipenem és meropenem korongokat helyeztünk 20mm és 30mm távolságra (középpont a középponttól) az EDTA-t tartalmazó korongtól. Itt is a „kulcslyuk” jelenséget tekintettük pozitívnak.

6.2.4.5. MBL termelés fenotípusos megerősítése

MBL-termelés megerősítésére végzett teszt során technikailag ugyanúgy jártunk el, mint az ESBL-szűrésnél, azonban cefepim, ertapenem, imipenem és meropenem korongokra cseppentettünk 5 μl 0.05 M EDTA oldatot. Párhuzamosan csak EDTA-t tartalmazó

korong körül is lemértük a gátlási zónát, hogy az EDTA baktérium növekedésre gyakorolt gátló hatását is figyelembe vegyük. Pozitívnak tekintettük a teszt eredményét, ha az antibiotikum - cefepim, ertapenem, imipenem és meropenem – és EDTA kombinációs korong körül kialakult gátlási zóna legalább 5 mm-rel meghaladta a csak antibiotikumot tartalmazó korong körül kialakult zóna nagyságát.

6.3. Biokémiai vizsgáló módszerek

6.3.1. Analitikai izoelektromos fókuszálás

A baktériumokból a β -laktamáz enzimet lyzozymes feltárással nyertük ki (217). A teljes sejtek és a sejtörmelék centrifugálással történő eltávolítása után a felülúszót használtuk az izoelektromos pont (pI) meghatározására. Az elektroforézishez előre elkészített pH 3-10 poliakrilamid géleket alkalmaztunk (Bio-Rad), a következő futtatási paraméterekkel: 100 V – 15 perc, 200 V – 35 perc, 300V – 50 perc. Az enzimaktivitást nitrocefínnel átitatott (500 $\mu\text{g/ml}$) szűrőpapírnak a fókuszált gélre helyezésével mutattuk ki. A Bio-Rad standardjait használtuk, a következő izoelektromos pontokkal: 4.45, 4.65, 4.75, 5.1, 6.0, 6.5, 6.8, 7.0, 7.1, 7.5, 7.8, 8.0, 8.2 és 9.6.

6.3.2. β -laktamáz tisztítás

Az SHV-1, SHV-2 és SHV-30 β -laktamázokat *E. coli* DH10B-ből preparatív izoelektromos fókuszálással tisztítottuk ki (158, 159). Az egyes β -laktamázok tisztaságát 5%-os tömörítő és 12%-os futtató sodium dodecyl szulfát polyacrylamid gél elektroforézishez (SDS-PAGE) használt géleken határoztuk meg. A géleket Coomassie Brilliant Blue R250-el (Fisher) festettük, hogy a β -laktamáz fehérjét láthatóvá tegyük. A fehérjekoncentrációkat a Bio-Rad Protein Assay (BioRad) révén határoztuk meg, marha szérum albumin (BSA) standard alkalmazásával. Az SHV-30 β -laktamáz esetén további tisztításként méret-kizárásos kromatográfiára volt szükség, melyhez Waters HPLC rendszert használtunk, Helfand és mtsai leírása alapján (110).

6.3.3. Enzimkinetikai vizsgálatok

Az SHV-30 β -laktamáz steady-state kinetikai paramétereit Agilent 8452 dióda rendszerű spektrofotométerrel határoztuk meg. A méréseket ampicillinnel ($\Delta\epsilon_{235} = -900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), cefaloridinnel ($\Delta\epsilon_{260} = -10,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), nitrocefínnel ($\Delta\epsilon_{482} = 17,400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Becton Dickinson, Cockeysville, Md.), cefotaximmal ($\Delta\epsilon_{264} = -7,250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), cefepimmal és cefalothinnal ($\Delta\epsilon_{260} = -7,660 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) végeztük el. A szubsztrátokat két

különböző napon vizsgáltuk. A kinetikai paraméterek ($v_{\max}$ és K_M) meghatározását az adatok Michaelis-Menten egyenletbe történő illesztésével végeztük a nemlineáris legkisebb négyzetek elve szerint, az Enzfitter program alkalmazásával (Sigma). A kinetikai kísérleteket és elemzéseket Imtiaz és mtsai módszerei alapján végeztük a következőképpen (119):

$$v = V_{\max} [S] / (K_m + [S]) \quad 1. \text{ egyenlet}$$

A katalitikus hatékonyságot az alábbi összefüggés alapján határoztuk meg:

$$k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E_T] \quad 2. \text{ egyenlet}$$

Bizonyos esetekben a 3. egyenletet használtuk a katalitikus hatékonyság meghatározására.

$$k_{\text{cat}} / K_m = v [E_T] [S] \quad 3. \text{ egyenlet}$$

6.3.4. Enzimhez kötött immunoszorbens vizsgálat SHV β -laktamáz kimutatására

Enzimhez kötött immunoszorbens (enzyme linked immunosorbent assay; ELISA) vizsgálatot végeztünk az SHV β -laktamáz enzim kimutatására. Kilencvenhatlyukú Immulon-4 enzim immunoassay lemezeket (Fisher) egy éjszakára 4 $\mu\text{g/ml}$ tisztított SHV-1 antitestet tartalmazó karbonát-pufferrel (pH 9.5) vontunk be. A lemezeket 0.05 % Tween 20-at tartalmazó PBS-el (Bio-Rad) mostuk, majd szobahőmérsékleten 5 % BSA-t tartalmazó PBS-el blokkoltuk. A standard 0.1 % BSA-ban 100.0-0.0015 ng/ml koncentrációra oldott tisztított SHV-1 volt. A minták egy éjszakán át növesztett baktériumtenyészetekből származó 100 μl -es aliquotok hígításai voltak. A hígításokat az enzim immunoassay lemezekbe helyeztük majd 2 $\mu\text{g/ml}$ biotinilált anti-SHV-1 antitestekkel inkubáltuk. Mosást követően a lemezeket 1:3000 hígítású streptavidin-tormaperoxidázzal (Zymed Laboratories) inkubáltuk, majd citromsav pufferben (pH 5.5) (Sigma) oldott o-fenilén-diaminnal és H_2O_2 -dal hívtuk elő. A reakciót H_2SO_4 -tal állítottuk le. Az OD_{492} értékeket Cerus ELISA lemezolvasó segítségével kaptuk meg, és összehasonlítottuk a sorozathígítású, tisztított SHV-1 β -laktamázzal, amelyet belső referenciapontként használtunk.

6.3.5. Külső membrán fehérjék izolálása és kimutatása

A vizsgálandó baktériumokat NB médiumban tenyésztettük a stacioner fázis eléréséig, majd ultrahangos kezeléssel (4°C-on, 3x5 percig 18-20 micronos amplitudóval) feltártuk a sejteket. A sejtörmelék és a feltáratlan sejtek eltávolítása után a sejtmembránt *N*-lauroyl sarcosinate-os kezeléssel extraháltuk. Az így kapott membránfehérjéket SDS-PAGE segítségével 12.5%-os Tris-HCl gélt (Bio-Rad, Hercules, CA) használva Laemmli pufferben futattuk meg. Markerként a kétszínű Precision Plus Protein (Bio-Rad, Hercules, CA) standardot használtunk. A gélt Comassie-kék festékkel festettük.

6.3.6. Molekuláris ábrázolások

Kuzin és mtsai meghatározták az SHV-1 β -laktamáz atomi szerkezetét (144). A koordináták elérhetőek a Fehérje Adatbankból (belépés: 1 SHV) a Rutgers Egyetemen (www.rcsb.org/pdb/). Elkészítettük az SHV-1 β -laktamáz kristályszerkezetének ábrázolását az Arg43, Arg244 és Asn276 környezetében a WebLab ViewerLite 3,5 programmal (www.accelrys.com/products/).

6.4. Genetikai módszerek

6.4.1. Plazmid kimutatás, izolálás

A plazmidok rutinszerű kimutatásához Kado és Liu alkalikus lízis módszerét használtuk (127). Azonban néhány esetben a plazmidokat plazmid extrakciós kit segítségével nyertük ki (Wizard Plus Minipreps, DNA Purification System; Promega), néhány módosítással. Az extrakció során forró vizet és nagyobb térfogatot (10 ml) használtunk a tenyészetből, hogy az alacsony kópiaszámú plazmidokat detektálhassuk. Klinikai törzsek esetében járulékos módszerként alkalmaztuk a genotipizáláshoz a kisebb plazmidok azonosítására mivel ezek kisebb valószínűséggel transzferálhatók és ezért diagnosztikus értékűek lehetnek az egyes genotípusokra. A plazmid DNS elektroforézisét 0.8 %-os agaróz gélen végeztük és UV-fény alatt etídium-bromiddal tettük láthatóvá. λ *HindIII*-t (Promega) alkalmaztunk a molekulaméret markereként.

6.4.2. Transzformáció, konjugáció

A transzformáció során a baktérium törzsek extrahált plazmid DNS-ét *E. coli* DH5- α sejtekbe, illetve *E. coli* DH10B recipiens (BioRad) sejtekbe transzformáltuk elektroporációval a gyártó (Gene-Pulser; Bio-Rad) előírása szerint. A transzformált

baktériumokat antibiotikumot tartalmazó -100 µg/ml ampicillint - tartalmazó tápagaron tenyésztettük.

A konjugáció során recipiensként azid-rezisztens vagy rifampicin-rezisztens *E. coli* J53 törzset használtunk. A vizsgálandó törzseket, illetve a recipienseket LB levesben inkubáltuk egy éjszakán át, majd négy órán át tartó együttes inkubálást követően a konjugált baktériumokat azid-rezisztens *E. coli* J53 esetében nátrium-azidot (100 µg/ml), ampicillint (100 µg/ml), trimethoprimet (10 µg/ml) és szulfametoxazolt (300 µg/ml) tartalmazó; rifampicin-rezisztens *E. coli* J53 esetében ampicillint (100 µg/ml) és rifampicint (300 µg/ml) tartalmazó LB agarlemezekken szelektáltuk.

6.4.3. Emésztés restrikciós enzimmel

A restrikciós enzimmel történő emésztés során az enzimeket – *EcoRI*, és *HindIII* - a gyártó (BioLab) előírásainak megfelelően használtuk.

6.4.4. Pulzáló mezejű gélelektroforézis

A pulzáló mezejű gélelektroforézist (pulse field gel electrophoresis; PFGE) a Centers for Disease Control and Prevention (CDC) PulseNet protokolljának megfelelően végeztük (245). Röviden, a genom DNS-t izoláltuk és a megfelelő restrikciós enzimmel emésztettük (New England). A PFGE-t CHEF III rendszerrel végeztük (Bio-Rad) a következő futtatási paraméterekkel: az I. bloknál 3-65 mp kapcsolási és 17 óra futtatási idő; a II. blokkhoz 15-30 mp kapcsolási és 6 óra futtatási idő. A dendrogramokat Molecular Analyst (Bio-Rad) segítségével készítettük el, a Dice-együttható alkalmazásával, nem súlyozott pár csoport módszerrel (UPGMA), 1,3 %-os pozíció toleranciával. A minták összefüggését Tenover és mtsai kritériumai alapján határoztuk meg (271).

6.4.5. DNS próba és hibridizáció

A baktériumokból a korábban leírt módszerrel izolált plazmido(ka)t restrikciós enzimekkel - *EcoRI*-gyel, *HindIII*-mal illetve *PstI*-gyel- emésztettük, majd 0.8%-os gélben megfutattuk. A *PstI*-gyel emésztett plazmidokat *bla*_{CTX-M-59}-re specifikus, digoxigeninnel jelölt DNS-próbákkal hibridizáltuk a PCR DIG detection system (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) felhasználásával.

6.4.6. Polimeráz láncreakció (PCR)

16-18 órás baktériumtenyészet felülúszójából nyertük a bakteriális templát DNS-t a PCR-hez. A PCR vizsgálatok során *bla*_{TEM} (78), a *bla*_{SHV} (78), *bla*_{CTX-M}(299) *bla*_{OXA}(13), *bla*_{PER}(13), *bla*_{VIM} (155), *bla*_{qnr} (250), *bla*_{aac(6)-Ib-cr} (211) detektálására szolgáló primereket használtunk. Az AP-PCR (arbitrarily primed PCR) során ERIC-2 primert használtunk (94). A PCR-eket RedTaq DNS-polimerázzal (Sigma) végeztük, a gyártó előírásai szerint: 2 µl templát DNS-preparátum jelenlétében 30 µl-es végtérfogatban. A 30 µl-es reakcióelegyek 50 mM KCl-ot, 1.5 mM MgCl₂-ot, minden primerből 0,5 µM-t, minden dezoxinukleotid-trifoszfátból 1.5 mM-t (Sigma), 1 U RedTaq polimerázt (Sigma) és 2 µl bakteriális genom DNS-t tartalmaztak. A DNS-amplifikációs program egy kezdeti denaturációs lépésből (96 °C, 5 perc) állt, melyet 30 ciklus követett: denaturáció (96 °C, 30 sec), hibridizáció (az annealási hőmérséklet primerenként változó, 30 sec) és szintézis (72 °C, 1 perc) végül 5 perces szintézis 72 °C-on. A PCR-terméket tartalmazó reakcióelegy 10 µl-ét elektroforézissel vizsgáltuk 0.8 w/v %-os gélben.

6.4.7. Multi-lókusz szekvencia tipizálás

A multi-lókusz szekvencia tipizálás (multilocus sequence typing; MLST) vizsgálat során a kiválasztott *Klebsiella* törzsek housekeeping génjeit - *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* és *tonB* - PCR vizsgálatokkal amplifikáltuk, majd a kapott termékeket szekvenáltuk (71). Az így kapott allél-szekvenciák és a szekvencia típusok (ST) a <http://pubmlst.org/kpneumoniae> honlapján található adatokkal kerültek összehasonlításra.

6.4.8. Klónozás

Kísérleteink során egyrészt különböző mutációkkal rendelkező *bla*_{SHV} géneket illetve CTX-M-2-t és CTX-M-59-et termelő *E. coli* klónokat állítottunk elő. Az enzimeknek megfelelő struktúrgéneket amplifikáltuk, majd a PCR-terméket *EcoRI*-gyel, *XbaI*-gyel és/vagy *BamHI* restrikciós enzimekkel (New England Biolabs) emésztettük, majd a *bla*_{SHV} géneket a pCR-XL-TOPO vektorral, a *bla*_{CTX-M} géneket pBC-SK(-) vektorral kapcsoltuk össze. Ezután a rekombináns plazmidokat az *E. coli* DH10B sejtbe elektroporáció segítségével transzformáltuk. A transzformált baktériumokat 50 µg/ml ampicillin és 50 µg/ml kanamycin vagy 30 µg/ml chloramphenicol tartalmú LB agaron

szelektáltuk a vektortól függően. A nukleotidszekvenciák megerősítése után ezeket a törzset használtuk a MIC-értékek meghatározására.

6.4.9. Mutagenesis

A PCR-alapú site-directed mutagenesist a Stratagene QuikChange mutagenesis kit segítségével végeztük (Stratagene). Két komplementer oligonukleotidot állítottunk elő (Genosys Biotechnologies) az SHV-1 β -laktamázban található 43-as és 238-as aminosavnak megfelelő helyen a korábban leírtak szerint site-directed mutagenesist végeztünk (115, 116). A mutagenesisnek alávetett DNS-t tartalmazó transzformált *E. coli* DH10B telepeket 20 μ g/ml kloramfenikolt tartalmazó LB agarra szélesztettük és a telepeket szűrtük a kívánt mutációkra.

6.4.10. DNS-szekvenálás

Az amplifikált termékeket ABI 4500 és ABI 3100 genetikai analizátorok segítségével szekvenáltuk. 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, többszörös szekvencia-sorbaállítási módszerrel a BLAST program segítségével.

6.4.11. Egy pontos nukleotid polimorfizmusok detektálása

A *bla*_{SHV} egy pontos nukleotid polimorfizmusainak (single nucleotide polymorphism; SNP) detektálására a Sevall által kifejlesztett 5'-nukleáz assay-t alkalmaztuk (260). Olyan oligonukleotidokból álló fluoreszcens próbákat terveztünk, amelyeknek mindkét végén volt jelzőfesték (6-karboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaklorofluorescein (HEX) vagy 6-karboxi-fluorescein [FAM] és egy csillapító festék (6-karboxi-tetrametilrodamin (TAMRA))). A próba szabad oldott formában hajtű szerkezetet alakít ki. A jelző és a csillapító fluoreszcencia közelsége ebben a hajtű szerkezetben elnyomja a jelző fluoreszcenciát (fluoreszcencia rezonancia transzfer (FRET)). A PCR során a kétszeresen jelzett próba kapcsolódott a vizsgálni kívánt helyre (*bla*_{SHV}) a „forward” és a „reverse” primerek kötőhelye között. A szintézis szakaszában a próbát a *Taq* polimeráz, 5'-nukleáz aktivitásával elhasította. Ennek hatására eltávolodott egymástól a jelző és a csillapító festék, ezért megnövekedett a jelző festék fluoreszcenciája (a FRET nem

valósul meg). Azáltal, hogy két, csak egyetlen nukleotidban különböző próbát használtunk két különböző jelzőfestékkel kombinálva, detektáltuk a polimorfizmusokat. Real-time PCR allél megkülönböztető assay-eket a Primer Express szoftver (Applied Biosystems) segítségével terveztünk. A Primer Express használatával készült primerek és próbák kombinációi a **2. táblázat**-ban vannak felsorolva.

2. táblázat Real-time PCR SNP genotipizálás során használt primerek és próbák

	Primerek, próbák	Szekvencia
TEM PCR	Forward primer	5' ATG AGT ATT CAA CAT TTC CG TG 3'
	Reverse primer	5' TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA 3'
SHV-PCR	Forward primer	5' ATT TGT CGC TTC TTT ACT CGC 3'
	Reverse primer	5' TTT ATG GCG TTA CCT TTG ACC 3'
RT-PCR SNP	Forward primer*	5' TTG TTA TTC GGG CCA AGC 3'
	Reverse primer*	5' TGG TTT ATC GCC GAT AAC 3'
	Próba 1*	5' FAM-ACC CCG TTC GCT AGC TCC GG-TAMRA 3'
	Próba 2*	5' HEX-ACC CCG TTT GCT AGC TCC GG-TAMRA 3'

* A primerek és próbák a komplementer DNS szárra lettek tervezve

A genotipizálás 50 µl-es reakcióelegyekben történt, amelyek 5 µl genomiális DNS-t, minden primerből 900 nM-t, minden próbából 200 nM-t, 25 µl Taqman Universal PCR Master Mix-et (amelyben PCR-puffer, passzív referenciafesték: ROX (karboxi-X-rodamin) dezoxinukleotidokat, uridint, uracil-N-glikozilált és az AmpliTaq Gold DNS polimerázt tartalmaztak; Perkin-Elmer Applied Biosystems). A ciklusok körülményei: 2 perc 50°C-on, 10 perc 95°C-on, 40 ciklus 95°C-on 15 másodpercig és 60°C-on 1 perc. 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.

6.4.12. 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 teljes RNS-t RNeasy kit (QIAGEN Inc.) felhasználásával izoláltuk és RNáz-mentes DNáz I-gyel kezeltük. Az RNS koncentrációját spektrofotometriás úton határoztuk meg. Százhuszonöt mikrogramm RNS felhasználásával reverz transzkripció révén egyszálú cDNS-t készítettünk a Nagy

Kapacitású cDNS Archiváló Kit segítségével (Applied Biosystems). Ezt követően a cDNS-ek mennyiségét valósídejű PCR-amplifikációval határoztuk meg, amelyekhez a OMP külső membránfehérjék – *ompD* és *OmpF* - és az efflux pumpa génre *acrB* (**3. táblázat**) specifikus primereket alkalmaztunk az ABI 7300 RealTime PCR gép használatával (Applied Biosystems).

3. táblázat Real-time RT-PCR során használt primerek

Primer	Szekvencia (5' 3')	Annealing hőmérséklet	Termék méret
<i>rpoB</i> (F)	CAG CCG CGA YCA GGT TGA CTA CA	60	63
<i>rpoB</i> (R)	GAC GCA CCG ACG GAT ACC ACC TG		
<i>ompD</i> (F)	AGA ATT TGG CGG CGA CAC CTAC	60	145
<i>ompD</i> (R)	TGC GCT ACC GTT TTT ACC CTG ATA		
<i>ompF</i> (F)	CCG GCG TGA GCG ATA ACT TCT TCT	60	136
<i>ompF</i> (R)	AAC GCA TCG GTA CGC TCA TTT TTG		
<i>acrB</i> (F)	TCC GGG CGC AGA GAA CAA GGT AGA	60	100
<i>acrB</i> (R)	TGC GGG CAG GTT AAA GGC GAA GAC		

F: forward primerek; R: reverse primerek.

Y: C vagy T

A futattási paraméterek a következők voltak: 50 °C-on történő 2 perces és 95 °C-on 12 perces kezdeti inkubáció, melyet 40 ciklus követett 95 °C-on 15 másodpercig, illetve 60 °C 60 másodpercig. 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 (163).

6.5. Epidemiológiai vizsgálatok

6.5.1. Epidemiológiai meghatározások

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.

Az incidenciát 95 %-os konfidencia intervallummal a személy-napok, mint nevező használatával becsültük meg, a kolonizált és a klinikai eseteket egyaránt bevonva a számításba.

6.5.2. 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, polimikróbás fertőzések bekövetkeztét, a gépi lélegeztetést és a fertőzés kimenetelét.

6.6. Állatkísérletek

6.6.1. Állatmodell

Minden kísérletben 30-35 g tömegű CD-1 egereket (Charles River) használtunk. Az állatokat hagyományos módon, 2-es típusú műanyag ketrecekben tartottuk (Charles River), két-három egeret egy ketrecekben, puhafa-szemcse ágyazaton. Az állatok 21 ± 2 °C-on és 55 ± 15 % páratartalomban, 12-12 órás világos-sötét bioritmus ciklusban éltek. Az állatok szabadon hozzáférhettek a csapvízhez és a golyókká formált rágszáló eledelhez (CRLT/N standard patkány és egér táplálék, Charles River). A kísérleteket három hetes szoktatás után kezdtük meg. A tanulmány végén az állatokat 150 mg/kg nátrium-barbiturát (Sigma) i.p. injekcióval altattuk el. Az állatokat a Laboratóriumi Állatok Gondozása és Alkalmazása Irányelveinek megfelelően tartottuk, a kísérleteket pedig a Semmelweis Egyetem (SE) Állatgondozási Bizottsága hagyta jóvá minden esetben.

6.6.2. Antibiotikum szérumszint meghatározása egerekben

Véletlenszerűen kiválasztott CD-1 egereket (30-35 g) használtunk az antibiotikumok szérumszintjének a meghatározásához.

6.6.2.1. Cefepim és imipenem szérumszint meghatározása

A cefepim (80 mg/kg), illetve imipenem (40 mg/kg) egyszeri i.p. alkalmazását követően 15 és 30 perccel, 1, 2 és 3 órával vérmintákat vettünk (megközelítőleg 50 µl-t) a farokvénákból, időpontonként öt-öt egérből. Az egereket további 48 óráig megfigyelés alatt tartottuk. A szérum antibiotikum-szinteket papírkorongos módszerrel határoztuk meg; az imipenem és a cefepim esetén *Bacillus subtilis* ATCC 6633 és *E. coli* ATCC 25922, mint indikátor mikroorganizmusok felhasználásával antibiotikum medium 1-en (Becton Dickinson) (4). A korongok antibiotikum tartalmát féllogaritmikus lineáris regressziós grafikonról határoztuk meg, amelyen a gátlási zónák átmérőjét ábrázoltuk a cefepim, illetve imipenem koncentráció tízes alapú logaritmusának függvényében. A meghatározás alsó határa 8 µg/ml volt cefepim és 1 µg/ml volt imipenem esetén. A variabilitási együttható az összes antibiotikum vizsgálatnál $\leq 5\%$ volt.

6.6.2.2. Amikacin szérumszint meghatározása

Az amikacin (7.5 mg/kg) egyszeri i.p. alkalmazását követően 15 és 30 perccel, 1,2 és 3 órával vérmintákat vettünk (megközelítőleg 50 µl-t) a farokvénákból, időpontonként öt-öt egérből. Az egereket további 48 óráig megfigyelés alatt tartottuk. Az amikacin szérumszinteket fluoreszcens polarizációs immunassay révén (Abbott TDx rendszer) határoztuk meg.

6.6.2.3. Ciprofloxacin és levofloxacin szérumszint meghatározása

20 mg/kg dózisu ciprofloxacint, illetve 50 mg/kg levofloxacint adtunk i.p. az egereknek. Öt-öt egértől vettünk szívpunkcióval vérmintákat az antibiotikumok beadása után 15 és 30 perccel és 1, 2, 3 és 4 órával. A szérum antibiotikum-szinteket magas nyomású folyadékkromatográfiával (HPLC) határoztuk meg.

6.6.3. Farmakokinetikai változók meghatározása

A farmakokinetikai változók értékét a nonkompartmentális módszerrel határoztuk meg (98). A csúcs plazmakoncentrációt (C_{max}) közvetlenül a kísérleti adatokból kaptuk. A végső fázisú eliminációs ráta hányadost (K_{e1}) a koncentrációk $\log_{10}$ értékeinek lineáris regressziójával becsültük meg. A féléletidő ($T_{1/2}$) értékeket a $0,693/K_{e1}$ -középérték képlettel számítottuk ki. A koncentráció-idő görbe alatt területet a nulla-ponttól az utolsó mintavételi időig (AUC_{0-4h}) a trapéz-szabály révén számoltuk ki, az AUC-t 4 órától a végtelenig ($AUC_{4h-\infty}$) C_{4h}/K_{e1} -ként becsültük meg, ahol C_{4h} a négyórás kezelés

után mért koncentráció. A teljes görbe alatti területet a nulla ponttól a végtelenig ($AUC_{0-\infty}$) az AUC_{0-4h} és az $AUC_{4h-\infty}$ összegeként számítottuk ki. A görbe alatti területet a nulla-ponttól 24 óráig (AUC_{0-24}) az $AUC_{0-\infty}$ negyedeként határoztuk meg.

A közepes fennmaradási időt (MRT) a következők szerint számoltuk: $MRT = [AUMC_{0-t} + t(AUC_{0-\infty} - AUC_{0-t})]/AUC_{0-t}$, ahol AUC_{0-t} és $AUMC_{0-t}$ megfelel az AUC és az AUMC steady-state állapotának egy dozírozási intervallum alatt, illetve $AUC_{0-\infty}$ megfelel a végtelenbe extrapolált AUC értéknek. A teljes test clearance-et (CL) $CL = \text{dózis}/AUC_{0-t}$ képlet szerint számoltuk (6).

6.6.4. Baktérium csíraszám meghatározása az egerek vérében

A vérmintákat a farokvénából vettük a fertőzés után különböző időpontokban, amikor az antibiotikumok szérumszintje jóval a MIC-értékek felett volt. A sorozathígítások után a mintákat kvantitatív módon tenyésztettük MH agar lemezekre. Egy éjszakán át 37°C -on történő inkubáció után az élő baktériumokat megszámláltuk és $\log_{10}$ CFU/ml vér középértékben fejeztük ki. A vér baktérium-koncentrációkat a $\log_{10}$ CFU/ml értékek variancia-elemzésének alkalmazásával hasonlítottuk össze. A baktériumnövekedés elmaradása esetén a kimutathatóság határát, azaz 300 CFU/ml-t helyettesítettünk be. A páros összehasonlításokat a Bonferroni módszerrel végeztük. A számításokat SSPS 7.5 program segítségével végeztük el.

6.6.5. Túlélési elemzés

Minden fertőzött-kezelt, fertőzött-kezeletlen és nem fertőzött csoportban tizenöt egeret használtunk. Az utánkövetés a túlélés megfigyelésével történt, az elhullást tekintettük végpontnak. A Kruskal-Wallis tesztet követően Mann-Whitney U-tesztet használtuk statisztikai elemzésre, $P < 0.05$ értéket tekintve szignifikánsnak. A kezelési időszakot a kumulatív valószínűség megbecslése alapján határoztuk meg a Kaplan-Meier túlélési görbe használatával. A $P < 0.05$ értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak. A túlélést 12, 24, 48 óra és 1 hét után vizsgáltuk a letalitás kiszámításához a kísérletektől függően, a 24 órás túlélést pedig a kumulatív valószínűség megbecslésével 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.

7. EREDMÉNYEK

7.1. Epidemiológiai vizsgálatok

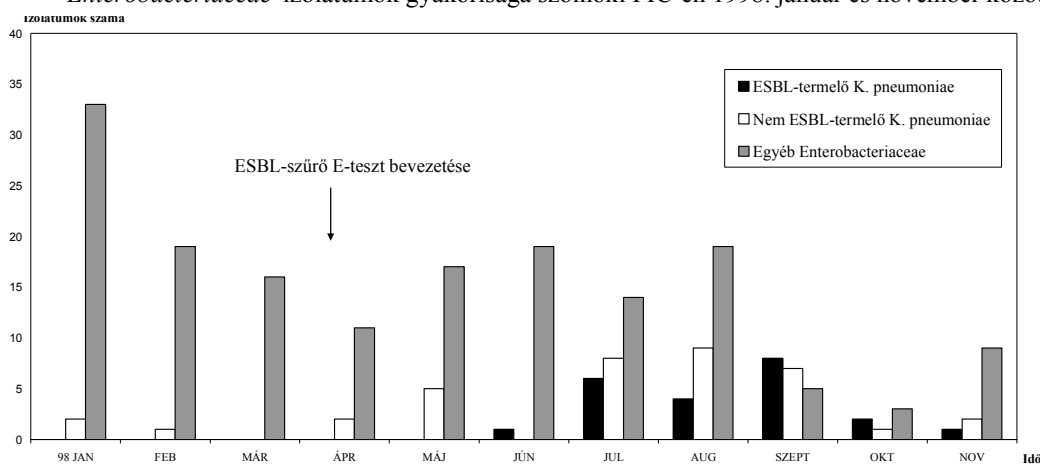
7.1.2. Az első magyarországi ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzs által okozott esethalmozódás molekuláris epidemiológiai jellemzése

A 1990-es években a TEM- és SHV-típusú kiterjedt spektrumú β -laktamázokat termelő *K. pneumoniae* törzsek fontos kórokozókká váltak a kórházban szerzett fertőzésekben, multirezisztenciájuk miatt és egyre több járványt okoztak a kórházakban mióta az első ESBL-t 1984-ben izolálták (8, 139, 193, 220, 239, 289). A PIC-eken a *Klebsiella* fajok tűntek a leggyakoribb kórokozóknak (50).

7.1.2.1. Baktérium törzsek

1998. március 1. és június 29. között 663 baktériumot izoláltak az *Enterobacteriaceae* család tagjai közül a szolnoki Hetényi Géza Megyei Kórház koraszülött intenzív osztályáról. Az 1997. január 1.-ig visszamenőleg végzett retrospektív vizsgálat nem mutatott ki multirezisztens *K. pneumoniae* izolátumot.

3. ábra ESBL-termelő *K. pneumoniae*, nem ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumok, illetve egyéb *Enterobacteriaceae* izolátumok gyakorisága szolnoki PIC-en 1998. január és november között



Az első ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzs 1998. június 30.-án került izolálásra, majd 1998. november 30.-ig összesen 21 ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzset sikerült izolálni 15 beteg klinikai mintáiból. Augusztusban ESBL-termelő *Serratia marcescens* jelent meg egy egy héttel korábban ESBL-termelő *K. pneumoniae*-vel kolonizált koraszülött torokváladékában (**3. ábra**). Az augusztusban és októberben elvégzett környezeti szűrések kapcsán (143 minta) egy ESBL-termelő *K. pneumoniae* került izolálásra a fürdőszappanból. Az ápoló személyzet 22 tagján végeztek szűrővizsgálatot,

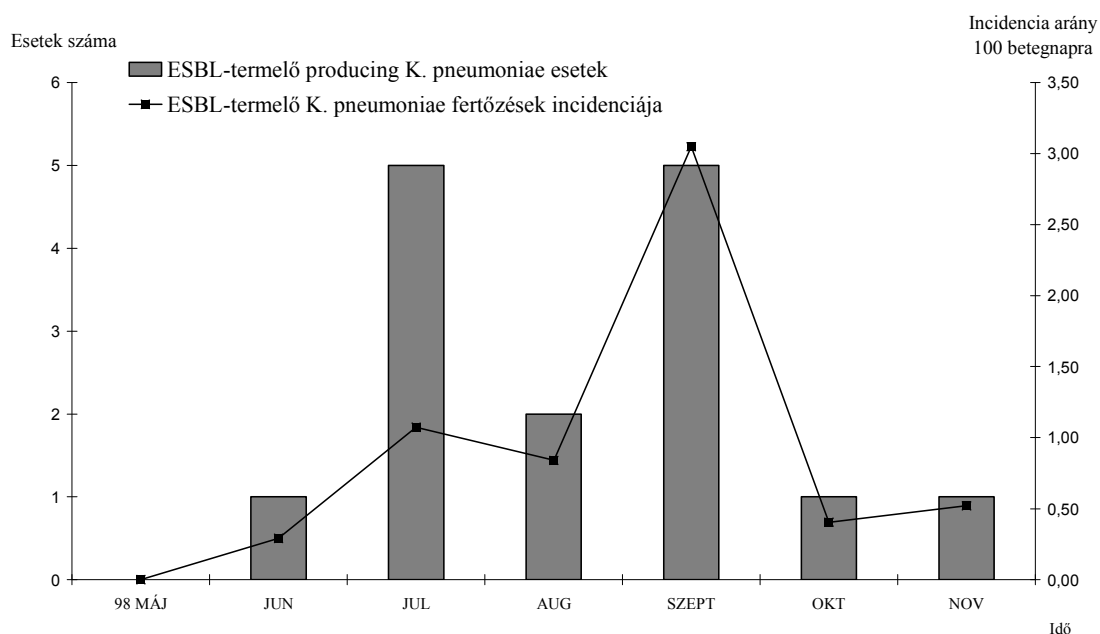
de ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzset nem sikerült izolálni. Ugyanebben az időszakban más osztályok klinikai mintáiból nem volt izolálható ESBL-termelő baktérium törzs.

7.1.2.2. Epidemiológiai vizsgálatok eredményei

A vizsgált periódus alatt a koraszülött intenzív osztályon izolált ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek által okozott klinikai esetek eloszlása a következőképpen alakult: a klinikai adatok alapján öt esetben okozott kolonizációt és tíz esetben infekciót az ESBL-termelő *K. pneumoniae* (6 kisfiú és 9 kislány): egy eset történt júniusban, öt júliusban, kettő augusztusban, öt szeptemberben, egy októberben és egy novemberben. Egy fertőzött újszülöttek meghalt.

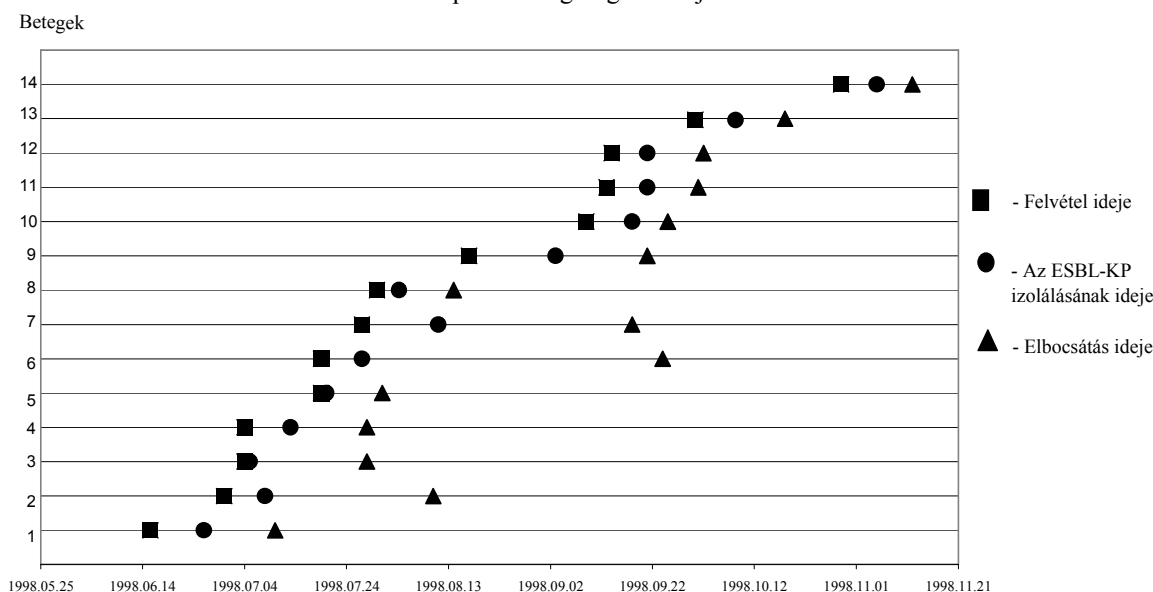
Ebben az időszakban 132 újszülöttet vettek fel az osztályra, így összesen 1835 betegnap adódott. Az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek havi incidenciája és a 95 %-os konfidencia intervallum júniustól novemberig a következő volt: 0.29 (0.04-2.06), 1.07 (0.45-2.57), 0.84 (0.21-3.36), 3.05 (1.27-7.33), 0.40 (0.06-2.84) és 0.52 (0.07-3.69) 100 betegnapra vonatkozóan (**4. ábra**).

4. ábra Az ESBL-termelő *K. pneumoniae* fertőzések száma és incidenciája a szolnoki PIC-en 1998. májusa és novembere között



Az **5. ábrán** látható az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzzsel fertőzött betegek felvételének és elbocsátásának epidemiológiai grafikonja, ahol jól látszik az időbeli átfedés a beteg bentléte alatt, kivéve az legutolsó beteget.

5. ábra Az ESBL-termelő *K. pneumoniae*-val (A1-es pattern) fertőzött betegek felvételének és elbocsátásának epidemiológiai grafikonja a szolnoki PIC-en



7.1.2.3. Plazmid profil meghatározás

A plazmid elemzés alapján az összes primer klinikai törzs (1-15 ESBL-termelő *K. pneumoniae*), a környezeti ESBL-KP és a *S. marcescens* törzs egyetlen nagy plazmiddal rendelkezett. Az 1-14 klinikai ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátum, a környezeti ESBL-termelő *K. pneumoniae* és a *S. marcescens* izolátum azonos méretű plazmidokkal rendelkezett, melyek azonos restrikciós képet mutattak *Hind*III (három sáv) és *Eco*RI (nyolc sáv) restrikciós endonukleáz enzimmel történő hasítás után, ami megerősítette plazmidjaik hasonlóságát. A 15. ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátum restrikciós profilja többszöri ismétlés ellenére sem volt látható (**4. táblázat**).

Az 1-14 ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumok ESBL-kódoló plazmidja átvihető volt az *E. coli* J53-2 törzsbe konjugáció révén és az *E. coli* DH5- α -ba transzformációval. Az SHV-t kódoló gén jelenlétét a plazmidon az összes törzs vonatkozásában megerősítettük.

4. táblázat Az izolált ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek jellemzése

Beteg	Antibiotikum rezisztencia kép	Plazmid izolálás	Konju- gáció	Transz- formáció	Restrikció EcoRI-gyel	Restrikció HindIII-mal	Béta- laktamáz pl	SHV- PCR	AP-PCR ERIC -2
1	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
2	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
3	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
4	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
5	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
6	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
7	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
8	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
9	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
10	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
11	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
12	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
13	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
14	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1
15	2	+	+	+	NM	NM	5.6 és 8.2	+	A2
KM	1	+	+	+	E1	H1	5.6 és 8.2	+	A1

Antibiotikum rezisztencia kép 1: ceftazidim, cefotaxim, ceftriaxon, cefoperazon, aztreonam, cefepim, cefpirom, gentamicin, tobramycin, netilmicin, trimethoprim-sulphametoxazol, tetracyclin rezisztens

Antibiotikum rezisztencia kép 2: ceftazidim, cefotaxim, ceftriaxon, cefoperazon, aztreonam, gentamicin, tobramycin, netilmicin rezisztens

NM: Nem meghatározott

KM: Környezeti ESBL-KP

7.1.2.4. Antibiotikum érzékenység meghatározása

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* izolátum antibiotikum rezisztencia képe eltérő volt; cefepimre, cefpiromra, trimethoprim/sulphamethoxazolra és tetracyclinre vonatkozó MIC értékei sokkal alacsonyabbak voltak, mint a többi esetben.

A Tfl1-Tfl14 transzformált *E. coli* MIC-értékei kissé alacsonyabbak voltak, mint a donor törzseké, de a β -laktám rezisztencia mintázata az ESBL-termelő donor törzsekével volt azonos (**5. táblázat**). A transzformált törzsek szintén rezisztenssé váltak gentamicinre, tobramycinre, netilmicinre és trimethoprim/sulphamethoxazolra, ami arra utalt, hogy az ezekre az antibiotikumokra vonatkozó rezisztenciát kódoló gének ugyanazon a plazmidon helyezkedtek el, mint az SHV-gén.

5. táblázat Az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek (ESBL-KP), az ESBL-termelő *S. marcescens* és az *E. coli* Dh5 α MIC (μ g/ml) értékei

Antibiotikum	MIC ₉₀ (μ g/ml):				
	ESBL-KP 1 - 14	ESBL-KP15	<i>S. marcescens</i>	<i>E. coli</i> DH5 α	
				R-	R+ Tf1-Tf14
Cefotaxim	> 32	> 32	> 32	0,032	> 32
Ceftazidim	> 32	> 32	> 32	< 0.5	16-32
Ceftazidim+ klavulánsav	0.75-1.5	1.5	3	< 0.125	0.38-0.75
Imipenem	0.75-1	0.38	1.5	0.25	0.75-1
Meropenem	0.094-0.125	0.094	0.125	0.094	0.032-0.094
Trimethoprim- sulphamethoxazol	> 32	0.38	> 32	0.016	> 32
Ciprofloxacin	0.064-0.75	0.064	0.064	0.19	0.064-0.19
Tetracyclin	> 256	6	> 256	1.5	> 256
Kloramfenikol	8-16	8	8	8	8
Gentamicin	>1024	>1024	>1024	< 0.064	128
Amikacin	1-3	2	4	1	1-3

R-: plazmid nélkül

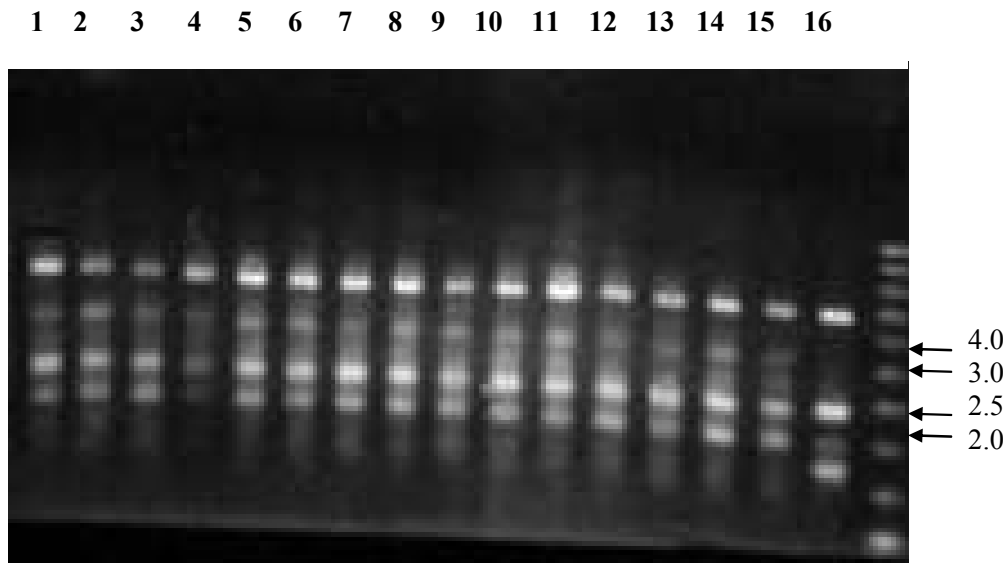
R+: plazmidaal nélkül

7.1.2.5. Izoelektromos fókuszálás

Az összes ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsnek, beleértve a környezeti törzseket, a *S. marcescens* izolátumot és a transzformált törzseket, β -laktamáz izoelektromos pontjai voltak 5.6 és 8.2 pI-értéknél. A 8.2 pI-érték az SHV-5 enzimnek felelt meg (**5. táblázat**).

7.1.2.6. Molekuláris epidemiológiai vizsgálat

Az összes ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzs két kromoszóma mintázatot mutatott AP-PCR módszerrel. Az 1-14 klinikai ESBL-KP izolátumok és a környezeti törzs A1 mintával rendelkezett, amely négy sávot tartalmazott, vonalat adva 5.0 kb-nál, 3.0 kb-nál, 3.0 és 2.5 illetve a 2.5 és 2.0 kb között. A 15-ös ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátum A2 mintát mutatott, amely szintén négy sávot tartalmazott, de 5.0, 2.5, 2.0 kb-nál illetve 2.0 és 1.5 kb között. (**6. ábra**). Az epidemiológiai vizsgálat során 14 esetet, az 1-14 ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek által okozott eseteket tekintettük egy klónba tartozó nozokomiális csoportnak. Az ESBL-termelő *K. pneumoniae* 15. esetet sporadikus esetnek tekintettük. (**5. táblázat**).



6. ábra A szolnoki PIC-en izolált 15 klinikai és az egy környezeti eredetű ESBL termelő *K. pneumoniae* törzsek ERIC-2 primerrel végzett AP-PCR-es képe. 1 sor AP-PCR képe a környezeti izolátumnak, 2-16 sor: AP-PCR-es képe a 15 klinikai anyagból származó ESBL termelő *K. pneumoniae* törzsnek, 17-es sor: DNS 1kb-os létra.

7.1.2.7. Epidemiológiai intézkedések

1990 óta minden klinikai esetben ceftazidimet alkalmaztak empirikus terápia gyanánt, amit 1998 júniusában korlátozásnak vetettek alá. Emellett az ESBL-termelő *K. pneumoniae* betegek szigorú elkülönítését, a kézmosás hangsúlyozását és az eldobható kesztyűk használatát is bevezették 1998. szeptemberében.

7.1.2. ESBL-termelő *Klebsiella spp.* ötéves követéses molekuláris epidemiológiai vizsgálatának eredménye a Semmelweis Egyetem II. Perinatalis Intenzív Centrumában

A *Klebsiella* fajok fontos szerepe a perinatalis intenzív osztályokon kialakuló fertőzésekben régóta ismert. A kórokozó túlél a környezetben és átmenetileg megtalálható az ápolószemélyzet kezén is, ami elősegíti az újszülött-újszülött átvitelt a PIC-en. A kiterjesztett spektrumú cefalosporinok bevezetése óta az ESBL-termelő *Klebsiella* törzsek különösen súlyos problémát jelentenek világszerte. Sok ESBL a TEM-1, TEM-2 vagy az SHV-1 származéka. A TEM-1-et, TEM-2-t vagy az SHV-1-et kódoló géneket érintő mutációk kiterjesztették a β -laktamázok szubsztrát-specifitását néhány szélesített spektrumú cefalosporinra és az aztreonamra. Ez jelentős nehézséget okoz a súlyosan beteg újszülöttek empirikus antibiotikum-terápiájában.

Míg néhány kórház klinikai mikrobiológiai laboratóriumában elérhetők molekuláris epidemiológiai eszközök, mint a PFGE, a legtöbb laboratórium számára ez nem megoldott. Ezért a *Klebsiella*-fertőzések dinamikája egyes kórházi egységekben, például a PIC-eken teljesen felderítetlen lehet.

Ötéves követéses molekuláris epidemiológiai vizsgálat során összegyűjtöttük a klinikai mintákból az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumokat és vizsgáltuk ESBL-termelésüket, illetve a *Klebsiella* fajok okozta fertőzések klinikai jellemzőit és meghatároztuk az ESBL-termelő *Klebsiella* fajok molekuláris epidemiológiáját egyazon PIC-en.

7.1.2.1. Baktérium törzsek

101 *Klebsiella* törzset azonosítottunk újszülöttekből (egy beteg—egy izolátum) két időszakban 2001. januártól 2003. júniusig és 2005. júniustól decemberig két éves időközönbséggel a Semmelweis Egyetem II. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának Újszülött Intenzív osztályáról. A vizsgált időszakban 46 újszülöttből izoláltunk ESBL-termelő *Klebsiella* törzseket, 55 újszülöttből pedig nem ESBL-termelő *Klebsiella* törzseket. Az első időszakban (2001. januártól 2003. júniusig) 25 ESBL-termelő *K. pneumoniae* és 9 ESBL-termelő *K. oxytoca* törzset, a második időszakban (2005. júniustól decemberig) 12 ESBL-termelő *K. oxytoca* törzset izoláltunk különböző betegekből.

7.1.2.2. A fertőzés kockázati tényezői

A klinikai tünetek alapján ESBL-termelő *K. pneumoniae* okozta fertőzéseket állapítottunk meg 23 újszülöttnél, 2 esetben pedig kolonizációt. Az ESBL-termelő *K. oxytoca* 16 újszülöttnél fertőést, öt betegnél kolonizációt okozott (**6. táblázat**). 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 (**7. táblázat**). Tehát összesen 84 esetben történt fertőzés *Klebsiella spp.*-kel a vizsgált időszakban.

6. táblázat Az ESBL-termelő *Klebsiella* speciesek által okozott fertőzések rizikófaktorainak összehasonlítása

Változók	ESBL-KO csoport (n=16)		ESBL-KP csoport (n=23)		P érték
	Átlag		Átlag		
Nem (férfi:nő)	7:9		12:11		0.73
Születési súly (g) <1500	6/16	828 (780-870)	7/23	982 (600-1380)	0.73
Születési súly (g) <1000	5/16	885 (780-1170)	4/23	788 (600-950)	0.81
Születési súly (g)	1740 (780-3240)		1841 (600-4300)		
Centrális katéter	3/16		6/23		0.73
Gépi lélegeztetés	10/16		14/23		0.71
Parenterális táplálás	14/16		22/23		0.83
Gesztációs kor (hetek) <36	14/16	31.8 (25-38)	20/23	32.3 (25-42)	0.70
Polimikrobás fertőzés	10/16		16/23		0.73
Császármetszés	9/16		14/23		0.71
Transzfúzió	7/16		11/23		0.71
Ikrek	6/16		6/23		0.76
Halálozás	2/16		4/23		0.72

KO: *K. oxytoca*

KP: *K. pneumoniae*

A nem ESBL-termelő *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* fertőzésekre vonatkozó vizsgált kockázati tényezők az **7. táblázat**-ban, míg az ESBL-termelő *Klebsiella* fajokra vonatkozóak a **6. táblázat**-ban találhatók. A vizsgált tényezők tekintetében—beleértve a nemet, a gesztációs időt, az ikerterhességet, a születési súlyt, a centrális vénás katéter jelenlétét, a gépi lélegeztetést, a mesterséges táplálást, a polimikrobás fertőzést, a császármetszést, a transzfúziót—nem találtunk statisztikailag jelentős különbséget az ESBL-termelő és a nem ESBL-termelő *Klebsiella* fajoknak megfelelő csoport között. Még ha a nem ESBL-termelő *Klebsiella* fajokkal fertőzött páciensek esetében nagyobb is 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 nem volt

statisztikailag szignifikáns. Egy haláleset volt nem ESBL-termelő *K. oxytoca* okozta fertőzésnek tulajdonítható, míg kettő ESBL-termelő *K. pneumoniae* okozta fertőzés következménye volt. A többi esetben nem volt bizonyítható az összefüggés a halálesetek és a *Klebsiella* fertőzések között.

7. táblázat A nem ESBL-termelő *Klebsiella* speciesek által okozott fertőzések rizikó-faktorainak összehasonlítása

Változók	Nem ESBL KO csoport (n=8)		Nem ESBL KP csoport (n=37)		P érték
		Átlag		Átlag	
Nem (férfi:nő)	8:0		21/37		0.99
Születési súly (g) <1500	3/8	1415 (570-1490)	9/37	1050 (470-1490)	0.99
Születési súly (g) <1000	2/8	670 (570-670)	15/37	802 (470-990)	0.99
Születési súly (g)		1784 (570-3450)		1709 (470-3840)	
Centrális katéter	2/8		6/37		0.99
Gépi lélegeztetés	7/8		20/37		0.99
Parenterális táplálás	8/8		36/37		0.99
Gesztációs kor (hetek) <36	8/8	31.3 (25-38)	29/37	32.7 (25-41)	0.99
Polimikrobás fertőzés	4/8		28/37		0.99
Császármetszés	4/8		27/37		0.99
Transzfúzió	3/8		22/37		0.99
Ikrek	0/8		9/37		0.99
Halálozás	1/8		1/37		0.99

KO: *K. oxytoca*

KP: *K. pneumoniae*

7.1.2.3. Antibiotikum érzékenység meghatározás

Noha két különböző időszakban kerültek az ESBL-termelő *Klebsiella spp.* izolálásra, az izolátumok igen hasonló érzékenységi profillal rendelkeztek: ezek között említendő a magas ceftazidim MIC értékek ($> 48 \mu\text{g/ml}$) és alacsonyabb cefotaxim MIC-értékek, mely utóbbiak az ajánlás alapján a mérsékelten érzékeny vagy érzékeny tartományba esnek (**8. táblázat**) (48). Klavulánsav jelenlétében minden izolátum esetén a cefotaxim és ceftazidim MIC-ek jelentősen csökkentek, $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ -re. A többi β -laktám– cefepim ($0.75\text{-}8 \mu\text{g/ml}$), imipenem ($0.25\text{-}0.38 \mu\text{g/ml}$), meropenem ($0.023\text{-}0.047 \mu\text{g/ml}$) - és a ciprofloxacín ($0.38\text{-}1 \mu\text{g/ml}$) MIC-értéke ugyanazon törzseknél az érzékeny tartományba esett. Minden törzs rezisztens volt gentamicinre ($>256 \mu\text{g/ml}$) és minden 2005 előtt izolált ESBL-termelő *Klebsiella spp.* törzs amikacinra is ($>32 \mu\text{g/ml}$).

8. táblázat Az ESBL-termelő *Klebsiella* törzsek antibiotikum érzékenysége

Baktérium törzsek	PFGE	CAZ	CAZ/CL	CTX	CTX/CL	FEP	IMP	MEM	AMK
<i>K. pneumoniae</i>	A	>256	0.38->4	8-48	0.064-0.125	2 - 4	0.25	0.023-0.032	>16
<i>K. pneumoniae</i>	B	128->256	0.25-0.38	8-48	0.094 -0.25	1-8	0.25-0.38	0.023-0.047	>16
<i>K. oxytoca</i>	C	24-256	0.125-0.38	8-12	0.047-0.094	1.5-2	0.25-0.38	0.023-0.032	>16
<i>K. oxytoca</i>	D	128>256	0.25-0.38	8-24	0.094 -0.25	2 - 4	0.25-0.38	0.023-0.047	>15
<i>K. pneumoniae</i>	E	64	0.19	6	0.064	0.75	0.25	0.023	>15
<i>K. oxytoca</i>	F	128->256	0.25-0.38	8-12	0.047-0.094	0.75-1.5	0.25-0.38	0.023-0.032	1-1.5

CAZ: ceftazidim, CAZ/CL:ceftazidim /klavulánsav,CTX: cefotaxim, CTX/CL cefotaxim/klavulánsav, FEP: cefepim, IMP: imipenem, MEM: meropenem, AMK: amikacin

7.1.2.4. Analitikai izoelektromos fókuszálás

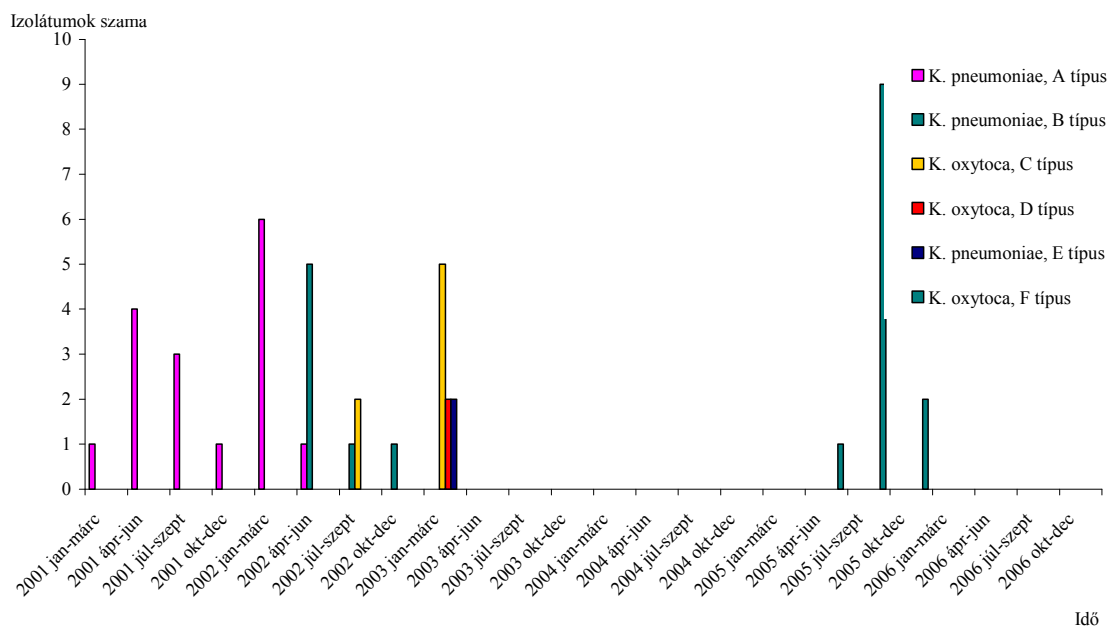
Mindegyik klinikai izolátum (mindkét időszaktól) expresszált β -laktamáz enzimet, pI 8.2-es értékkel, ami az SHV-típusú β -laktamázokra jellemző (**9. táblázat**). Kilenc *K. oxytoca* törzs 5.4 izoelektromos pontú β -laktamázt is termelt, jelezve egy járulékos TEM-1 szerű β -laktamáz enzim jelenlétét.

7.1.2.5. Pulzáló mezejű gélelektroforézis

Az ESBL-termelő *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* molekuláris tipizálása a vizsgált időszakban hat fő PFGE mintázatot azonosított, melyeket A-F betűkkel jelöltünk (**9. táblázat**). 2001. január és 2003. június között három különböző *K. pneumoniae* (A, B és E) és két különböző *K. oxytoca* törzset (C és D) azonosítottunk. 2005-ben egy új típusú (F típusú) *K. oxytoca* törzs jelent meg (**7. ábra**).

9. táblázat A II. 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

7. ábra ESBL-termelő *Klebsiella* törzsek időbeli eloszlása a SE II. PIC-en

7.1.2.6. Plazmid DNS preparálás és restrikciós elemzés

A teljes plazmid izolálás alapján az ESBL-termelő *Klebsiella* izolátumok között 5 különböző mintát (P1-P5) különítettük el (9. táblázat). A *K. pneumoniae* törzsek (A és B genotípus) azonos plazmid profillal rendelkeztek (P1), egy megközelítőleg 23 kb méretű plazmidot (P1) hordoztak. Az E genotípusú *K. pneumoniae* ettől eltérő plazmid profilt mutatott (P4), három plazmiddal: egy 94 kb méretűvel, egy 2 és 4 kb méret között ingadozóval és egy 2 kb-nál kisebb méretűvel. A *K. oxytoca* törzsek három különböző mintázatot mutattak: P2, P3 és P5. A *K. oxytoca* C genotípusnak két plazmidja volt: egy 94 kb-os és egy megközelítőleg 2 kb-os (P2). A D genotípusú *K. oxytoca*-ra a P3 plazmidtípus volt jellemző, amely egyetlen 94 kb méretű plazmidot foglal magába, míg az F genotípus esetében két plazmid jellemző: az egyik 94 kb-os, a másik 2 és 4 kb között változik (P5). A törzsekből izolált teljes plazmidok *EcoRI* és *HindIII* restrikciós enzimekkel történő restrikciója megerősítette az 5 különböző plazmid mintázatot.

7.1.2.7. PCR amplifikálás és szekvenálás

A β -laktamáz gének PCR-analízise a *bla_{SHV}* gén jelenlétét mutatta ki az összes ESBL-termelő *Klebsiella* izolátumban. Az amplifikált *bla_{SHV}* gének szekvencia analízise azonosított egy SHV-5 enzimet a PFGE A és B típusú *K. pneumoniae* és az F típusú *K. oxytoca* törzsekben. Az SHV-12 enzimet a PFGE C és D típusú ESBL-termelő *K.*

dc_112_10

oxytoca törzsekben azonosítottuk. A C és D genotípusú *K. oxytoca* törzsek TEM-1 enzimet is termeltek. Egyetlen törzsben sem volt jelen a CTX-M gén (**9. táblázat**).

7.2. ESBL enzimek jelenlétének detektálási lehetőségei az *Enterobacteriaceae* család tagjai között

7.2.1. ESBL enzimek fenotípusos detektálása *Enterobacter cloacae* törzsekben

A cefalosporin rezisztens *E. cloacae* gyakran izolált baktérium a hospitalizált betegek körében. A cefalosporin - ceftriaxon, cefotaxim vagy ceftazidim –kezelés során megjelenő cefalosporin rezisztenciáért az *ampC* gén expressziójának fokozódásához vezető mutációk a felelősek (46, 135).

A CLSI és az EUCAST által meghatározott ESBL fenotípusos szűrővizsgálatok csak *Klebsiella spp.*, *E. coli* és *P. mirabilis* törzsekre tartalmazznak ajánlásokat (48, 79). A kromoszómális AmpC-típusú β -laktamáz termelő törzsek esetében azonban ezek az ajánlások nem kidolgozottak. Vizsgálni kívántuk, hogy kromoszómális AmpC-típusú β -laktamázt is termelő *E. cloacae* törzsekben milyen módon tudjuk detektálni a párhuzamos ESBL termelést, ha a hagyományos tesztek a kromoszómális β -laktamáz enzim jelenléte miatt nem értékelhetők. Munkánk során 2003. március és 2004. július között a Pittsburgh-i Egyetem Orvosi Központjában izolált 45 hemokultúrából származó *E. cloacae* törzset vizsgáltunk.

7.2.1.1. β -laktamáz *termelés vizsgálata*

Az *E. cloacae* törzsek osztályozását AmpC β -laktamáz termelésük alapján az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak alapján végeztük el. Ezen kritériumok alapján a 45 *E. cloacae* törzs közül 19 volt derepresszált AmpC mutáns, 21 *E. cloacae* izolátum bizonyult részlegesen derepresszálnak, és öt törzs termelt indukálható AmpC enzimet.

A törzsek ESBL termelését először genetikai módszerekkel – PCR és szekvenálás – határoztuk meg, illetve a termelt β -laktamáz enzimek izoelektromos pontját izoelektromos fókuszálással határoztuk meg. A 45 *E. cloacae* törzsből 15 bizonyult ESBL termelőnek (**10. táblázat**). A törzsek által kódolt ESBL-ek között volt SHV-2 (egy izolátum), SHV-5 (egy izolátum), SHV-7 (nyolc izolátum), SHV-12 (két izolátum), SHV-14 (három izolátum) és SHV-30 (egy izolátum) termelő törzs is. Egy izolátum mind SHV-7-et, mind SHV-30 β -laktamáz enzimet termelt. A 15 ESBL-termelő *E. cloacae* izolátumból tizenegy tartalmazott *bla*_{TEM-1}-et a *bla*_{SHV} mellett. *Bla*_{CTX-M} gének jelenlétét nem sikerült igazolni. Az izolátumok izoelektromos pontját a **10. táblázat**-ban mutatjuk be.

10. táblázat ESBL-termelő *E. cloacae* izolátumok tulajdonságai

Törzsek	β -laktamáz enzimek	PCR és szekvenálás		pI	Plazmid profil
		SHV	TEM		
ES1	Derepresszált AmpC + ESBL	SHV-7	TEM-1	5.4+7.0+7.6+9.0	P1
ES6	Derepresszált AmpC + ESBL	SHV-7	TEM-1	5.4+7.6+9.0	P2
ES7	Derepresszált AmpC + ESBL	SHV-5	neg	8.2+9.0	P3
ES11	Derepresszált AmpC + ESBL	SHV-14	TEM-1	5.4+7.0+9.0	P4
ES15	Derepresszált AmpC + ESBL	SHV-14	neg	7.0+9.0	P5
ES18	Derepresszált AmpC + ESBL	SHV-7	TEM-1	5.4+7.6+9.0	P3
ES20	Derepresszált AmpC + ESBL	SHV-2	neg	7.6+9.0	P6
ES22	Derepresszált AmpC + ESBL	SHV-7	TEM-1	5.4+7.6+9.0	P1
ES24	Derepresszált AmpC + ESBL	SHV-7,SHV-30	TEM-1	5.4+7.0+7.6+9.0	P7
ES31	Derepresszált AmpC + ESBL	SHV-12	TEM-1	5.4+8.2+9.0	P2B
ES37	Derepresszált AmpC + ESBL	SHV-7	TEM-1	5.4+7.6+9.0	P4
ES40	Derepresszált AmpC + ESBL	SHV-7	TEM-1	5.4+7.6+9.0	P8
ES43	Részlegesen derepresszált+ ESBL	SHV-12	TEM-1	5.4+8.2	P2C
ES49	Derepresszált AmpC + ESBL	SHV-7	TEM-1	5.4+7.6+9.0	P4
ES53	Indukálható AmpC + ESBL	SHV-14	neg	7.0+9.0	P9

7.2.1.2. Antibiotikum érzékenység meghatározása

A nem-ESBL-termelő *E. cloacae* törzsek antibiotikum érzékenységét, a különböző antibiotikumok MIC értékeit ($\mu\text{g/ml}$) a **11. táblázat**-ban; az ESBL-termelő *E. cloacae* törzsek antibiotikum-érzékenységét pedig a **12 a és 12 b. táblázat**-ban adjuk meg.

Az ESBL-termelő izolátumok többsége számos antibiotikumra nem volt érzékeny: 14/15 ESBL-termelő izolátum nem volt érzékeny ceftazidimre, 12/15 gentamicinre, 8/15 ciprofloxacinre és 2/15 nem volt érzékeny ertapenemre. A CLSI breakpointjait tekintve határértéknek mind a 15 izolátum érzékeny volt imipenemre és meropenemre (48).

Az izolátumok 40 %-ának (18/45) volt 0.5 $\mu\text{g/ml}$ vagy magasabb MIC-értéke a cefepimre. A cefepimre vonatkozó MIC₉₀-érték az ESBL-termelő törzsek esetén 64 $\mu\text{g/ml}$, míg a nem ESBL-termelőknél 0,5 $\mu\text{g/ml}$ volt.

11. táblázat A nem ESBL-termelő *E. cloacae* törzsek antibiotikum érzékenysége, MIC (µg/ml)

Antibiotikum	Csoportok (törzsek száma)		
	Indukálható törzsek (4)	Részlegesen derepresszált törzsek (12)	Derepresszált mutánsok (7)
Piperacillin	0.5-64	0.5-16	32->256
Piperacillin/ Tazobaktám	0.75-3	12->256	16->256
Cefoxitin	0.19-6	1-12	128->256
Ceftazidim	0.125-0.5	0.094-12	12->256
Ceftazidim/ klavulánsav	0.38->4	1->4	>4
Cefotaxim	0.047-1	0.125-12	48->256
Cefotaxim/ klavulánsav	0.125->4	0.32->1	>1
Cefepim	0.094-0.032	0.064-0.5	0.125-0.75
Cefepim/ klavulánsav	<0.064-0.094	<0.016-0.5	<0.016-0.5
Ciprofloxacin	0.003-0.012	0.002-0.08	0.012->32
Imipenem	0.19-0.25	0.19-0.5	0.25-0.38
Gentamicin	0.25-0.5	0.19-0.75	0.5-192

12.a táblázat Az ESBL-termelő *E. cloacae* izolátumok MIC (µg/ml) értékei

	Piperacillin /Tazobaktám	Ceftazidim	Ceftazidim/ klavulánsav	Cefotaxim	Cefotaxim/ klavulánsav	Cefepim	Cefepim/ klavulánsav
ES1	16	>256	>4	128	>1	4	0.125
ES6	>256	>256	>4	>256	>1	8	>4
ES7	>256	>256	>4	>256	>1	>256	>4
ES11	8	48	>4	16	>1	2	0.5
ES15	>256	>256	>4	>256	>1	6	4
ES18	>256	>256	>4	>256	>1	64	>4
ES20	>256	>256	>4	>256	>1	8	>4
ES22	8	256	>4	192	>1	2	0.094
ES24	>256	>256	>4	12	>1	16	2
ES31	0.5	128	>4	8	>1	1	<0.016
ES37	>256	>256	>4	>256	>1	12	>4
ES40	12	>256	>4	96	>1	4	1,5
ES43	8	>256	1	64	>1	2	0.38
ES49	>256	>256	>4	>256	>1	16	>4
ES53	16	2	0.5	1	>1	0.5	0.19

12.b táblázat Az ESBL-termelő *E. cloacae* izolátumok MIC (µg/ml) értékei

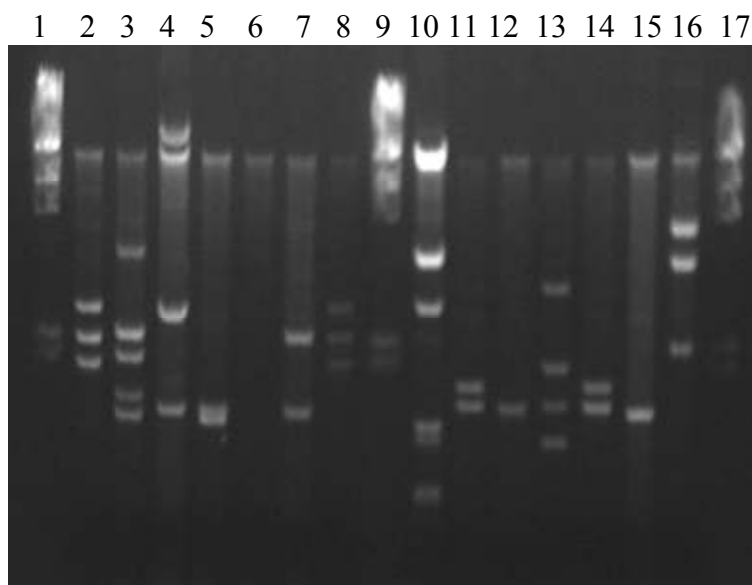
	Ciprofloxacin	Ertapenem	Imipenem	Meropenem	Gentamicin
ES1	0.38	0.125	0.25	0.032	24
ES6	>32	2	0.25	0.19	256
ES7	0.064	0.75	0.19	0.064	0.75
ES11	0.5	3	0.19	0.125	8
ES15	0.012	0.75	0.25	0.094	4
ES18	8	4	0.38	0.38	48
ES20	0.125	2	0.25	0.094	4
ES22	0.38	0.5	0.5	0.032	128
ES24	0.125	2	0.125	0.19	>1024
ES31	0.094	0.125	0.25	0.032	256
ES37	8	2	0.25	0.19	48
ES40	8	1	0.38	0.064	96
ES43	4	0.125	0.125	0.016	96
ES49	4	1	0.25	0.125	64
ES53	6	0.38	0.125	0,031	8

7.2.1.3. A törzsek azonosságának vizsgálata

Hogy az eredmények értékelhetőek legyenek PFGE módszerrel megvizsgáltuk a törzsek azonosságát. A 45 *E. cloacae* törzs közül 41 között nem volt semmilyen epidemiológiai kapcsolat. Az a 30 izolátum, amely nem mutatkozott ESBL-termelőnek, nem volt kapcsolatban egymással. Tenover kritériumai alapján a 15 ESBL-termelőből kettő az ES1 és a ES22 törzs között közeli kapcsolat volt, míg két további ESBL-termelő törzs ES31 és ES43 kapcsolatban lehetett egymással (271).

7.2.1.4. A törzsek plazmid-profiljának meghatározása

A fenti időszakban izolált, válogatott ESBL-termelő *E. cloacae* törzseket vizsgáltuk a plazmid-tartalom vonatkozásában (**8. ábra**). A plazmid tartalom alapján történő besorolást a **10. táblázat** mutatja. Az összes ESBL-termelő *E. cloacae* izolátumnak volt plazmidja, noha ezen plazmidok méretében nagy változatosság volt megfigyelhető (**8. ábra**).



8. ábra Az ESBL-termelő *E. cloacae* törzsekből származó plazmidok. Az 1-es, 9-es és 17-es sáv λ HindIII molekula méret markert tartalmazza. A 2-8 sávok ES1, ES6, ES7, ES11, ES15, ES18 és ES22 ESBL-termelő *E. cloacae* izolátumokat tartalmazzák, a 10-16 sávok pedig ES24, ES31, ES37, ES40, ES43, ES44 és ES45 *E. cloacae* törzseket tartalmazzák.

7.2.1.5. Fenotípusos ESBL-szűrő módszerek alkalmazása

Az *E. cloacae* törzsekre a *Klebsiella spp.* és *E. coli*-ra vonatkozó CLSI ESBL-szűrési korongdiffúziós kritériumokat alkalmazva – melyek alapján egy törzs ESBL-termelésre gyanús, ha a ceftazidim (30 μ g) és cefotaxim (30 μ g) korong körül a gátlási zóna átmérője 22 mm, illetve 27 mm alá csökken (48) - azt tapasztaltuk, hogy a 45 *E. cloacae* izolátum közül 23 törzs mutatott „pozitív” eredményt, holott ezek közül csak 14 volt valójában ESBL termelő a PCR, szekvenálás és az izoelektromos fókuszálás alapján (**13. táblázat**). A megerősítő vizsgálatok – klavulánsav jelenlétében a gátlási zóna átmérőjének a megnövekedése több, mint 5 mm-rel - csak 7/15 ESBL-termelő *E. cloacae* törzs esetén voltak pozitívak, azonban a nem ESBL-termelő *E. cloacae* törzsek esetén a megerősítő vizsgálatok mind negatívak voltak. A CLSI által *Klebsiella spp.*-re és *E. coli*-ra ajánlott ESBL-szűrési MIC-kritériumok – 1 μ g/ml breakpoint alkalmazása ceftazidim és cefotaxim esetében - az *E. cloacae* törzseken hasonló eredményekhez vezettek (**14. táblázat**), azonban a megerősítő tesztek – több mint háromszoros ceftazidim, cefotaxim MIC érték csökkenés klavulánsav jelenlétében (48) - csak 2/15 ESBL-termelő *E. cloacae* törzs esetén voltak pozitívak. A szokványos kettős korongdiffúziós teszteket alkalmazva

13. táblázat A különböző korongdiffúziós módszerek eredményének megoszlása

	Kategóriák		Szenzitivitás	Specificitás
	(Izolátumok száma)			
	ESBL	nem-ESBL		
NCCLS ESBL kezdeti szűrőteszt*				
Ceftazidim pozitív	14	9	0.93	0.7
negatív	1	21		
Cefotaxim pozitív	14	9	0.93	0.7
negatív	1	21		
NCCLS ESBL fenotípusos megerősítő teszt**				
Ceftazidim pozitív	7	0	0.47	1
negatív	8	30		
Cefotaxim pozitív	5	0	0.33	1
negatív	10	30		
Kettős-korong diffúziós teszt 20 mm				
Ceftazidim pozitív	6	0	0.4	1
negatív	9	30		
Cefotaxim pozitív	7	0	0.47	1
negatív	8	30		
Kettős-korong diffúziós teszt 30 mm				
Ceftazidim pozitív	1	0	0.067	1
negatív	14	30		
Cefotaxim pozitív	7	0	0.47	1
negatív	8	30		

* Az NCCLS által ajánlott gátlási zóna átmérő az ESBL termelés szűrésére <22mm ceftazidimre (30 µg) és <27mm for cefotaximre (30 µg) *E. coli* és *Klebsiella spp.* esetében

** A gátlási zóna átmérő >5 mm-rel történő megnövekedése klavulánsav jelenlétében

14. táblázat A NCCLS által ajánlott érzékenységi tesztek (MIC) eredményei versus az E-tesztek alapján megállapított MIC-értékek megoszlása, mint az ESBL detektálás és a fenotípusos megerősítés eszköze

		Kategoróriák		Szenzitivitás	Specificitás
		(Izolátumok száma)			
		ESBL	nem-ESBL		
NCCLS ESBL szűrőteszt*					
Ceftazidim	pozitív	15	8	1	0.73
	negatív	0	22		
Cefotaxim	pozitív	15	9	1	0.71
	negatív	0	22		
NCCLS ESBL fenotípusos megerősítő teszt**					
Ceftazidim	pozitív	2	0	0.13	1
	negatív	13	30		
Cefotaxim	pozitív	0	0	0	1
	negatív	30	30		

* Az NCCLS által ajánlott MIC breakpointok ESBL termelés szűrésére a legalább 1 µg/ml-os ceftazidim, cefotaxim MIC érték *E. coli* és *Klebsiella spp.* törzsek esetében

** A > 3 szoros MIC érték csökkenés klavulánsav jelenlétében

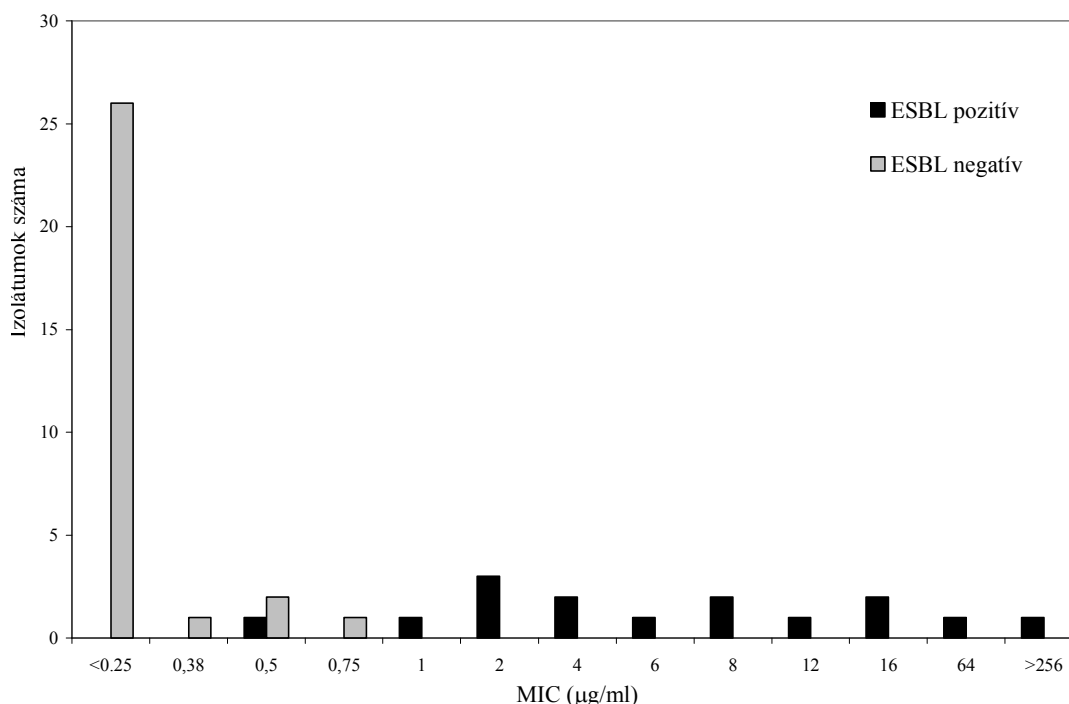
a ceftazidim és cefotaxim korongokat 20mm és 30mm távolságban alkalmazva a klavulánsav koronggal ritkán adódtak pozitívnak (**13. táblázat**).

A cefepim érzékenységnek az ESBL-termelés markereként történő alkalmazása jóval hasznosabbnak bizonyult (**15. táblázat**).

Az ESBL-termelő *E. cloacae* törzsek cefepim MIC-értékeinek a megoszlása a következő volt: 0.5 µg/ml - egy izolátum, 1 µg/ml - egy izolátum, 2 µg/ml - három izolátum, 4 µg/ml - két izolátum, 6 µg/ml - egy izolátum, 8 µg/ml - két izolátum, 12 µg/ml - egy izolátum, 16 µg/ml - két izolátum, 64 µg/ml - egy izolátum és > 256 µg/ml - egy izolátum. Az *Enterobacteriaceae*-re vonatkozó aktuális CLSI határértékeknek megfelelően 10/15 izolátumot cefepim-érzékenynek tekintettünk- MIC ≤8 µg/ml-; 3/15-öt mérsékelten érzékenynek és 2/15-öt cefepim-rezisztensnek – MIC >32 µg/ml. A cefepim MIC-értékének megoszlását a **9. ábrán** mutatjuk be.

Mind a 13 izolátum, melynek cefepim MIC-e 2 µg/ml vagy nagyobb volt, ESBL-termelőnek mutatkozott és 15/18 (83 %) izolátum, melynek cefepim MIC-e > 0.25 µg/ml volt, bizonyult ESBL-termelőnek. A cefepim-klavulánsavas megerősítő teszt csak 73 %-ban volt szenzitív korongdiffúzió esetén és 53 %-ban ≥ 3 MIC csökkenés esetén (**15. táblázat**).

9. ábra A vizsgált *E. cloacae* törzsek MIC értékeinek eloszlása



15. táblázat A cefepim alkalmazása az ESBL-termelés indikátoraként

	Kategóriák (Izolátumok száma)		Szenzitivitás	Specificitás
	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 ug/ml volt a vizsgálat során

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

7.2.2. ESBL enzimek újabb genotípusos detektálási lehetősége

Az ESBL-termelő organizmusok gyakran többféle β -laktamáz enzimet termelnek (23, 78, 218). Ez jelentheti különböző ESBL enzimek és nem ESBL enzimek termelését, többféle azonos típusú ESBL enzim termelését (például többféle TEM-típusú ESBL termelését egyazon izolátumban) (23), vagy egy kromoszómálisan kódolt SHV-1 és egy SHV-típusú ESBL termelését (42).

Számos módon elkülöníthetők a különböző β -laktamáz típusok egyetlen izolátumban (107). Az analitikai izoelektromos fókuszálás segítséget nyújthat az adott izolátum által termelt β -laktamáz enzimek jelenlétének és izoelektromos pontjának meghatározásában. Azonban sok különféle β -laktamáznak azonos izoelektromos pontja van, ezért ezzel a módszerrel nem határozható meg a β -laktamázok típusa. A *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} és *bla*_{CTX-M stb} stb. gének amplifikálása és szekvenálása a leggyakrabban alkalmazott eljárás (218). Ez az eljárás könnyen kivitelezhető, de így nem azonosíthatók biztosan az azonos típusba tartozó β -laktamázok: az alacsonyabb kópiaszámban jelenlévő géneket kisebb valószínűséggel lehet detektálni, mint a nagyobb mennyiségben jelenlévőket. Az azonos típusba tartozó többféle β -laktamáz detektálásához megfelelő módszer a *bla* gének klónozása és szekvenálása.

Ebben a vizsgálatban a párhuzamosan termelt SHV-típusú β -laktamáz enzimek kimutatására leírtunk egy fluoreszcensen jelzett oligonukleotid hidridizációs próbákat használó real-time PCR módszert, mellyel a „single” nucleotid polimorfizmusok meghatározhatóak. Ez egy gyors, érzékeny és specifikus módszer, amely egyetlen reakció során kimutatja a *bla*_{SHV} génben található mutációkat. A vizsgálat eredményeként azonosítottunk egy új SHV-variánst, az SHV-30-at, komplex β -laktamáz háttérrel.

7.2.2.1. A vizsgálat során használt törzsek

A real-time PCR SNP vizsgálatot elvégeztük az SHV-7 és SHV-30-termelő *E. cloacae* ES24 izolátumon, egy SHV-30-termelő plazmid-transzformált *E. coli* EP-MAX10B törzsön, csakúgy, mint az alábbi kontrollokon: SHV-18-termelő *K. pneumoniae* ATCC 700603, SHV-29-termelő KPC-1 termelő *K. pneumoniae*, egy β -laktamázt nem termelő *E. coli* EP-MAX10B, AmpC β -laktamázt termelő klinikai *E. cloacae* izolátum, illetve egy-egy ESBL- (SHV-5, SHV-7 és SHV-14) és AmpC β -laktamázt párhuzamosan termelő klinikai *E. cloacae* izolátum (16 táblázat).

16. táblázat Az SNP vizsgálat során használt törzsek és az általuk termelt β -laktamáz enzimek

Izolátumok (Izolátumok száma)	β -laktamáz enzimek
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	SHV-18
KPC-1 <i>K. pneumoniae</i>	SHV-29, KPC-1, TEM-1
<i>E. coli</i> DH10B	-
E4 <i>E. cloacae</i>	AmpC, SHV-7, SHV-30, TEM-1
<i>E. cloacae</i> klinikai törzs (1)	AmpC
<i>E. cloacae</i> klinikai törzs (2)	AmpC, SHV-5
<i>E. cloacae</i> klinikai törzs (7)	AmpC, SHV-7
<i>E. cloacae</i> klinikai törzs (1)	AmpC, SHV-14

7.2.2.2. Az *E. cloacae* ES24 törzs antibiotikum érzékenysége**17. táblázat** Az ES24 és a transzformáns *E. coli* EP-MAX10B antibiotikum érzékenysége

	MIC (ug/ml)	
	ES24	Transzformáns <i>E. coli</i> EP-MAX10B
Ceftazidim	>256	1.5
Ceftazidim+klavulánsav	>4	1.5
Cefotaxim	>256	1
Cefotaxim+klavulánsav	>1	0.094
Aztreonam	>256	0.38
Cefoxitin	>256	4
Cefepim	4	0.38
Ertapenem	2	0.012
Imipenem	0.75	0.5
Meropenem	0.19	0.023

A vizsgálat során használt *E. cloacae* ES24 törzset részletesebben jellemeztük, mivel ennek a törzsnek a vizsgálata kapcsán fejlesztettük ki az SNP RT-PCR technikát. Az *E. cloacae* ES24 antibiotikum érzékenysége a **17. táblázat**-ban látható. A törzs rezisztens volt ceftazidimre, aztreonamra és cefoxitinre, de mérsékelten érzékeny volt cefotaximra és cefepimre.



10. ábra Plazmid izolálás az *E. cloacae* ES24 törzsből. 1. sor λ HindIII, 2. sor *E. cloacae* ES24, 3. sor transzformáns *E. coli* 10B.

izolátum MIC értékei jóval alacsonyabbak voltak, mint az *E. cloacae* ES24 esetén (17. táblázat), az összes MIC-érték a vizsgált antibiotikumra az érzékeny tartományban volt.

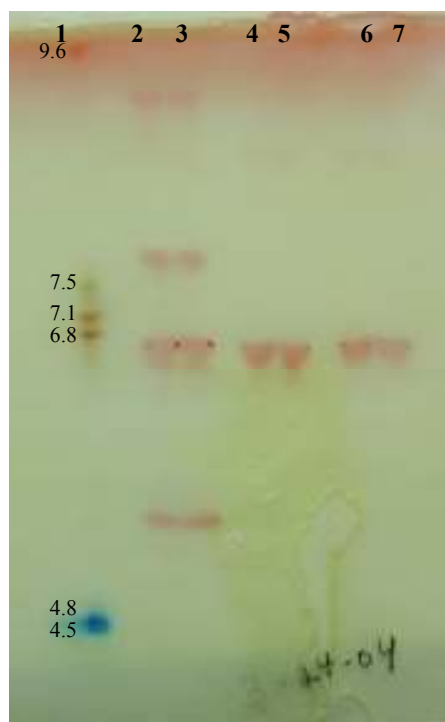
7.2.2.3. Az *E. cloacae* ES24 plazmid profilja

Az *E. cloacae* ES24 izolátumból 6 plazmidot izoláltunk. A plazmidok hozzávetőleges mérete a következő: 9.4, 3.0, 2.5, 2.3, 2.0 és ~ 0.8 kb. A β -laktamáz géneket hordozó plazmidok elkülönítése érdekében transzformációs kísérleteket végeztünk. Csak a legnagyobb plazmidot (9.4 kb) tudtuk transzformálni az *E. coli* EP-MAX10B-be. Mind az *E. cloacae* ES24, mint a plazmid-transzformált *E. coli* EP-MAX10B antibiotikum-érzékenysége a

17. táblázat-ban látható. A plazmid-transzformált *E. coli* EP-MAX10B

7.2.2.4. Az *E. cloacae* ES24 törzs izoelektromos fókuszálásának eredménye

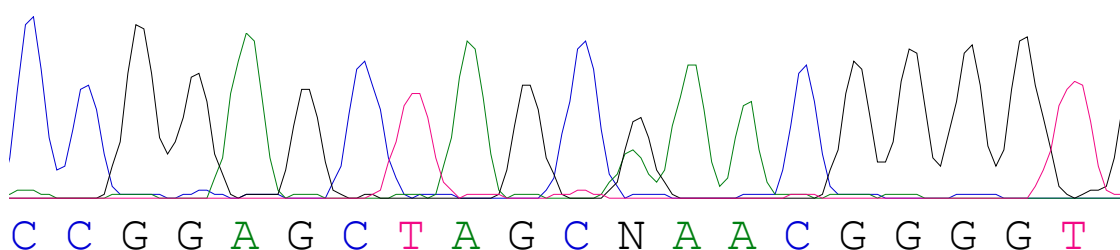
A *E. cloacae* ES24-ből és a plazmid-transzformált *E. coli* EP-MAX10B-ből származó β -laktamázokat izoelektromos fókuszálással karakterizáltuk. Az *E. cloacae* ES24 izolátumban négy különböző β -laktamázt azonosítottunk $pI = 5.4, 6.7, 7.6$ és ≥ 9 értékekkel. A plazmiddal transzformált *E. coli* EP-MAX10B izolátum csak egyetlen β -laktamázt termelt ($pI = 6.7$ értékkel) (11. ábra).



11. ábra Izoelektromos fókuszálás 1. sor IEF marker, 2.-3. sor *E. cloacae* ES24, 4.7. sor transzformáns *E. coli* 10B strain

7.2.2.3. Az *E. cloacae* ES24 szekvenálási eredményei

Az *E. cloacae* ES24 *bla* génjeinek PCR amplifikálása azonosította mind a *bla*_{TEM}-et, mind a *bla*_{SHV}-t. A *bla*_{TEM} gén *bla*_{TEM-1}-nek bizonyult. A *bla*_{SHV} PCR-termékének szekvenciaanalízise három, aminosavcserét eredményező nukleotidszubsztitúciót mutatott ki. Az Ambler szerinti 8-as helyen az izoleucin fenilalaninra, a 43-as helyen az arginin szerinre, míg a 238-as helyen a glicin cserélődött szerinre. A további szekvenciaanalízis két különböző kodonra derített fényt az Ambler szerinti 240-es helyen GAA (glutamát) és AAA (lizin), ennek megfelelően két csúcs volt látható (12. ábra).



12. ábra Az *E. cloacae* ES24 törzs szekvenciája az SHV enzim génjének 691-es és 711 pozíciója között

Annak megerősítése érdekében, hogy az *E. cloacae* ES24 izolátum különböző SHV-enzymeiket expresszál, a *bla*_{SHV} PCR-termékét TOPO vektorba klónoztuk. A klónozott izolátumok hordozták mind a *bla*_{SHV-7} gént (8-as helyen izoleucin fenilalaninra, 43-as helyen arginin szerinre, 238-as helyen glicin szerinre és a 240-es helyen glutamát lizinre szubsztituált), mind az új *bla*_{SHV-30} gént (8-as helyen az izoleucin fenilalaninra, a 43-as helyen arginin szerinre, míg a 238-as helyen glicin cserélődött szerinre).

Az plazmid-transzformált *E. coli* EP-MAX10B izolátumot a PCR amplifikálással negatívnak találtuk *bla*_{TEM}-re, de pozitívnak *bla*_{SHV}-re. A szekvenciaanalízis egyedül az új *bla*_{SHV-30} gént mutatta ki. Az eredményt a továbbiakban IEF-sal erősítettük meg (11. ábra).

7.2.2.3. Real-time PCR SNP genotipizálás

A vizsgálat során a 240-es helyen található aminosavat érintő GAA (glutamát) és AAA (lizin) mutációk detektálására tervezett próbákat alkalmaztunk (2).

dc_112_10

18. táblázat SHV pozitív izolátumok 692 és 711 pozíció közötti nukleotid szekvenciáinak összehasonlítása és az allél diszkriminációs vizsgálat eredménye

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 CGGGGT	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 CC A AA CGG GGT	NM
SHV-29	1	KPC-1 termelő <i>K. pneumoniae</i>	CC GGA GCT G CC G AA CGG GGT	NM

K* G és A együtt

NM: nem meghatározott

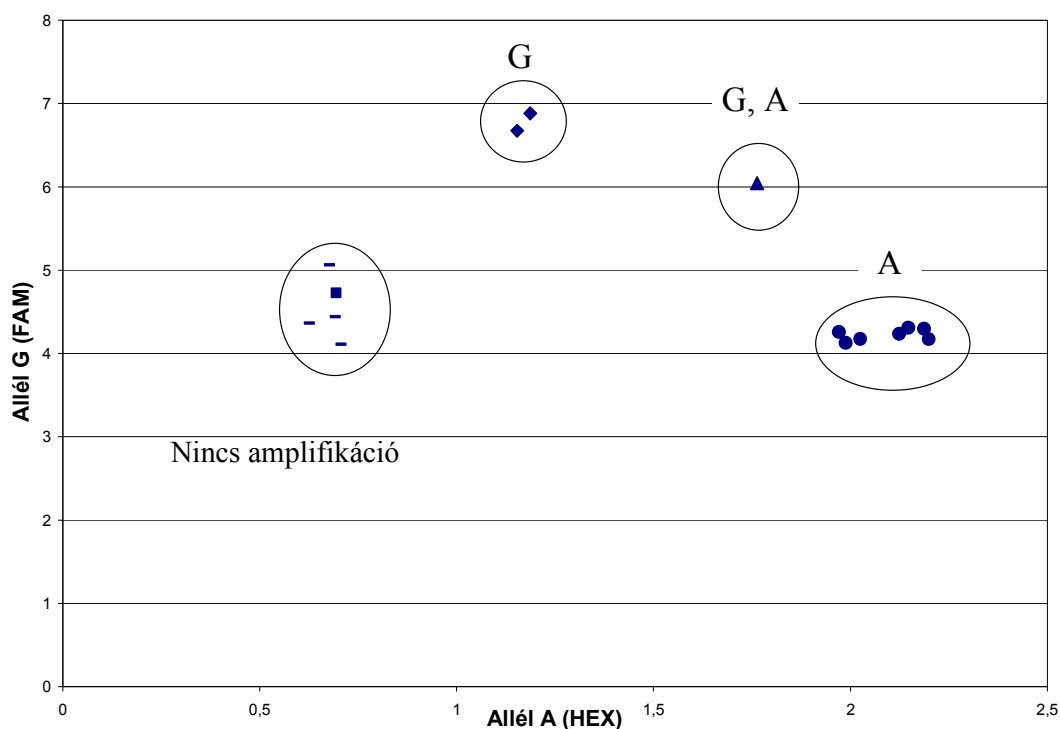
A **18. táblázat**-ban felsoroltuk a vizsgált izolátumokkal kapcsolatos adatokat és eredményeket és összehasonlítottuk a próbáknak megfelelő helyen a nukleotidszekvenciákat. Ha a próba hibridizált, az egyik festék fluoreszcens jelének másikkhoz viszonyított fokozódása homozigotáságot jelzett az adott PCR allélre vonatkozóan (FAM fluoreszcencia a G allélre és HEX fluoreszcencia az A allélre). Mindkét jel növekedése heterozigotáságra utalt. A felerősített fluoreszcens jeleket grafikus formában összehasonlítottuk (**13. ábra**). A grafikonon látható ponthalmazok a homozigóta G, a homozigóta A, a heterozigóta GA genotípusnak illetve amplifikálás nélküli genotípusnak felelnek meg.

Az *E. cloacae* ES24 izolátum jelentős emelkedést mutatott mind a FAM, mind a HEX festék fluoreszcenciájában (**13. ábra**). Mindkét festék jelének emelkedése a G és a A allélek homozigotáságra utal a 703-as nukleotidpozícióban.

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 allélre vonatkozó homozigotáságra utal. Csak a G volt jelent a 703-as pozícióban (**13. ábra**). Mindazonáltal az SHV-14 termelő *E. cloacae* izolátumok a 700-as helyzetű nukleotidban különbséget mutattak a próbához képest (**18. 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 (**13. ábra**).

dc_112_10



13. 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 β -laktamáz termelő *E. cloacae* törzs, ■ víz

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 (13. ábra). A szekvenálási eredmények alapján az SHV-18 termelő *K. pneumoniae* ATCC 700603 izolátumban a 703-as 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 (18. táblázat), aminek következtében a specifikus próba nem kötődött a DNS-hez.

A nem transzformált *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 (13. ábra), mivel nem tartalmazták a *bla*_{SHV} gént.

7.3. Új ESBL enzimek izolálása

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

7.3.1. A TEM-131 jellemzése

A TEM-131-t termelő törzsek 2003-ban humán mintából származó *Salmonella* spp.-t vizsgáló dél-afrikai körvizsgálat során kerültek izolálásra. A vizsgálat során három *S. enterica* muenchen szerotípusú és hat *S. enterica* isangi szerotípusú izolátum hordozta a TEM-63 gént, míg két *S. enterica* isangi szerotípusú és kilenc *S. enterica* typhimurium tartalmazta az új TEM-131 gént. Egy *S. enterica* Isangi szerotípusú és hét *S. enterica* Typhimurium szerotípusú törzs termelte az új TEM-131 enzimen kívül az SHV-5-öt is. A TEM-63 szekvenciájának aminosav-szubsztitúciói a TEM-1 β -laktamáz szekvenciájával összehasonlítva a Leu21Phe, Glu104Lys, Arg164Ser és Met182Thr voltak. Az új TEM β -laktamáz (TEM-131) a TEM-63-tól egyetlen aminosavban különbözött (Ala237Thr).

7.3.1.1. A TEM-131 antibiotikum érzékenysége

19. táblázat TEM-63 és TEM-131-termelő *Salmonella* spp. MIC értékei (μ g/ml)

Antibiotikumok	<i>S. isangi</i>			<i>S. muenchen</i>		<i>S. typhimurium</i>
	TEM-63 (6)	TEM-131 (1)	TEM-131+SHV-5 (5)	TEM-63 (3)	TEM-131 (2)	TEM-131+SHV-5 (7)
Cefotaxim	2-3	16	32	1.5-3	6	16-64
Cefotaxim/ klavulánsav	0.094-0.38	0.38	0.38	0.94	0.125	0.19-0.38
Ceftazidim	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Ceftazidim/ klavulánsav	3->4	>4	>4	0.75->4	0.5	0.75-4
Cefepim	4-6	8	12	3-8	4	8-16
Cefoxitin	3-12	4	4	2	2	2
Imipenem	0.25	0.5	0.38	0.25-0.38	0.25-0.38	0.19-0.38
Meropenem	0.023-0.047	0.032	0.032	0.032-0.047	0.023-0.032	0.023-0.047
Nalidixsav	>256	3	4	4	4	>256
Ciprofloxacin	0.094-0.125	0.012	0.012	0.012	0.008-0.012	0.19-0.25

A TEM-131-et termelő izolátumok ceftazidim MIC-értékei meghaladták a 256 µg/ml-t, a cefotaxim MIC-ek 6 és 64 µg/ml között, míg a cefepim MIC-ek 4 és 16 µg/ml között voltak (**19. táblázat**). Ezeket a tartományokat észleltük a transzformált *E. coli* DH5α törzsekben is, míg a TEM-63-at termelő izolátumok ceftazidim MIC-értékei meghaladták a 256 µg/ml-t, a cefotaxim MIC-ek valamelyest alacsonyabbak voltak a TEM-131-et termelő törzsekhez képest (1.5 µg/ml cefotaxim MIC a TEM-63 termelő transzformált *E. coli* DH5α törzsnél, illetve 6 µg/ml a TEM-131-et termelő törzsnél (**20. táblázat**).

20. táblázat Különböző plazmidokat tartalmazó *E.coli* DH5α törzs antibiotikum érzékenysége, MIC (µg/ml) plazmid nélkül (Tf-) és plazmiddal (Tf+)

Antibiotikum	<i>E. coli</i> DH 5α	<i>E. coli</i> DH 5 alfa (Tf+)		
	(Tf-)	TEM-63	TEM-131	TEM-131+SHV-5
Cefotaxim	0.94	1.5	6	16
Cefotaxim/ klavulánsav	<0.25	0.125	0.25	0.25
Ceftazidim	0,5	>256	>256	>256
Ceftazidim/ klavulánsav	<0.25	1.5	1.5	1.5
Cefepim	0.064	3	2	4
Cefoxitin	4	4	4	4
Imipenem	0.38	0.38	0.38	0.38
Meropenem	0.023	0.032	0.032	0.032

7.3.2. Az SHV-30 enzim karakterizálása

2004-ben a Pittsburgh-i Egyetem Orvosi Központjában ápolt beteg hemokultúrájából izoláltuk az SHV-30 enzimet termelő *E. cloacae* törzsből. Az SHV-30 enzimnek az SHV-1 enzimtől különböző aminosav szekvenciája a **21. táblázaton** látható.

21. táblázat SHV-típusú β -laktamáz enzimek aminosav szekvenciája a különböző pozíciókban

β -laktamázok	Aminosavak a különböző pozíciókban az Ambler számozási séma szerint						
	8	19	35	43	64	238	240
SHV-1	I	L	L	R	E	G	E
SHV-2			Q			S	
SHV-7	F			S		S	K
SHV-11			Q				
SHV-30*	F			S		S	
SHV-85*		M	Q				

* új enzimek
 E: glutaminsav, F: fenilalanin, G: glicin, I: izoleucin, K: lizin, L: leucin, M: metionin,
 Q: glutamin, R: arginin, S: szerin

7.3.2.1. A *bla*_{SHV-7}, *bla*_{SHV-30}, *bla*_{(SHV-1) R43S} és *bla*_{(SHV-1) I8F-R43S} előállítás

A site-directed mutagenesis után a *bla*_{SHV-1}, *bla*_{SHV-7}, *bla*_{SHV-30}, *bla*_{(SHV-1) R43S} és *bla*_{(SHV-1) I8F-R43S} géneket egyenként azonosítottuk a 20 μ g/ml kloramfenikolt tartalmazó lemezekről véletlenszerűen kiválasztott transzformált *E. coli* DH10B DNS-szekvenálásával.

7.3.2.2. Antibiotikum-érzékenység meghatározása agardilúcióval

Annak érdekében, hogy felderítsük az Ile8Phe, Arg43Ser és Gly238Ser mutációk hatását a β -laktamáz aktivitásra, in vitro homogén genetikai háttérben értékeltük ki az enzimaktivitásokat a MIC-értékek meghatározásával *E. coli* DH10B-ben. Az összes törzsben jelen voltak a mutáns gének közvetlenül pBC SK (-) fágvektorokba klónozva. A különböző β -laktámok és β -laktamáz inhibitorok MIC-értékeit az **22.a**, **22.b**, **23.a**, és **23.b táblázat**-ban mutatjuk be. Az Arg43Ser mutáció nem befolyásolta lényegesen a különböző β -laktám antibiotikumok MIC-értékét az SHV-1 β -laktamázzal összehasonlítva. Kis emelkedést figyeltünk meg a cefotaxim (0.06 SHV-1 illetve 0.125 μ g/ml Arg43Ser), és a cefepim (0.25 SHV-1 illetve 0.5 μ g/ml Arg43Ser) MIC-értékében.

22.a táblázat Különböző SHV mutánsokat tartalmazó pBCSK plazmiddal rendelkező *E. coli* DH10B MIC (µg/ml) értékei agardilúcióval meghatározva

Antibiotikum	MIC (µg/ml)		
	DH10B pB CSK SHV-1	DH10B pB CSK SHV-1 43S	DH10B pB CSK SHV-1 238S
Ampicillin	16000	16000	16000
Ampicillin/klavulánsav	50/2	50/4	50/<0.06
Amoxycillin/klavulánsav (2 µg/ml)	2/2	2/2	0.0.6/2
Piperacillin	1000	1000	500
Piperacillin/tazobaktám	500/4	500/4	4/4
Cefalotin	64	32	1000
Ceftriaxon	0.13	0.13	8
Ceftazidim	2	2	8
Cefotaxim	0.0.64	0.125	8
Cefepim	0.25	0.13	2

A

Gly238Ser mutáció mind a négy vizsgált cefalosporin MIC-értékét növelte; a cefalotin, cefotaxim, ceftazidim, cefepim MIC-e megnőtt az SHV-1-hez képest. A Gly238Ser mutáció a klavulánsav iránti érzékenységet fokozta, csökkentve ezzel az ampicillin/klavulánsav MIC-értékét.

22.b táblázat Különböző SHV mutánsokat tartalmazó pBCSK plazmiddal rendelkező *E. coli* DH10B MIC (µg/ml) értékei agardilúcióval meghatározva

Antibiotikum	MIC (µg/ml)			
	DH10B pB CSK SHV-1 8F-43S	DH10B pB CSK SHV-1 8F-238S	DH10B pB CSK SHV-1 43S-238S	DH10B pB CSK SHV-1 8F-43S-238S
Ampicillin	NM	NM	NM	8000
Ampicillin/klavulánsav	NM	NM	NM	50/0.25
Amoxycillin/klavulánsav (2 µg/ml)	NM	NM	NM	0.125/2
Piperacillin	2000	500	500	1000
Piperacillin/tazobaktám	1000/4	64/4	32/4	64/4
Cefalotin	NM	NM	NM	512
Ceftriaxon	0.25	16-32	8	16-32
Ceftazidim	2	16	8	16
Cefotaxim	NM	NM	NM	16
Cefepim	0.5	4-8	2-4	4

NM :nem meghatározott

7.3.2.3. Antibiotikum-érzékenység meghatározása E-tesztel

Mind az E-teszt mind az agarhígításos MIC-vizsgálat során enyhe emelkedést tapasztaltunk a cefotaxim MIC-értékében az Arg43Ser variáns esetén, az SHV-1-gyel összehasonlítva. Hasonló módon, kétszeres emelkedést figyeltünk meg az IlePhe-Arg43Ser-Gly238Ser (SHV-30) cefotaxim MIC-értékeiben a Gly238Ser (SHV-2)-hez képest (**23.a és 23.b táblázat**). Agarhígításos módszerrel a ceftazidim és ceftriaxon MIC-értékét is nagyobbak találtuk az Arg43Ser-Gly238Ser esetén, mint a Gly238Ser mutációnál (**23.a és 23.b táblázat**). Ismert, hogy a Gly238Ser szubsztitúció növeli az ESBL-ek érzékenységét a β -laktamáz inhibitorokra. Meglepő módon az Ile8Phe-Arg43Ser szubsztitúciók ellensúlyozták a Gly238Ser aminosavcsere által okozott érzékenységet klavulánsavra, szulbaktámra és tazobaktámra, azonban nem állították vissza az SHV-1-re jellemző szintekre (**23.a és 23.b táblázat**).

23.a táblázat Különböző SHV mutánsokat tartalmazó pBCSK plazmával rendelkező *E. coli* DH10B MIC ($\mu\text{g/ml}$) értékei E-tesztel meghatározva

Antibiotikum	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
	DH10B	DH10B pB CSK SHV-1	DH10B pB CSK SHV-1 43S	DH10B pB CSK SHV-1 238S
Ampicillin	3	>256	>256	>256
Ampicillin/szulbaktám	2	>256	>256	16
Amoxycillin/klavulánsav	6	24	16	16
Piperacillin	1.5	>256	>256	>256
Piperacillin/tazobaktám	1	>256	>256	4
Cefuroxim	4	12	12	>256
Aztreonam	0.064	0.5	1.5	8
Cefpodoxim	0.75	3	2	>256
Ceftriaxon	0.064	0.19	0.125	>32
Ceftazidim	0.125	6	4	32
Ceftazidim/klavulánsav	0.25	1	0.32	0,75
Cefotaxim	0.032	0.125	0.5	32
Cefotaxim/klavulánsav	0.023	0.064	0.094	0.38
Cefepim	0.047	1	0.5	8
Cefepim/klavulánsav	<0.064	0.094	<0.064	0.094

23.b táblázat Különböző SHV mutánsokat tartalmazó pBCSK plazmiddal rendelkező *E. coli* DH10B MIC ($\mu\text{g/ml}$) értékei E-teszttel meghatározva

Antibiotikum	MIC ($\mu\text{g/ml}$)				
	DH10B	DH10B	DH10B	DH10B	DH10B
	pB CSK SHV-1 8F-43S	pB CSK SHV-1 8F-238S	pB CSK SHV-1 43S-238S	pB CSK SHV-1 8F-43S-238S	pB CSK SHV-1 8F-43S-238S-240K
Ampicillin	>256	>256	>256	>256	>256
Ampicillin/szulbaktám	>256	24	32	24	12
Amoxycillin/klavulánsav	16-24	6	16	16	16
Piperacillin	>256	>256	>256	>256	>256
Piperacillin/tazobaktám	>256	1.5	>256	>256	4
Cefuroxim	8	>256	>256	>256	>256
Aztreonam	0.25	6	12	6	>256
Cefpodoxim	2	>256	>256	>256	>256
Ceftriaxon	0,125	>32	>32	>32	>32
Ceftazidim	6	32-48	96	32	>256
Ceftazidim/klavulánsav	NM	NM	1.5	NM	NM
Cefotaxim	0.25	48	>256	64	64
Cefotaxim/klavulánsav	NM	NM	>1	NM	NM
Cefepim	0.25	8	12	6	6
Cefepim/klavulánsav	NM	NM	0.38	NM	NM

NM: nem meghatározott

7.3.2.4. Kinetikai elemzés

A Gly238Ser (SHV-2) és az Arg43Ser, Gly238Ser (SHV-30) szubsztitúciók hatását a kinetikai paraméterekre a **24. táblázat**-ban mutatjuk be az SHV-1-gyel összehasonlítva.

24. táblázat Az SHV-1, SHV-2 és SHV-30 kinetikai paraméterei

	SHV-1			SHV-2 G238S			SHV-30 R43S G238S		
	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)
Nitrocefin	20 ± 4.0	157 ± 7.0	8.0 ± 1.0	9.5 ± 2	37 ± 2	4 ± 0.5	19 ± 4	57 ± 3	3 ± 0.5
Ampicillin	124 ± 27	2417 ± 214	19.5 ± 2.7	10 ± 2	30 ± 2	3 ± 0.4	8.5 ± 0.2	160 ± 0.7	19 ± 0.4
Cefalotin	33 ± 5	97 ± 6	3.0 ± 0.26	6 ± 0.7	51 ± 1.6	8.5 ± 0.7	6.01 ± 0.2	18 ± 0.17	3 ± 0.7
Cefaloridin	53 ± 10	150 ± 13	3 ± 0.34	42 ± 13	467 ± 144	10 ± 0.2	10.5 ± 1.8	11.1 ± 0.47	1.06 ± 0.14
Cefotaxim	NM	NM	NM	18 ± 2.3	11 ± 0.2	0.6 ± 0.1	4.9 ± 0.01	6.6 ± 0.01	1.3 ± 0.01
Cefepim	NM	NM	0.06 ± 0.006	NM	NM	0.6 ± 0.07	NM	NM	0.9 ± 0.18

$K_m(\text{mM})$; $k_{\text{cat}}(\text{s}^{-1})$; $k_{\text{cat}}/K_m(\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$, cefepim esetében $k_{\text{cat}}/K_m = v_{\text{ET}}/[S]$ egyenletet használtuk

NM: nem meghatározott

Az SHV-1 és az SHV-30 k_{cat}/K_M értéke azonos volt ampicillin esetén, míg az SHV-2-nek alacsonyabb k_{cat}/K_M értéke volt ampicillinre, mint az SHV-1-nek és az SHV-30-nak. Ez talán a k_{cat} és a K_M értékek azonos mértékű csökkenésével magyarázható az SHV-30-nál. Az SHV-2 enzim esetén az ampicillinre vonatkozó k_{cat} érték csökkenése nagyobb volt (81-szeres), mint a K_M -érték csökkenése (12-szeres). Az SHV-1 és SHV-30 cefalotinra vonatkozó k_{cat}/K_M értéke is azonos volt, míg az SHV-2-nek magasabb k_{cat}/K_M értékei voltak, mint az SHV-1-nek és az SHV-30-nak. Az SHV-30 esetén egyenlő mértékben csökkentek a k_{cat} és K_M értékek, így a k_{cat}/K_M érték nem változott. Az SHV-2-nek magasabb k_{cat}/K_M értéke volt, mivel a k_{cat} csökkenése kisebb mértékű volt (2-szeres), mint a K_M -é (5-szörös).

A cefaloridinra az SHV-2-nek nagyobb k_{cat}/K_M értéke volt, mint az SHV-1-nek; a k_{cat} érték 3-szorosára növekedett, míg a K_M érték igen kismértékben csökkent. Az SHV-30-nak alacsonyabb volt a k_{cat}/K_M -je, ami azzal magyarázható, hogy a cefaloridinre vonatkozó k_{cat} érték csökkenése nagyobb volt (14-szeres), mint a K_M érték csökkenése (5-szörös).

Az SHV-30 k_{cat}/K_M értéke nagyobb volt a cefotaximra, mint az SHV-2-é. A két enzimnek azonos volt a k_{cat} értéke, de a K_M kétszer nagyobb volt az SHV-2 esetén, mint az SHV-30-nál. Figyelemreméltó, hogy az Arg43Ser szubsztitúció Gly238Ser jelenlétében helyreállította az enzim katalitikus hatékonyságát az ampicillinre vonatkozóan (Gly238Ser jelenlétében a katalitikus hatékonyság SHV-1-ének csak 16 %-a) (**24. táblázat**).

25. táblázat A tisztított SHV-1, SHV-2 és SHV-30 tazobaktámra vonatkozó K_D értékei

β -laktamáz enzim	K_D (tazobaktám)
SHV-1	442 ± 18 nM
SHV-2 (Gly238Ser)	207 ± 10 nM
SHV-30 (Arg43Ser-Gly238Ser)	200 ± 20 nM

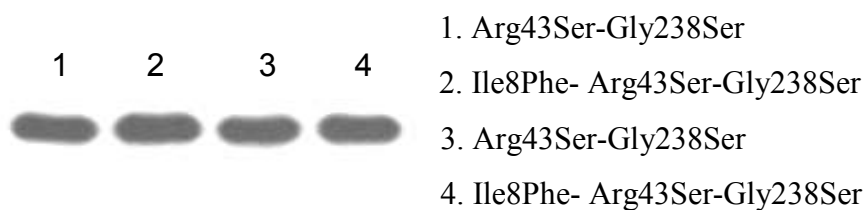
A tazobaktámra vonatkozó K_D közel azonos az SHV-30 és SHV-2 esetén (**25. táblázat**).

Az SHV-30 β -laktamáznál tapasztalt cefotaxim k_{cat}/K_M érték megkétszereződése alapján úgy gondoljuk, hogy a cefotaxim MIC-eredménye szignifikáns volt (8→16 mg/ml, Gly238Ser és Arg43Ser-Gly238Ser variánsok).

7.3.2.5. A termelt enzim mennyiségi meghatározása

Immunblottolást végeztünk anti-SHV antitest alkalmazásával Arg43Ser-Gly238Ser és Ile8Phe- Arg43Ser-Gly238Ser SHV-variánsokat tartalmazó *E. coli* DH10B sejtek overnight tenyésztével. Kismértékű emelkedést tapasztaltunk a Ile8Phe- Arg43Ser-Gly238Ser mutációkat tartalmazó β -laktamáz termelésben steady state állapotban (**14. ábra**). Mivel az immunblottolás kvantitatív megítélése nem volt egyértelmű ezért, ELISA-t alkalmaztunk annak eldöntésére, hogy az észlelt különbségek szignifikánsak voltak-e (**26. táblázat**). Az ELISA eredmények a β -laktamáz mennyiség kétszeres emelkedésére utaltak. Az 1-es és 2-es sáv mutatja az 1. összeállítást, míg a 3-as és 4-es sávok ismétlések.

14. ábra Az Arg43Ser-Gly238Ser és Ile8Phe- Arg43Ser-Gly238Ser SHV-variánsokat tartalmazó *E. coli* DH10B sejtek immunblottolásának eredménye



26. táblázat A termelt SHV enzim mennyiségének meghatározása ELISA-val

Sorok	ng/ml SHV
Arg43Ser-Gly238Ser (1. sor)	274.4 $\pm$ 13.4
Ile8Phe- Arg43Ser-Gly238Ser (2. sor)	502.8 $\pm$ 35.5
Arg43Ser-Gly238Ser (3. sor)	262.3 $\pm$ 25.1
Ile8Phe- Arg43Ser-Gly238Ser (4. sor)	481.6 $\pm$ 33.8

7.3.3. CTX-M-59 jellemzése

A CTX-M-59-t egy brazil újszülött intenzív osztályon ESBL-termelő *K. pneumoniae* járvány vizsgálata során izoláltuk. A CTX-M-59 a CTX-M-2 új változata H98L szubsztitúcióval, az Ambler számozási séma szerint. Annak megállapítása érdekében, hogy a CTX-M-59-ben megfigyelt aminosavcsere befolyásolta-e a β -laktám rezisztencia szintjét, CTX-M-2-t és CTX-M-59-et egyaránt termelő *E. coli* klónokat állítottunk elő. A nukleotidszekvenciák megerősítése után a CTX-M-2 termelő *E. coli* DH10B(pCTX-M-2)-t és a CTX-M-59 termelő *E. coli* DH10B(pCTX-M-59)-t használtuk a β -laktámok MIC-értékének meghatározására (27. táblázat).

7.3.3.1 CTX-M-2-t és CTX-M-59-et egyaránt termelő *E. coli* klónok antibiotikum érzékenysége

Az *E. coli* DH10B(pCTX-M-59) β -laktám MIC-értékei nem különböznek számottevően az *E. coli* DH10B(pCTX-M-2) MIC-értékeitől (27. táblázat). Mindkét klón a CTX-M típusú enzimeket termelő organizmusokra jellemző érzékenységi mintázatot mutatott, a

27. táblázat Az *E. coli* DH10B törzs MIC értékei a *bla*_{CTX-M-2/59} plazmidokkal

Antibiotikum	MIC (μ g/ml)	
	<i>E. coli</i> DH10B (pCTX-M-2)	<i>E. coli</i> DH10B (pCTX-M-59)
Ceftazidim	8	8
Ceftazidim/klavulánsav	0.38	0.38
Cefotaxim	128	96
Cefotaxim/klavulánsav	0.094	0.94
Aztreonam	12	12
Cefepim	4	4
Ertapenem	0.016	0.016

ceftazidimnél magasabb szintű cefotaxim-rezisztenciával. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a CTX-M-59 kinetikai tulajdonságait a H89L szubsztitúció nem változtatta meg az elődjéhez, a CTX-M-2-höz képest.

7.3.4. SHV-85 jellemzése

Az SHV-85-t szintén a brazil újszülött intenzív osztályon ESBL-termelő *K. pneumoniae* járvány vizsgálata során izoláltuk. Az SHV-85 az SHV-11 új variánsa L19M szubsztitúcióval, amely a szignál peptidben található (21. táblázat).

7.4. Plazmidon kódolt kinolon rezisztencia (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* és *aac(6')-Ib-cr*) gének vizsgálata ESBL-termelő *Enterobacteriaceae* törzsekben

A kinolon-rezisztencia bélbaktériumok körében, főleg *E. coli* esetén tapasztalt magas prevalenciáját már leírták Európában, Amerikában és Ázsiában (281). Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumokban a kinolon-rezisztencia általában a kromoszómáisan kódolt II. típusú topoizomerázok, efflux pumpák vagy porin-kapcsolt fehérjék génjében történt mutációk következménye. *K. pneumoniae* és *E. coli* esetén a kinolon-rezisztencia gyakrabban fordul elő plazmidon kódolt ESBL termelő törzsek között, mint ESBL-negatív törzseknél, ami az egyes rezisztencia mechanizmusok koordinált expressziójának tulajdonítható. Közelmúltban megfigyeltek átvihető, plazmidon elhelyezkedő kinolon-rezisztencia géneket—*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, az *aac(6')-Ib-cr* változata és *qepA*— klinikai izolátumokban, leggyakrabban plazmid-mediált kiterjedt-spektrumú β -laktamázokat (ESBL) termelő törzsekben (34, 39, 60, 131, 184, 250). A Qnr determinánsok három főbb csoportját, a QnrA-t, QnrB-t és QnrS-t különböző bélbaktérium fajokban azonosították világszerte (34, 131, 213, 232, 250, 295, 300). A Qnr egy 218 aminosavból álló fehérje, amely a pentapeptid-repeat családba tartozik és azáltal védi a DNS-t, hogy gátolja a kinolonok kötődését a girázhoz és a topoizomeráz IV-hez (174). Noha a *qnr* csak alacsony szintű kinolon-rezisztenciát okoz és nem tűnik gyakorinak, hozzájárulhat rezisztencia kialakulásához megváltozott kinolon célenzimek, efflux pumpa aktiváció vagy a külső membrán porin csatornáinak defektusai révén.

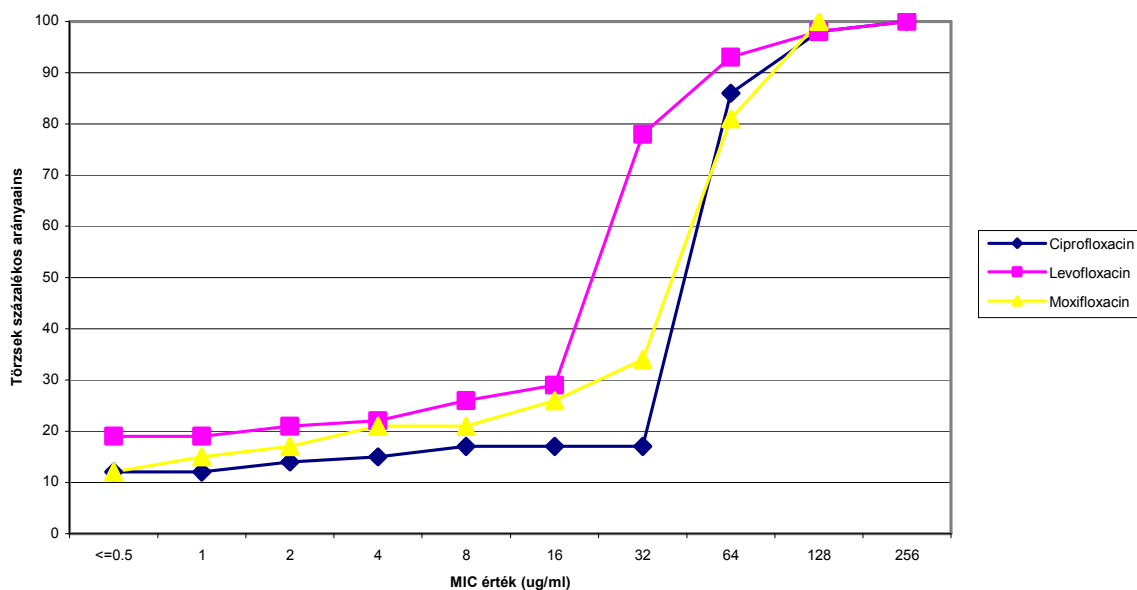
A *qnr* gének és *aac(6')-Ib-cr* jelenlétét klinikai izolátumokban még nem vizsgálták Magyarországon. Ennek a vizsgálatnak a célja a *qnr* és *aac(6')-Ib-cr* gének prevalenciájának és genetikai tulajdonságainak meghatározása volt ESBL-termelő *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.* klinikai izolátumokban.

7.4.1. ESBL-termelő törzsek kinolon érzékenysége

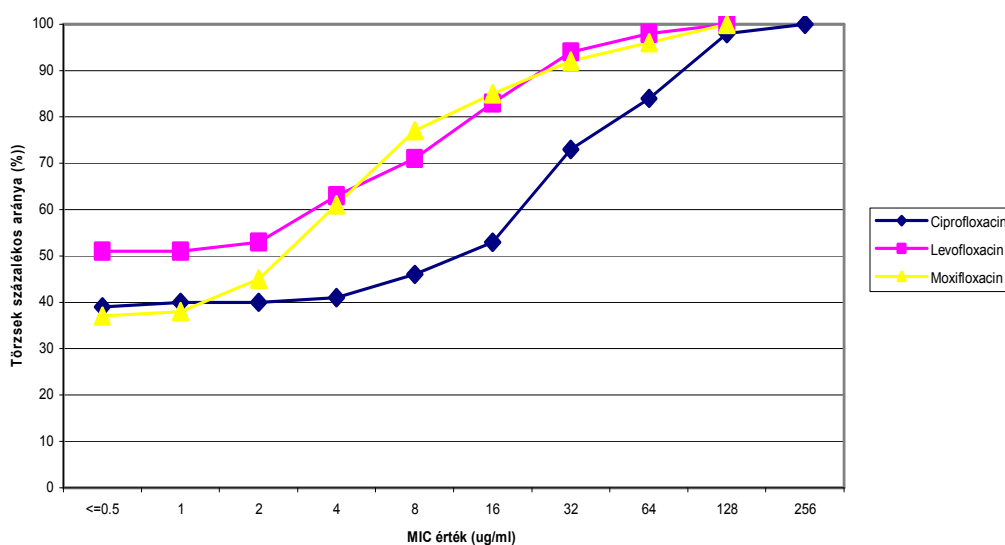
A vizsgálat során 2002 és 2006 között az Állami Egészségügyi Központban (ÁEK) izolált 70 ESBL-termelő *E. coli*, 101 ESBL-termelő *K. pneumoniae*, 5 ESBL-termelő *C. freundii* és 61 ESBL-termelő *Enterobacter spp.* baktériumot vizsgáltunk. 61 ESBL-termelő *Enterobacter spp.* izolátumból 57 volt rezisztens nalidixsavra (93%) és 50 (82%) ciprofloxacinra. 101 ESBL-termelő *Klebsiella spp.* izolátumból 79 (78%) volt rezisztens nalidixsavra, 60 (60%) pedig ciprofloxacinra. A 70 ESBL-termelő *E. coli*

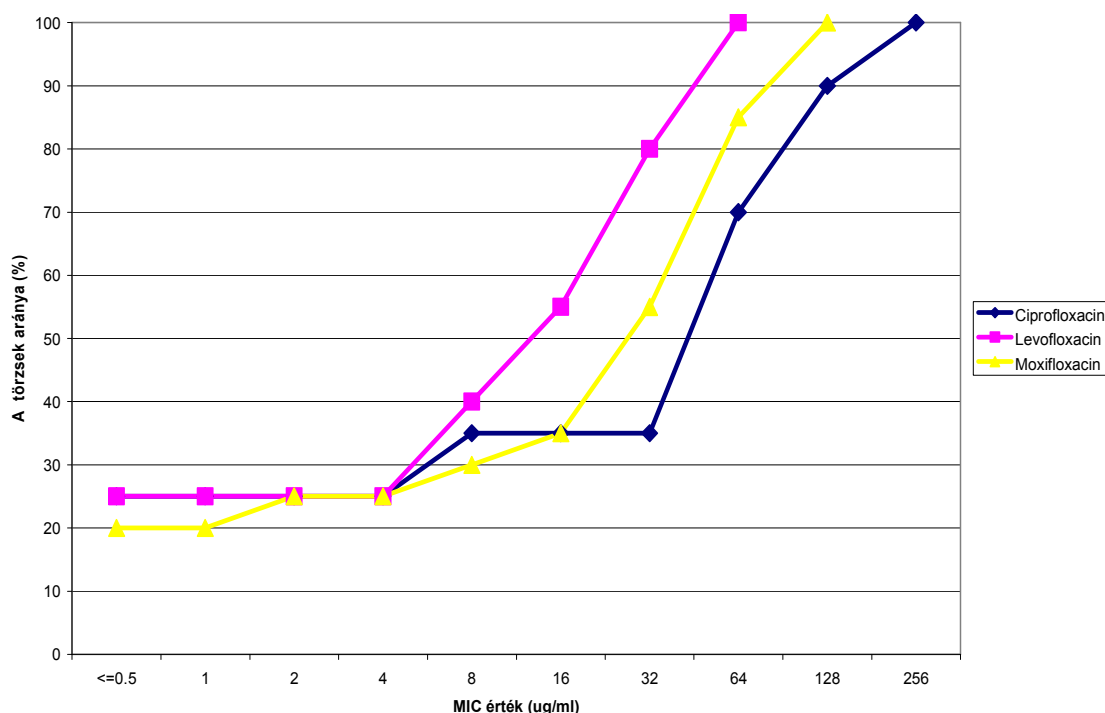
izolátumból 65 (93%) volt nalidixsav-rezisztens és 54 (77%) ciprofloxacin-rezisztens. 1 ESBL-termelő *C. freundii* (az ötből) és egy ESBL-termelő *P. morganii* volt rezisztens ciprofloxacinra. Az ESBL-termelő *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* és *E. coli* törzsek kumulatív MIC értékei a vizsgált kinolonokra vonatkozóan az **15. 16 és 17. ábrán** láthatóak.

15. ábra Az ESBL-termelő *Enterobacter spp.* kumulatív MIC ($\mu\text{g/ml}$) értéke



16. ábra Az ESBL-termelő *Klebsiella spp.* kumulatív MIC ($\mu\text{g/ml}$) értéke



17. ábra Az ESBL-termelő *E. coli* törzsek kumulatív MIC ($\mu\text{g/ml}$) értéke

7.4.2. A *qnrA,B,S* és *aac(6')-Ib-cr* pozitív ESBL-termelő törzsek jellemzése

7.4.2.1. A *qnr* és *aac(6')-Ib-cr* gének prevalenciája

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. A *qnrA1*, *qnrB2* és *qnrS1* volt kimutatható és a *qnrA1*-nek volt a legnagyobb prevalenciája (3%). Az összes ESBL-termelő izolátumból hatvanhárom (26,6 %) volt pozitív *aac(6')-Ib-cr*-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.

7.4.2.2. A *qnrA*-pozitív törzsek jellemzése

A *qnrA1*-pozitív törzsek - hat *K. pneumoniae* és egy *E. coli* - rezisztensek voltak nalidixsavra, norfloxacinra, ciprofloxacinra és levofloxacinra, igen magas MIC-értékekkel (28. táblázat). A konjugációs próba, mely három *qnrA1*-pozitív törzs esetében volt sikeres, megerősítette, hogy a *qnrA1* gén jelenléte önmagában csupán alacsony szintű kinolon-rezisztenciát okoz (28. táblázat). Az *E. coli* J53 Rif^R -hez (nalidixsav: 4 $\mu\text{g/ml}$; norfloxacin: 0.06 $\mu\text{g/ml}$; és ciprofloxacin, 0.12 $\mu\text{g/ml}$) képest a transzkonjugánsok MIC-értékei 8-szor magasabbak voltak nalidixsavra, 132-szer

magasabbak norfloxacinra és 66-132-szer magasabbak ciprofloxacinra. Azonban a transzkonjugánsok így is csak alacsony szintű kinolon-rezisztenciát mutattak, ami arra utal, hogy az eredeti izolátumok magasszintű kinolon-rezisztenciája számos rezisztencia-mechanizmus együttes hatásának tulajdonítható. A *qnr*-pozitív törzsekből és a *qnr*-pozitív konjugált baktériumokból izolált plazmidok azonos méretűek voltak (>10 kb).

28. táblázat A *qnr*- pozitív törzsek MIC értékei

Törzsek	<i>qnr</i> gének	MIC (ug/ml)		
		Nalidixsav	Ciprofloxacin	Levofloxacin
<i>E. coli</i> M136	<i>qnr A1</i>	>32	>256	64
<i>K. pneumoniae</i> 124	<i>qnr A1</i>	>32	64	64
<i>K. pneumoniae</i> 125	<i>qnr A1</i>	>32	64	128
<i>K. pneumoniae</i> M88	<i>qnr A1</i>	>32	64	8-16
<i>K. pneumoniae</i> M140	<i>qnr A1</i>	>32	256	128
<i>K. pneumoniae</i> M143	<i>qnr A1</i>	>32	32	64
<i>K. pneumoniae</i> M95	<i>qnr A1, qnrB2</i>	>32	>256	128
<i>C. freundii</i> M141	<i>qnr B2</i>	2	<0.5	<0.5
<i>K. pneumoniae</i> 96	<i>qnrS1</i>	>32	4	4

7.4.2.3. A *qnrB*-pozitív törzsek jellemzése

A *qnrB* gént két izolátumban detektáltuk: egy *K. pneumoniae* és egy *C. freundii* törzsben. A *K. pneumoniae* M95 mind a *qnrA1*, mind a *qnrB2* géneket hordozta, de csak a *qnrA1* volt konjugációval átvihető, ami a két gén eltérő genetikai hátterére utal (**29. táblázat**). A ciprofloxacin és levofloxacin MIC-értékei a *K. pneumoniae* M95-ben voltak a legmagasabbak a többi *qnrA1*-pozitív törzssel összehasonlítva, ami az eredeti izolátum egyidejű *qnrA1*- és *qnrB2*-termelésével magyarázható. Önmagában a *qnrA1* átvitele nem eredményezett jelentős változást a kinolon-érzékenységben a transzkonjugánsok esetében.

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 (clsi2005).

29. táblázat A konjugált baktériumok jellemzői

Eredeti törzsek	Konjugálás	<i>qnr</i> gének jelenléte	A konjugált sejtek MIC (µg/ml) értékei		
			Nalidixsav	Ciprofloxacin	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	-				
<i>K. pneumoniae</i> M143	-				
<i>K. pneumoniae</i> M95	+	<i>qnr A1</i>	>32	8	8
<i>C. freundii</i> M141	+	negatív			
<i>K. pneumoniae</i> 96	+	negatív			

7.4.2.4. A *qnrS*-pozitív törzsek jellemzése

A *qnrS1* gént csak egy olyan *K. pneumoniae* törzsben detektáltuk, amelyik rezisztens volt a legtöbb vizsgált fluorokinolonra. Azonban a norfloxacin (16 µg/ml) és a ciprofloxacin (4 µg/ml) MIC-értékei a CLSI által javasolt határértékek voltak. A levofloxacin MIC-értéke (4 µg/ml) a két CLSI határérték (8 és 2 µg/ml) között volt.

7.4.2.5. A *aac(6')-Ib-cr*-pozitív törzsek jellemzése

A 19 *aac(6')-Ib-cr*-pozitív izolátumból 6 (32%) volt érzékeny mind ciprofloxacinra, mind levofloxacinra.

7.4.2.6. A *qnr*-pozitív törzsek által termelt β-laktamáz enzimek jellemzői

Meghatároztuk a *qnr*-pozitív törzsek által termelt β-laktamáz enzimek jellemzőit: izoelektromos pontok, PCR és szekvenálási adatok (**30. táblázat**). Tanulmányunk szerint a *qnrA1* gén jelenléte kapcsolt volt az SHV-5, SHV-12 és CTX-M-15 enzimekkel (**30. táblázat**). A *qnrB2*-pozitív *C. freundii* törzsben található ESBL enzim genotípusát nem tudtuk meghatározni. A *qnrS1* gént együtt találtuk az SHV-2 ESBL génnel.

30. táblázat A *qnr* -pozitív törzsek által termelt β -laktamáz enzimek jellemzői

Törzsek	β -laktamáz karakterizálás	
	pI	PCR, szekvenálás
<i>E. coli</i> M136	5.4, 8.2	TEM-1, SHV-12
<i>K. pneumoniae</i> 124	5.4, 8.2	TEM-1, SHV-12
<i>K. pneumoniae</i> 125	5.4, 8.2	TEM-1, SHV-12
<i>K. pneumoniae</i> M88	8.2	SHV-5
<i>K. pneumoniae</i> M140	5.4, 8.2	TEM-1, SHV-12
<i>K. pneumoniae</i> M143	8.6, 8.9	CTX-M-15
<i>K. pneumoniae</i> M95	5.4, 8.2	TEM-1, SHV-12
<i>C. freundii</i> M141	>9.0	NM
<i>K. pneumoniae</i> 96	5.4, 7.6	TEM-1, SHV-2

NM: nem meghatározott

7.5. Karbapenem rezisztens Gram-negatív baktériumok vizsgálata

7.5.1. Ertapenem rezisztens *Enterobacter cloacae* törzs vizsgálata

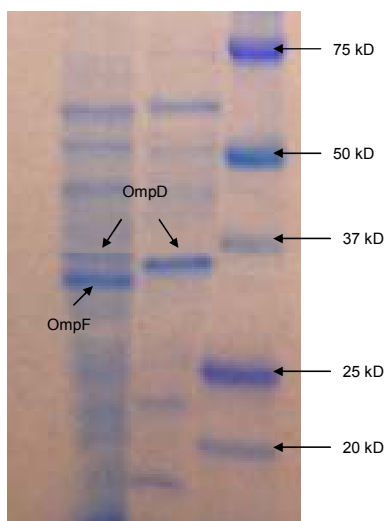
Hemokultúrából izolált ertapenem rezisztens *E. cloacae* (ER24) antibiotikum rezisztencia-mechanizmusait vizsgáltuk és hasonlítottuk össze ugyanannak a betegnek két héttel korábban szintén hemokultúrából izolált ertapenem érzékeny izolátumával (ES24). A beteg három hétig imipenemet és amikacint kapott, ertapenemet azonban nem kapott.

7.5.1.2. Antibiotikum érzékenység meghatározása

Az ES24 törzs érzékeny volt karbapenemekre (ertapenem MIC 2 µg/ml; imipenem és meropenem MIC-ek 0.25 µg/ml), míg az ER24-nek magasabb karbapenem MIC-értékei voltak (ertapenem >32 µg/ml; imipenem 4 µg/ml; és meropenem 6 µg/ml). A MIC értékek azonban 40 µg/ml PAβN, egy antibiotikum-efflux-pumpa inhibitor jelenlétében megváltoztak. Az ES24 törzsnél a PAβN-nek csak minimális hatása volt a MIC-értékekre, kivéve a ciprofloxacint (a MIC >32-ről 2 µg/ml-re csökkent (**31. táblázat**)). Az ER24 törzsnél a PAβN jelenlétében csökkent a ciprofloxacint (>32-ről 3 µg/ml-re), a meropenem (6-ről 0.75 µg/ml-re), és az ertapenem MIC-értéke (>32-ről 12 µg/ml-re) is (**31. táblázat**).

31. táblázat A PAβN efflux-pumpa inhibitor hatása különböző *E. cloacae* törzsek antibiotikum érzékenységére

Antibiotikum	<i>E. cloacae</i> (ER24)		<i>E. cloacae</i> (ES24)		<i>E. cloacae</i> ATCC 13047	
	-	+ PABN (40 µg/ml)	-	+ PABN (40 µg/ml)	-	+ PABN (40 µg/ml)
Piperacillin	>256	>256	>256	>256	6	2
Ceftazidim	>256	>256	>256	>256	3	2
Cefotaxim	>256	64	24	16	2	1.5
Cefepim	24	24	3	8	0.19	0,5
Ertapenem	>32	12	2- 3	1 - 2	0.064	0.064
Imipenem	6	3	0.75	0.38	0.19	0.19
Meropenem	4 - 6	0.75	0.25	0.25	0.032	0.032
Ciprofloxacint	>32	3	>32	2	0.023	0.012



18. ábra Az ES24 és ER24 *E. cloacae* izolátumokból izolált külső membrán fehérjék SDS-PAGE képe

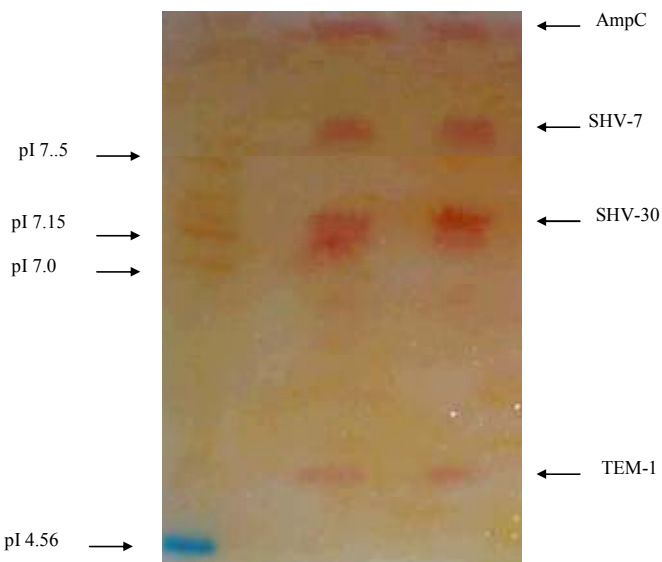
7.5.1.3. Külső membránfehérjék izolálása

A külső membrán fehérjék (OMPs) izolálása majd SDS-PAGE-s futattása után az ES24 izolátumban két nagy fehérje volt megfigyelhető a 25kDa és 37kDa markerek között, melyeket mint az *Enterobacter spp.*-re jellemző 36 kDa nagyságú OmpF külső membrán fehérjeként és 35 kDa nagyságú OmpD külső membrán fehérjeként tudtunk értékelni. Az ER24 izolátumból csak egy 36 kDa nagyságú fehérjét az OmpD-t tudtunk izolálni (**18. ábra**).

7.5.1.4. β -laktamáz enzimek jellemzése

Az analitikai izoelektromos fókuszálás során mind az ES24, illetve az ER24 *E. cloacae* izolátum által termelt β -laktamáz enzimek négy sávban voltak kimutathatóak a 5.4-es, 7.0-s, 7.6-os és ≥ 9 -es izoelektromos pontokkal (**19. ábra**). A PCR vizsgálatok, illetve az ezt követő szekvenálás a *bla*_{TEM-1}, a *bla*_{SHV-7}, a *bla*_{SHV-30} és a *bla*_{MIR} β -laktamáz gének jelenlétét erősítették meg.

Az ES24 és ER24 β -laktamázok nem indukált állapotban viszonylag alacsony aktivitással hidrolizálták a nitrocefint (10 és 20 μ M/s/mg teljes fehérje



19. ábra Az ES24 és ER24 *E. cloacae* izolátumok által termelt β -laktamáz enzimek izoelektromos pontjainak meghatározása 1. sor IEF marker, 2. sor ES24 3. sor ER24

hidrolitikus aktivitás). Mindazonáltal a cefoxitin jelenlétében bekövetkezett indukció nagymértékben megnövelte a hidrolitikus aktivitást: 290 és 140 $\mu\text{M/s/mg}$ teljes fehérje értékre.

7.5.1.5. Az ES24 és ER24 *E. cloacae* törzs azonosságának vizsgálata

Az ES24 és ER24 *E. cloacae* törzsekből izolált plazmid DNS-ek száma és mérete azonos volt, mindkét izolátum 6 plazmidot tartalmazott: 9.4, 3, 2.5, 2.3 2 ~0.8 kb méretűeket. Az ES24 és az ER24 *E. cloacae* izolátumok PFGE képük alapján is azonosak voltak.

7.5.1.6. A *ompD*, *ompF* és *acrB* gének relatív expressziójának meghatározása

32. táblázat Az *acrB*, *ompD* és *ompF* expresszió RT-PCR elemzése

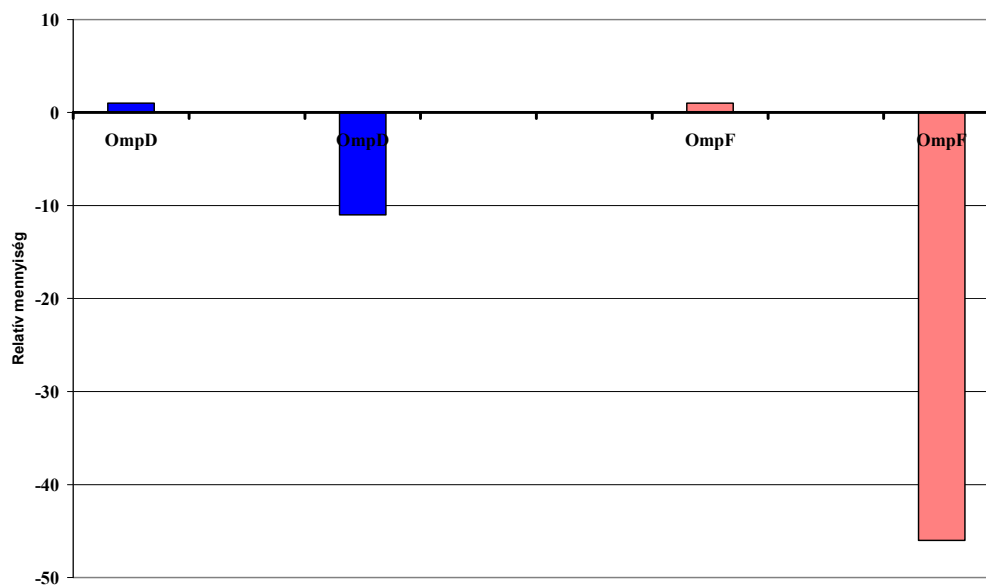
Gén	Törzs	Relatív expresszió
<i>ompF</i>	ES24	1
	ER24	0.018
<i>ompD</i>	ES24	1
	ER24	0.088
<i>acrB</i>	ES24	1
	ER24	1.2

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. Az expressziós szinteket minden izolátum esetén az *rpoB* (housekeeping gén) transzkripciós szintjéhez viszonyítva standardizáltuk. Valósídejű RT-PCR-rel vizsgálva az ER24 izolátumban az *ompF* és

ompD gének transzkripciós szintje 11-szer illetve 55-ször volt alacsonyabb az ES24 izolátumhoz képest (**32. táblázat, 20. ábra**). Az *acrB* efflux pumpa génjének transzkripciós 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 lett volna.

dc_112_10

20. ábra Az OmpD és OmpF fehérjék relatív transzkripció szintje



7.5.2. Ertapenem rezisztens *Klebsiella pneumoniae* és *Klebsiella oxytoca* törzs vizsgálata

Amióta az első VIM típusú metallo- β -laktamázt termelő *P. aeruginosa* törzset izolálták Veronában (146), ezt az enzimet világszerte gyakran kimutatják *P. aeruginosa* és *Acinetobacter* törzsekben. Az első VIM-termelő *K. pneumoniae* törzset 2002-ben azonosították Görögországban (97). Azóta a VIM-típusú MBL-ket már több *Enterobacteriaceae* fajban is identifikálták, elsősorban *K. pneumoniae* fajokban (97, 118, 251, 266, 302).

Az első VIM-4-termelő *P. aeruginosa*-t 2001-ben Görögországban detektálták (237). Magyarországon 2002-ben izoláltak először VIM-4 termelő *P. aeruginosa* törzset egy görög betegből (154). A 2005-ben végzett 85 kórház bevonásával készült multicentrikus hazai felmérés során hét kórházban izoláltak VIM-4 termelő *P. aeruginosa* törzset. VIM-4 termelő *Aeromonas hydrophilus*-t Magyarországon izoláltak a világon elsőként (155, 156).

Vizsgálataink során egy klinikai mintából izolált MBL-termelő *K. pneumoniae* és egy szintén klinikai mintából izolált MBL-termelő *K. oxytoca* törzset jellemeztünk.

7.5.2.1. Baktérium törzsek

Az MBL-termelő *K. pneumoniae* törzset (KP3686) egy krónikus obstruktív tüdőbetegségben szenvedő, intenzív osztályon kezelt beteg bronchoalveolaris mosófolyadékából izoláltuk, 2009. februárban. Az MBL-termelő *K. oxytoca* törzset (KO5294/9) egy csontvelő transzplantációs osztályon kezelt beteg székletének szűrővizsgálata során izolálták a Fővárosi Egyesített Szent István és Szent László Kórház mikrobiológiai laboratóriumában, 2009. júliusában.

7.5.2.2. A *Klebsiella* törzsek antibiotikum érzékenysége

A *K. pneumoniae* KP3686 és *K. oxytoca* KO5294/9 izolátumok E-teszttel meghatározott MIC értékeit a **33. táblázat** foglalja össze. Mindkét törzs a széles spektrumú cefalosporinokra és az ertapenemre rezisztens volt. A *K. pneumoniae* törzs a legtöbb nem β -laktám antibiotikumra, köztük az aminoglikozidokra, a ciprofloxacinra és a trimetoprim-sulfamethoxazolra is rezisztens volt, szemben a *K. oxytoca* törzsszel, mely érzékenynek bizonyult az említett antibiotikumokkal szemben.

7.5.2.3. *A Klebsiella törzsek által termelt β -laktamáz enzimek*

A KP3686 törzsben PCR vizsgálattal és szekvenálással 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 (**33. táblázat**) azonosítottunk. A KO5294/9 törzsben csak a class-1 integronon lévő *bla*_{VIM-4} gént találtuk. Mindkét integron két gén kazettát hordozott: az első pozícióban egy *aac*(6')-Ib (úgynevezett *aacA4*) gént és ezt követően egy *bla*_{VIM-4} gén kazettát. Az integronok szekvenálási eredménye kimutatta, hogy ugyanaz a VIM-4-tartalmú class-1 integron volt jelen mindkét izolátumban, továbbá hogy ez az integron megegyezett a dél-magyarországról származó *P. aeruginosa* törzsekben és az első MBL-termelő *Aeromonas hydrophila* törzsben korábban leírt integronnal. A nukleotid szekvenciák a GenBank adatbázisába feltöltésre kerültek és a KP3686 törzsnél a GU181265 azonosítószámon, a KO5294/9 törzsnél pedig a GU181269 azonosítószámon elérhető.

7.5.2.4. *A metallo- β -laktamáz termelő Klebsiella törzsek plazmidjainak jellemzése*

DNS hibridizációval kimutattuk, hogy a VIM-gén mindkét törzsben kb. 90 bp nagyságú plazmidon helyezkedik el. Bár a konjugációs kísérlet többszöri próbálkozás ellenére sem volt sikeres, a β -laktamáz gént hordozó plazmidokat sikerült transzformálni az *E. coli* DH5 α törzsbe. A transzformált baktériumok PCR vizsgálata és a kapott termékek szekvenálása megerősítette a *bla*_{CTX-M-15} ESBL és *bla*_{TEM-1} gének jelenlétét a pKP3686/2 plazmidon és a *bla*_{VIM-4} gént a pKP3686/1 és pKO5294/9 plazmidokon (**33. táblázat**). A fingerprint analízishez a transzformált baktériumokból kivont plazmid DNS-t *Pst*I és *Eco*RI enzimekkel emésztettük. A pKP3686/1 és pKO5294/9 plazmidok egyezését a restriktációs analízis is megerősítette.

7.5.2.5. *A Klebsiella törzsek klonális vizsgálata*

A KP 3686 törzsön elvégzett PFGE és MLST vizsgálatok eredményei bizonyítják, hogy a törzs a korábban leírt ST11 klónba tartozik, melyet CTX-M-15-termelő epidémiás klónként (EC III) országszerte detektáltak és újabban Franciaországban, Hollandiában, Spanyolországban és Koreában is megjelent (<http://www.pasteur.fr/mlst>). Ismereteink szerint ez az első eset, hogy a nemzetközileg sikeres ST11 *K. pneumoniae* klón egy MBL-kódoló integront importált.

33. táblázat A *K. pneumoniae* KP3686, *K. oxytoca* KO5294/9, *E. coli* DH 5 α és transzformált *E. coli* DH 5 α törzsek jellemzői

Törzsek	PCR és szekvenálás eredménye	MIC (μ g/ml)*															
		AMC	TZP	CAZ	CTX	FEP	ATM	ETP	IPM	MEM	CIP	AMK	TOB	GEN	SXT	TGC	CST
KP3686	TEM-1, SHV-11, CTX-M-15, VIM-4	>256	>256	32	64	8	16	1.5	0.5	0.25	>32	16	>256	>256	>32	0.75	0.5
KO5294/9	VIM-4	>256	>256	64	64	48	0.19	2	2	1	2	16	>256	2	0.5	2	1
<i>E. coli</i> DH5 α	-	4	4	0.016	0.032	0.016	0.032	0.008	0.25	0.094	0.19	0.012	0.12	0.064	0.016	0.12	0.5
<i>E. coli</i> DH5 α (pKP3686/1, ~90 kb)**	VIM-4	>256	>256	12	8	0.5	0.032	0.064	1.5	0.19	0.19	4	8	0.064	0.023	0.25	0.5
<i>E. coli</i> DH5 α (pKP3686/2, ~50 kb)**	CTX-M-15, TEM-1	>256	8	64	64	4	16	0.016	0.38	0.094	0.25	1	8	>256	0.006	0.25	0.5
<i>E. coli</i> DH5 α (pKO5294/9, ~90 kb)**	VIM-4	>256	>256	16	8	0.5	0.047	0.125	3	0.25	0.19	4	8	0.064	0.012	0.25	0.5

* AMC: amoxicillin/klavulánsav, TZP: piperacillin/tazobaktám, CAZ: ceftazidim, CTX: cefotaxim, FEP: cefepim, ATM: aztreonam, ETP: ertapenem, IPM: imipenem, MEM: meropenem, CIP: ciprofloxacin, AMK: amikacin, TOB: tobramycin, GEN: gentamicin, SXT: trimethoprim-sulfamethoxazol, TGC: tigecyclin, CST: colistin

** A transzformált baktériumokban lévő plazmidok rövidítése és mérete

7.5.3. Karbapenem rezisztens *Pseudomonas aeruginosa* és *Acinetobacter baumannii* törzsek vizsgálata

A *P. aeruginosa* és az *A. baumannii* igen fontos nosokomiális kórokozók az intenzív osztályokon, és a kezelési lehetőségek korlátozottak (93).

A *P. aeruginosa* jelentős intrinsic rezisztenciával rendelkezik (20), ezért az antipseudomonas β -laktámoknak, mint a ticarcillin, a piperacillin, a ceftazidim, a cefepim, az aztreonam és a karbapenemek jelentős terápiás értékük van. Három fő β -laktám rezisztencia mechanizmus van a *Pseudomonas spp.*-ben: β -laktamázok termelése, a külső membránfehérjék eltűnése és az efflux-pumpák expressziójának növekedése. A legtöbb *P. aeruginosa* törzs, amely rezisztens a harmadik generációs cefalosporinokra, kromoszómálisan kódolt C osztályú β -laktamázt, az AmpC enzimet termeli (20). A szerzett β -laktám rezisztencia terápiás kudarchoz vezethet, különösen, amikor egyéb például aminoglikozid és a fluorokinolon rezisztenciával társul. E szerzett enzimek között, a ritkábban előforduló PER bír klinikai jelentőséggel (197). A PER-1 termelő baktériumok okozta fertőzések kezelésének kudarcáról már beszámoltak (287). Az MBL enzimek számos típusát azonosították *P. aeruginosa*-ban, amelyek közül a VIM-típusú enzim prevalenciája tűnik a legnagyobbaknak (241).

A továbbiakban PER-termelő *P. aeruginosa*, *A. baumannii* izolátumok és VIM-termelő *P. aeruginosa* első magyarországi észleléséről számolunk be egy beteg kapcsán, aki Egyiptomban került kórházi felvételre majd Magyarországra szállították további kezelésre. Ez a munka a PER-típusú ESBL és a VIM-típusú MBL enzimeket tartalmazó baktériumok terjedését illusztrálja.

7.5.3.1. Esetleírás

2006. áprilisban egy 53 éves magyar turistát súlyos terrortámadás ért Egyiptomban. Azonnal kórházi kezelésben részesült égési- és mechanikai sérülései, illetve szepszis-szindrómája miatt Egyiptomban. Öt nappal később kómában, hypoxiás és hypotermiás állapotban szállították az ÁEK Égési Részlegére, Budapestre, Magyarországra. A felvétel napján baktériumtenyésztés történt az égési sebekből. A telepmorfológia és antibiotikum-érzékenységi

mintázat alapján három különböző *P. aeruginosa* törzset – egy ESBL-termelőt (PA1), egy imipenem-rezisztens (PA2) és egy MBL-termelőt (PA3) azonosítottunk, emellett ESBL-termelő *K. pneumoniae*-t (ESBL-KP), methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*-t (MRSA) és *Enterococcus faecalis*-t (EF) izoláltunk. Másnap a beteg kanüljéből ESBL-termelő *A. baumannii* (ESBL-AB) és PA2 tenyésztett ki. Kórházi tartózkodása alatt az orrából PA1, ESBL-AB, ESBL-KP, MRSA, a torkából PA1, ESBL-AB, ESBL-KP, a légcsövéből PA3, ESBL-AB, ESBL-KP, MRSA és a sebéből PA1, PA3, ESBL-AB, ESBL-KP, MRSA és EF került izolálásra. Hemokultúra vételére kilenc alkalommal került sor, amelyekből szintén PA1, ESBL-KP, MRSA és EF tenyésztett ki.

7.5.3.2. Antibiotikum érzékenység meghatározás

Három különböző antibiotikum-érzékenységi mintázatot figyeltünk meg a felvétel napján izolált *P. aeruginosa* törzseknél (**34. táblázat**). Mindhárom izolátum rezisztens volt cefalosporinokra. A PA1 törzs érzékeny volt karbapenemekre, a PA2 kizárólag meropenemre volt érzékeny (**34. táblázat**). Mind a PA1, mind a PA2 rezisztens volt az összes többi vizsgált antibiotikumra. A harmadik *P. aeruginosa* (PA3) törzs érzékenynek mutatkozott aztreonamra, netilmicinre és rezisztensnek az összes cefalosporinra valamint karbapenemekre. EDTA jelenlétében azonban az imipenem MIC-értéke >256 µg/ml-ről 12 µg/ml-re csökkent, ami MBL enzim jelenlétére utalt. Az *A. baumannii* izolátum rezisztens volt az összes cefalosporinra és aztreonamra, de a ceftazidim és a cefotaxim MIC-értéke csökkent klavulánsav jelenlétében, ami ESBL jelenlétére utalt. A *K. pneumoniae* törzsnek a MIC-értékek alapján szintén érzékeny volt karbapenemekre, amikacinra és ciprofloxacinra is (**34. táblázat**).

34. táblázat A *P. aeruginosa*, *A. baumannii* és *K. pneumoniae* törzsek antibiotikum érzékenysége

Antibiotikum	MIC érték (µg/ml)				
	<i>P. aeruginosa</i> (PA1)	<i>P. aeruginosa</i> (PA2)	<i>P. aeruginosa</i> (PA3)	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Ceftazidim	>256	>256	>256	>256	>256
Ceftazidim/klavulánsav	>4	>4	>4	<0.64	3
Cefotaxim	>32	>32	>32	>32	>32
Cefotaxim/klavulánsav	>1	>1	>1	0.23	0.38
Ceftriaxon	>256	>256	>256	>256	>256
Piperacillin/tazobaktám	>256	>256	>256	>256	>256
Cefepim	>32	>32	>32	>32	>32
Aztreonam	>64	32	8	>64	>64
Imipenem	2	32	>256	1	1.5
Imipenem+EDTA	1.5	32	12	1.5	<1
Meropenem	0.25	1	>32	0.38	0.25
Amikacin	>256	6	>256	48	1.5
Gentamicin	16	>256	>256	32	>256
Netilmicin	>32	>32	2	1	>32
Tobramycin	>256	>256	32	32	24
Ciprofloxacin	>32	>32	>32	>32	1

7.5.3.3. PCR vizsgálatok és szekvenálás

A PCR vizsgálatok valamint a szekvenálás eredményeit a **35. táblázat**-ban foglaltuk össze. TEM-1 géneket az *A. baumannii* és *K. pneumoniae* törzsekben sikerült azonosítanunk. OXA géneket a PA1 és PA3 törzsekben ismertünk fel. PER-1 géneket a PA1 és *A. baumannii* izolátumokban, míg SHV-5-öt a *K. pneumoniae* izolátumban találtunk. Egyedül a PA3 izolátum hordozta a VIM-2 gént a szekvenálási eredmény szerint. Az OXA-10 és a VIM-2 gének egyazon class-1 típusú integronokon helyezkedtek el.

35. táblázat Az izolált Gram-negatív baktérium törzsek jellemzői

	TEM PCR	SHV PCR	PER PCR	OXA PCR	VIM PCR	PFGE	pI
<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

7.5.3.4. Izoelektomos fókuszálás

Az IEF teszt eredményei alapján az összes izolátum tartalmazott β -laktamázokat. Az izoelektromos fókuszálás alátámasztotta a PER-1 (pI 5.3), a TEM-1 (pI 5.4), az OXA-1 (pI 7.4), az OXA-10 (pI 6.1), az SHV-5 (pI 8.2), a VIM-2 (pI 5.3) és a kromoszómális AmpC cefalosporináz (pI 8 vagy > 8.5) enzim jelenlétét a különböző törzsekben (**35. táblázat**).

7.5.3.5. PFGE vizsgálat

A három *P. aeruginosa* izolátum (PA1, PA2 és PA3) eltérő PFGE mintázatot mutatott, ami arra utalt, hogy a *P. aeruginosa* törzsek különböző klónokhoz tartoztak (**35. táblázat**). Hat másik ebben a magyar kórházban azonos időben előforduló *P. aeruginosa* törzzsel összehasonlítva nem találtunk hasonlóságot, ami a PA1, PA2 és PA3 külső eredetére utal.

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

7.6.1. A ciszplatin hatása az egér farmakokinetikai paramétereire

Állatkísérleteket széles körben alkalmaznak a humán antibiotikum-kezelés kimenetelének értékelésére. Mindazonáltal a kísérleti állatokkal kapcsolatos eredményeknek az emberben tapasztalható hatékonyságra való kiterjesztésének fő korlátját az ember és a laboratóriumi állatok közötti farmakokinetikai különbségek jelentik, pl. a kisállatok, mint az egér és a patkány gyorsabban üríti a gyógyszereket (55, 109). A humán farmakokinetika szimulálható a gyógyszer gyakori alkalmazásával (86, 109), számítógép által vezérelt pumpákkal (29, 92), illetve a vese által kiválasztott gyógyszerek esetén veseelégtelenség szándékos kiváltásával (55, 56).

Veseelégtelenség létrehozása céljából különféle sebészi és kémiai eljárásokat alkalmaztak patkányokban (95) és egerekben (55, 56). Azonban a nefrotoxikus alkalmazása jóval egyszerűbb módszer (168), pl. az intraperitoneálisan adott egyszeri uranil-nitrát veseelégtelenséget vált ki (56, 180).

A citosztatikum ciszplatin is nefrotoxikus hatást mutatott toxikológiai állatkísérletekben és I. fázisú humán klinikai vizsgálatokban; a proximális tubulus pars recta szakaszának akut nephrosist okozva (168). Ciszplatin alkalmazását követően morfológiai elváltozásokat figyeltek meg a vesében (81, 85) és az általa okozott renális működészavart igen hasonlóan találták az uranil-nitrát által kiváltotthoz (168).

Mivel a legtöbb cefalosporint elsősorban a vese választja ki, így a veseműködés megváltozása a szérumszinteket befolyásolni tudja. A cefalosporinok közül a választásunk a cefepimre esett, mert a cefepim vese clearance értéke megközelíti a kreatinin clearance-ét; a vese működészavara nem befolyásolja a cefepim nem vesén keresztül történő ürítését és az eloszlási térfogatot (202).

Vizsgálatunk célja annak a ciszplatin dózisnak a meghatározása volt, amellyel lelassítva a vese általi kiválasztását, de biztosítva az állatok túlélését, az emberhez hasonló cefepim szérum koncentrációkat érhetünk el.

7.6.1.1. A kísérlet menete

Csoportonként tizenöt véletlenszerűen kiválasztott egeret használtunk a plazma kreatinin, urea nitrogén és fehérvérsejt szám meghatározásához különböző ciszplatín dózisoknál, illetve a farmakokinetikai vizsgálatokhoz.

A ciszplatint 10, 14, 18, 22 és 26 mg/kg dózisokban alkalmaztuk. A farmakokinetikai vizsgálatnál egyszeri 80 mg/kg dózisú cefepimet adtunk. A kontroll csoport sóoldatot kapott. Mind a sóoldatot, mind a ciszplatint három nappal a cefepim és a cefepimre vonatkozó farmakokinetikai paraméterek meghatározása előtt adtuk. A sóoldatot, a ciszplatint és a cefepimet i.p. injekcióval adagoltuk. A túlélés vizsgálatakor minden csoport 10 véletlenszerűen kiválasztott egérből állt. A csoportokat ciszplatín vagy sóoldat adása után nyolc napig utánkövettük.

7.6.1.2. Laboratóriumi paraméterek

Az egerek plazma kreatinin, urea nitrogén és fehérvérsejt száma különböző ciszplatín dózisoknál a **36. táblázat**-ban látható. Jól megfigyelhető, hogy még a plazma kreatinin és urea nitrogén szintek 10 mg/kg-os és 14 mg/kg-os ciszplatín dózisonál nem mutatnak szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest, addig 18 mg/kg-os dózisonál megemelkedik az értékük a veseérintettségre utalva és a ciszplatín dózis emelésével együtt szignifikánsan emelkedik az értékük. A fehérvérsejt szám nem változott szignifikánsan a különböző ciszplatín dózisoknál.

36. táblázat Az egerek plazma kreatinin, urea nitrogén és fehérvérsejt száma különböző ciszplatín dózisoknál

Laboratóriumi paraméterek	Kontroll	Ciszplatín dózis				
		10 mg/kg	14 mg/kg	18 mg/kg	22 mg/kg	26 mg/kg
Plazma kreatinin (μmol/l)	43.33 ± 3.21	44.63 ± 2.39	48.16 ± 2.20	114.94 ± 45.61	168.15 ± 129.91	281.65 ± 124.27
Urea nitrogén (mmol/l)	3.73 ± 0.42	8.51 ± 3.31	8.85 ± 1.97	17.51 ± 12.06	29.06 ± 13.07	44.80 ± 12.59
Fehérvérsejt (×1.000/μl)	5.84 ± 1.80	2.76 ± 1.21	3.55 ± 1.55	4.86 ± 1.36	3.50 ± 1.00	8.23 ± 5.57

7.6.1.3. A túlélés elemzése

A 26 mg/kg ciszplatinnal előkezelt csoportban az állatok öt nap után elhullottak (2 nappal a cefepim beadását követően), azonban a többi csoportban elhullást csak később figyeltünk meg. Az összes kontroll csoport és a 10 illetve a 14

mg/kg cisplatint kapott csoportok nyolc napig túléltek, míg a 18, 22, illetve a 26 mg/kg cisplatint kapott csoportokat illetően a túlélési arány 8/10, 7/10 illetve 3/10 volt. A 26 mg/kg cisplatint kapott csoport túlélése jelentősen különbözött a kontroll csoporttól és azoktól, amelyek 18 illetve 22 mg/kg cisplatint kaptak ($P=0.001$, 0.034 és 0.04). A 10, 14, 18 és 22 mg/kg cisplatint kapott csoportok túlélése nem különbözött jelentősen a kontroll csoporttól.

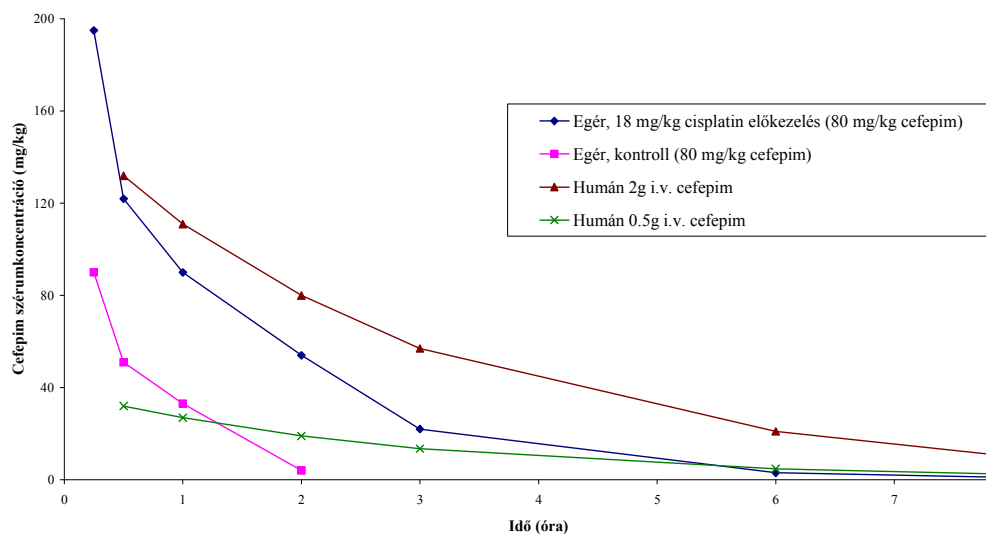
7.6.1.4. Farmakokinetikai eredmények

A cefepim farmakokinetikai paramétereit a kontroll és a cisplatinnal kezelt csoportokban a **37. táblázat**-ban részletezzük. Jelentős különbség volt a kiürülési féleletidők között az összes csoportot tekintve ($P<0.001$). Szignifikáns különbséget találtunk a kontroll és a 10 mg/kg cisplatint kapott csoport ($P=0.001$), a 14 illetve a 18 mg/kg dózisú cisplatint kapott csoport ($P=0.001$) és a 22 illetve 26 mg/kg cisplatint kapott csoport között ($P<0.001$). A féleletidők nem különböztek jelentősen az alábbi csoportok között: 10 és 14 mg/kg, 18 és 22 mg/kg, 18 és 26 mg/kg dózisú cisplatin ($P=0.84$, 0.42 és 0.04). A cisplatin kezelés nélküli illetve a cisplatin kezelést követően egér cefepim szérumszinteket a **21. ábrán** mutatjuk be, ismert humán adatokkal összehasonlítva.

37. táblázat 80 mg/kg i.p. cefepim dózis farmakokinetikai paramétereit (középérték $\pm$ standard eltérés) egerekben különböző dózisú cisplatin előkezelés után

Farmakokinetikai paraméterek	Cisplatin dózis					
	0 mg/kg	10 mg/kg	14 mg/kg	18 mg/kg	22 mg/kg	26 mg/kg
$t_{1/2}$ (h)	0.38 ± 0.03	0.51 ± 0.04	0.53 ± 0.02	1.01 ± 0.07	0.96 ± 0.03	1.23 ± 0.34
AUC (mg x h/ml)	75.7 ± 10.3	78.6 ± 9.6	118.7 ± 17.9	261.0 ± 12.7	207.9 ± 10.5	340.1 ± 54.6
CL (ml/min/kg)	16.7 ± 1.9	17.2 ± 2.0	10.4 ± 1.6	4.7 ± 0.3	6.1 ± 0.5	3.4 ± 1.4
C_{max} (mg/ml)	90.0 ± 13	72.7 ± 12.3	103.3 ± 23.1	195.0 ± 45.0	130.0 ± 20.0	196.7 ± 32.9
MRT (h)	0.58 ± 0.05	0.72 ± 0.06	0.73 ± 0.05	1.35 ± 0.11	1.38 ± 0.04	2.11 ± 1.55

21. ábra Cefepim szérumszintjeinek középértékei egerekben ciszplatinnal és anélkül és a humán adatok



7.6.2. Imipenem, cefepim és amikacin hatékonyságának vizsgálata SHV-5 típusú ESBL-termelő *Klebsiella pneumoniae* törzsben

Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó törzsek körében az ESBL termelés az egyik fő mechanizmusa a β -laktám antibiotikumokra kialakuló rezisztenciának. A keresztrezisztencia miatt az ESBL-termelő törzsek által okozott fertőzések esetén a terápiás lehetőségek korlátozottak. A β -laktámokból és β -laktamázgátlókból álló kombinációk ESBL-termelő baktériumok által okozott fertőzések elleni aktivitásának vizsgálatáról ellentmondó eredmények születtek (35, 178, 248, 274). Szintén nem egyértelműek a széles spektrumú és a negyedik generációs cefalosporinok aktivitásával kapcsolatos beszámolók sem, amit az inokulum-hatással magyaráztak (35, 125, 274).

Célunk volt, hogy összehasonlítsuk az amikacin, a cefepim, az amikacin-cefepim és az imipenem hatását SHV-5 ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsszel fertőzött szeptikus egerekben, magas kezdeti csíraszám alkalmazásával.

7.6.2.1. Kísérlet leírása

A CD-1-es egereknek 18 mg/ttkg ciszplatint i.p. injekcióval adtunk be a fertőzés előtt 3 nappal, a veseműködés leállítása céljából. Három csoport nem fertőzött egeret használtunk a farmakokinetikai vizsgálatokhoz, melynek során egyszeri

dózis amikacint (7.5 mg/kg), cefepimet (80 mg/kg) és imipenemet (40 mg/kg) adtunk i.p. az egereknek.

Az egereket 10^7 CFU/g SHV-5 termelő *K. pneumoniae* törzsszel fertőztük i.p. A csíraszám meghatározáshoz és túlélés analízishez négy fertőzött és kezelt (amikacinnal, cefepimmal, cefepim+amikacinnal és imipnemm) illetve két kontroll csoportot - nem fertőzött és kezelt illetve fertőzött és nem kezelt – használtunk.

7.6.2.2. Az állatkísérletben alkalmazott *K. pneumoniae* törzs antibiotikum érzékenységi vizsgálatának eredményei

Az amikacinra vonatkozó MIC- és MBC-érték 0.5 µg/ml volt mind 10^5 , mind 10^7 CFU/ml-nél. A cefepim MIC- és MBC-értéke 1 µg/ml volt 10^5 CFU/ml-nél, míg a MIC >256 µg/ml volt 10^7 CFU/ml-nél. Az alkalmazott izolátum MIC és MBC értéke imipenemre 0.125 µg/ml volt 10^5 CFU/ml csíraszám alkalmazásakor, és 0.5 és 1 µg/ml volt 10^7 CFU/ml esetén.

7.6.2.3. Farmakokinetikai eredmények

A farmakokinetikai elemzésből származó adatokat a **38.a és 38.b táblázat**-ban adjuk meg, az amikacin-cefepim kombináció kivételével, mivel ezek az irodalmi adatok alapján nem befolyásolják egymás eliminációját (6).

38.a táblázat Antibiotikumok farmakokinetikai paraméterei i.p. injekciót követően csökkent vesefunkciójú nem fertőzött egereknél

Antibiotikum	T _{1/2} (h)		C _{max} (mg/ml)		T _{max} (min)	AUC (mg × h/ml)	
	Átlag	±SD	Átlag	±SD		Átlag	±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

SD, standard deviáció

38.b táblázat Antibiotikumok farmakokinetikai paramétereit i.p. injekciót követően csökkent vesefunkciójú nem fertőzött egereknél

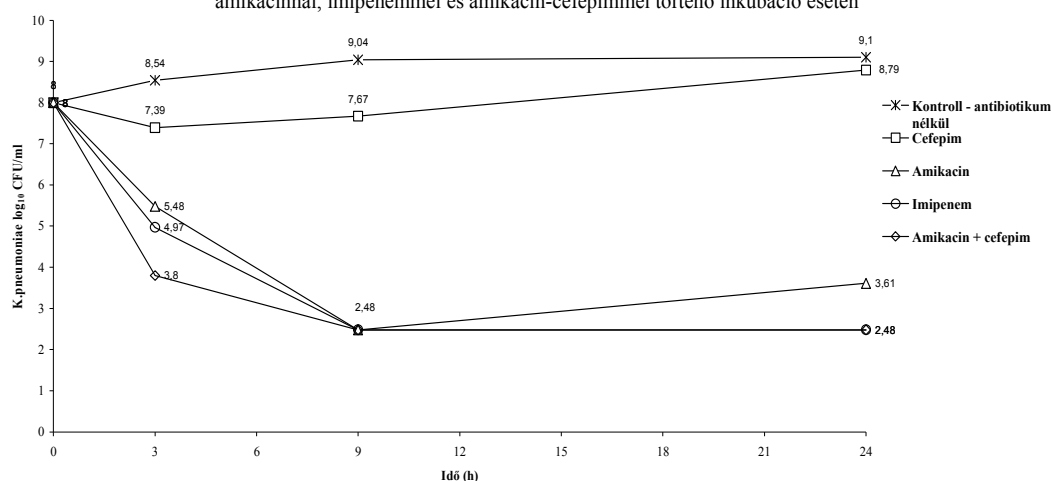
Antibiotikum	T>MIC ¹ (h / %)		T>MIC ² (h / %)		AUC _{0-24h} / MIC ^{1,2} (h)		C _{max} / MIC ^{1,2}	
	Átlag	±SD	Átlag	±SD	Átlag	±SD	Átlag	±SD
Amikacin (7.5 mg/kg)	4.81 / 46.00	0.95 / 9.05	4.81 / 46.00	0.95 / 9.05	161.54	22.40	40.36	8.60
Cefepim (80 mg/kg)	7.40 / 105.72	0.36 / 5.20	– ³	– ³	NS	NS	NS	NS
Imipenem (40 mg/kg)	4.31 / 82.09	0.24 / 4.65	3.37 / 64.19	0.18 / 3.51	NS	NS	NS	NS

SD, standard deviáció; T>MIC, MIC feletti terület; 1: MIC 10⁵ CFU/ml-nál; 2: MIC 10⁷ CFU/ml-nál; 3: C_{max} nem éri el a MIC-et; NS: nem számolt.

7.6.2.4. Ölési görbe

Az in vitro ölési görbe az ún. time-kill curve a **22. ábrán** látható magas 10⁸ CFU/ml kezdeti csíraszám alkalmazásával. A cefepim önmagában nem csökkentette szignifikánsan a csíraszámot és 24 óra elteltével az antibiotikum nélküli kontroll-lal megegyező volt a csíraszám. Az amikacin, imipenem és amikacin+cefepim hatására már 3 óra múlva jelentősen csökkent a csíraszám majd 9 óra elteltével a detektálási határra csökkent le. Nem tudtunk szinergizmust detektálni – sem megerősíteni, sem kizárni - az amikacin+cefepim csoportban a baktérium-koncentráció meghatározásának korlátai miatt. Érdekes módon hiába csökkentette az amikacin már 9 óra múlva a detektálási határra a csíraszámot, a 24 órás értékeknél kis emelkedést tapasztaltunk. Ellenőrizve a visszanozott baktérium telepeket nem találtunk köztük amikacin rezisztens telepeket.

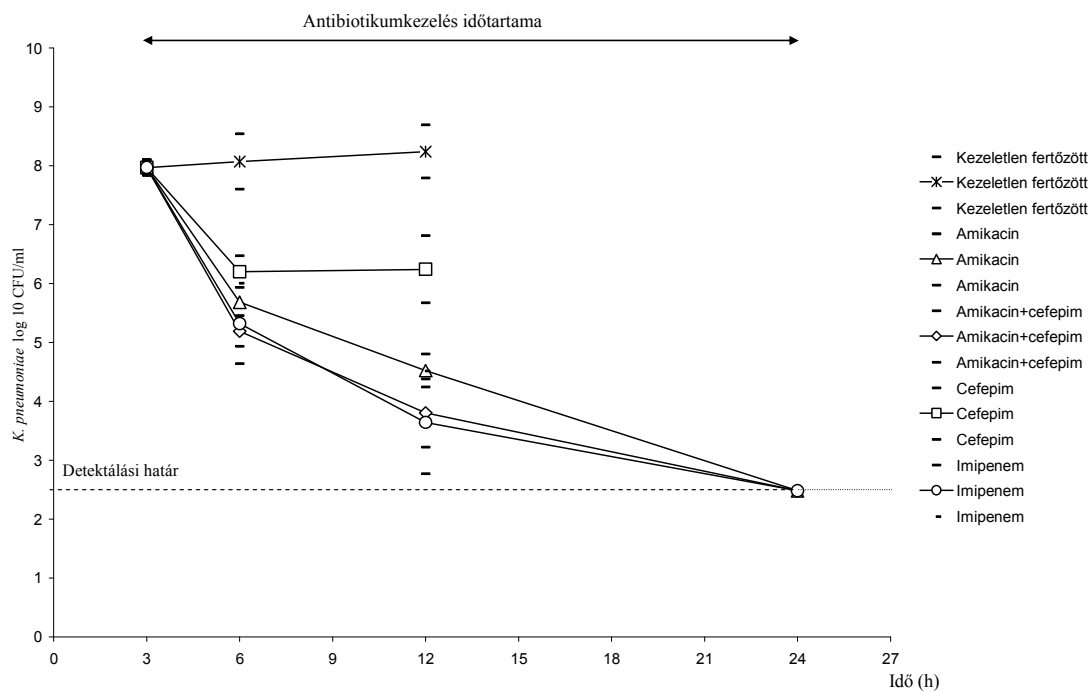
22. ábra ESBL-termelő *K. pneumoniae* in vitro ölési görbei antibiotikum nélküli, cefepimmal, amikacinnal, imipenemmel és amikacin-cefepimmal történő inkubáció esetén



7.6.2.5. Az egerek vérében a baktérium koncentráció meghatározása

10^7 CFU/g csíraszám SHV-5 termelő *K. pneumoniae* törzzsel i.p. oltott egerekben a vér baktérium-koncentrációja folyamatosan nőtt az antibiotikumot nem kapott csoportban. A cefepimmal kezelt csoportban kezdetben csökkent a

23. ábra Baktérium-koncentrációk középértéke kezeletlen illetve amikacinnal, amikacin-cefepimmal, cefepimmal és imipenemmel történő kezelés esetén ESBL-termelő *K. pneumoniae*-vel történő fertőzés után. A hibavonalak a standard deviációt jelzik.



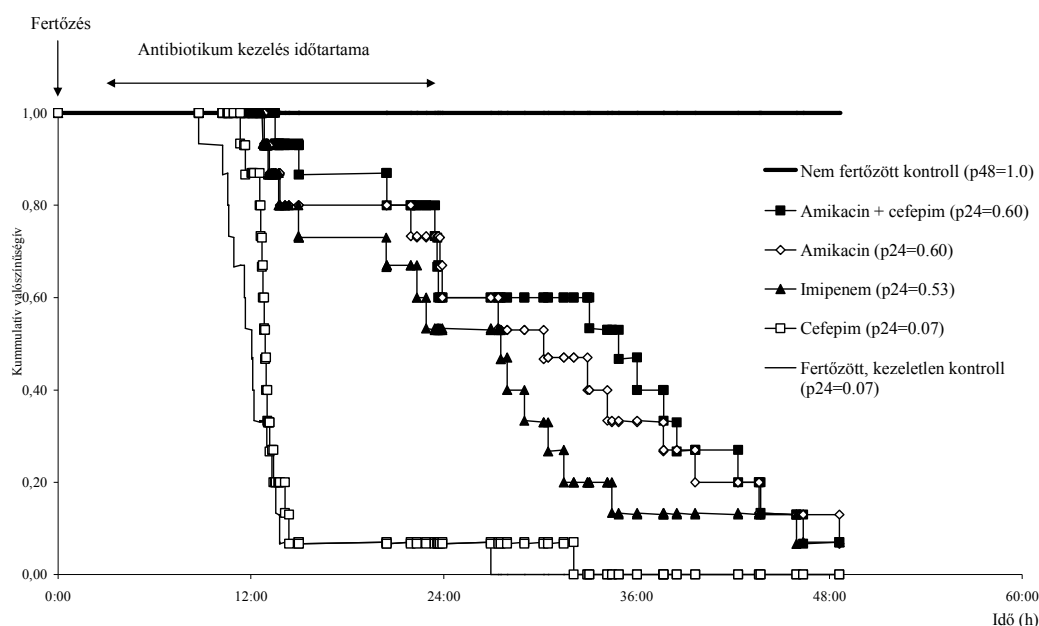
baktérium koncentráció a vérben, azonban 6 óra elteltével emelkedés következett be, ezzel szemben a többi antibiotikummal kezelt csoportban

folyamatosan csökkent a csíraszám (23. ábra). Az összes csoportot összehasonlítva a különbség szignifikáns ($P < 0.0001$) volt. A fertőzött kezeletlen csoport illetve az összes kezelt csoport között is szignifikáns volt a különbség ($P < 0.01$ minden összehasonlított párosnál). A cefepimmal kezelt csoport statisztikailag különbözött a többi kezelt csoporttól ($P < 0.05$ minden összehasonlított párosnál). Nem volt különbség az amikacint, az amikacin-cefepimet és az imipenemet kapott csoportok között ($P > 0.37$ minden összehasonlított párosnál).

7.6.2.6. Túlélési analízis

A nem fertőzött csoportban nem volt elhullás. 24 óra után 15 egerből négy elhalt a fertőzött kezeletlen csoportban, 6 a 15-ből az amikacinnal illetve amikacin-cefepimmal kezelt csoportokban, és 7 a 15-ből az imipenemmel kezelt csoportban (24. ábra).

24. ábra ESBL-termelő *K. pneumoniae*-vel fertőzött, amikacinnal, cefepimmal, cefepim-amikacinnal és imipenemmel kezelt egerek túlélési görbéje.



A hazard hányadosok (95 %-os konfidencia intervallum) a következők voltak: fertőzött kezeletlen csoport versus nem fertőzött csoport: 26.47 (7.21-70.42), $P < 0.001$; cefepim versus fertőzött kezeletlen csoport: 0.65 (0.29-1.37), $P > 0.2$; amikacin versus fertőzött kezeletlen csoport: 0.17 (0.03-0.26), $P < 0.001$;

dc_112_10

amikacin-cefepim versus fertőzött kezeletlen csoport: 0.16 (0.03-0.24), $P < 0.001$; imipenem versus fertőzött kezeletlen csoport, 0.19 (0.04-0.33), $P < 0.001$; amikacin versus cefepim: 0.18 (0.04-0.34), $P < 0.001$; amikacin-cefepim versus cefepim: 0.16 (0.03-0.24), $P > 0.2$; amikacin-cefepim versus imipenem: 0.71 (0.24-2.11), $P > 0.2$; amikacin versus imipenem: 0.77 (0.26-2.30), $P > 0.2$. p_{24} a fertőzés utáni 24 órás túlélés valószínűsége.

7.6.3. Ciprofloxacin és levofloxacin hatékonyságának vizsgálata SHV-5 típusú ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsben

Az ESBL-termelő törzsek által okozott fertőzések esetén az elsőként választandó antimikrobás szerek a karbapenemek (121, 179, 247, 248). Azonban sajnos a klinikai mintákból izolált imipenem-rezisztens ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek megjelenése miatt szükséges alternatív terápiás hatóanyagokat keresni. A vizsgálat célja az volt, hogy meghatározza és összehasonlítsa a ciprofloxacin és a levofloxacin aktivitását egy SHV-5 ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzs ellen *in vitro* és *in vivo*.

7.6.3.1. Kísérlet leírása

Két csoport nem fertőzött egeret használtunk a farmakokinetikai vizsgálatokhoz, melynek során egyszeri dózis ciprofloxacint és levofloxacint adtunk i.p. az egereknek.

Az egereket 10^7 CFU/g SHV-5 termelő *K. pneumoniae* törzsszel fertőztük i.p. A csíraszám meghatározáshoz és túlélés analízishez két fertőzött és kezelt (ciprofloxacinnal vagy levofloxacinnal) illetve két kontroll csoportot - nem fertőzött és kezelt illetve fertőzött és nem kezelt csoportot – hoztunk létre.

7.6.3.2. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredménye

Az SHV-5 ESBL-termelő *K. pneumoniae* érzékeny volt ciprofloxacinra és

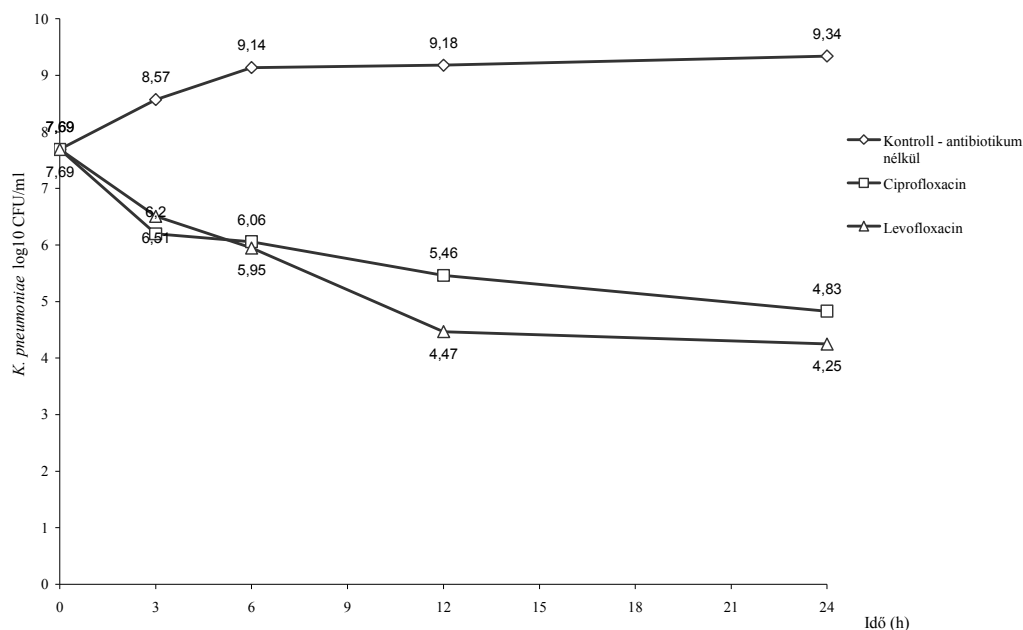
39. táblázat Az ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> törzs ciprofloxacin és a levofloxacin MIC- és MBC-értékei (µg/ml)					levofloxacinra mindkét csíraszám esetén, és a két kinolonnak közel azonos MIC- és MBC-értékei voltak.
Antibiotikum	10 ⁵ CFU/ml		10 ⁷ CFU/ml		
	MIC	MBC	MIC	MBC	
Ciprofloxacin	0.063	0.063	0.125	0.125	
Levofloxacin	0.063	0.063	0.25	0.25	

A MIC és MBC értékek a 39. táblázat-ban láthatók.

7.6.3.3. Ölési görbe

Az ölési görbék eredményét a **25. ábrán** mutatjuk be. A kezdeti 7.69 log₁₀ CFU/ml 6.20, 6.06, 5.46, 4.83 log₁₀ CFU/ml-re csökkent ciprofloxacin jelenlétében és 6.51, 5.95, 4.47, 4.25 log₁₀ CFU/ml-re levofloxacin jelenlétében 3, 6, 12 és 24 óra inkubáció után.

25. ábra: Antibiotikum nélkül, ciprofloxacinnal és levofloxacinnal inkubált ESBL-termelő *K. pneumoniae* in vitro ölési görbéi



7.6.3.4. Farmakokinetikai adatok

A farmakokinetikai elemzés a **40. táblázat**-ban látható adatai szerint az AUC₀₋₂₄/MIC és C_{max}/MIC hányadosok középértéke standard csíraszámmal számolva

40. táblázat A ciprofloxacin és levofloxacin farmakokinetikai paraméterei i.p. injekciót követően egerekben

Antibiotikum	Dózis (mg/kg)	Felezési idő (h)		C _{max} (mg/ml)		AUC (mg x h/ml)	
		Átlag	Szórás	Átlag	Szórás	Átlag	Szórás
Ciprofloxacin	20	0.69	0.52-0.93	8.52	6.27-11.04	9.25	5.59-11.43
Levofloxacin	50	0.48	0.45-0.55	12.42	10.4-15.16	17.29	15.87-23.94

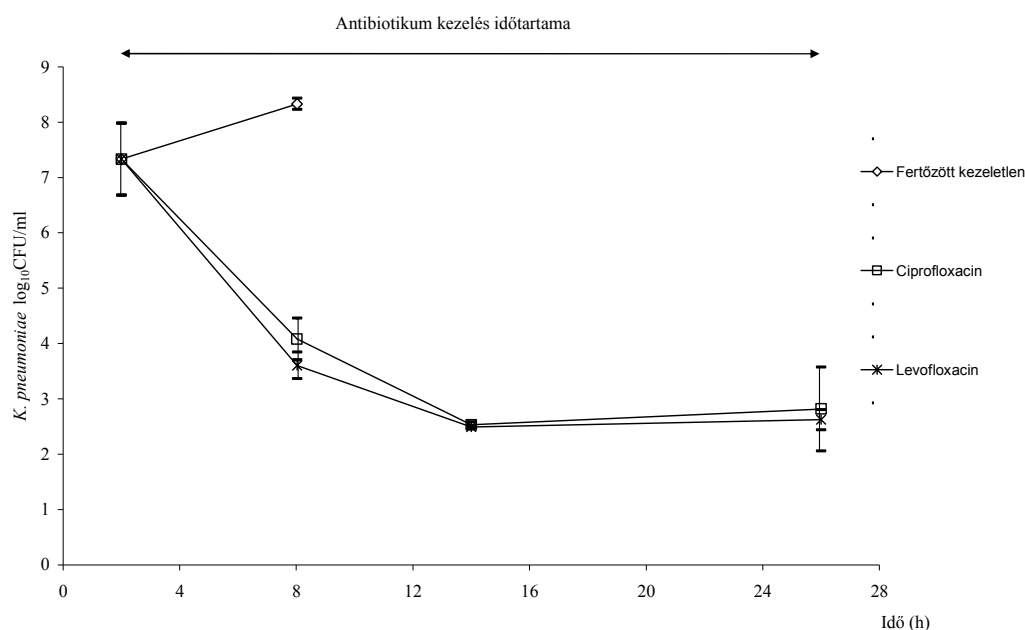
SD: standard deviáció

587.3 és 135.24 volt ciprofloxacinra, illetve 1097.77 és 197.14 levofloxacinra vonatkoztatva.

7.6.3.5. Az egerek vérében a baktérium koncentráció meghatározása

A kezeletlen csoportban folyamatosan emelkedett a vér baktériumkoncentrációja, míg a kezelt csoportokban folyamatosan csökkent. A kezelés kezdete után 6 órával szignifikánsnak találtuk a $\log_{10}$ CFU értékek közötti különbséget (ANOVA eredmény $p < 0,001$). A páros összehasonlítások jelentős különbségeket jeleztek a kezelt csoport és a kontroll között ($p < 0,001$ mindkét kezelésre), de a két kezelt csoport között nem ($p = 0,210$). A kezelés kezdete után 12 és 24 órával csak a kezelt csoportok voltak összehasonlíthatóak, amelyek között nem találtunk szignifikáns különbségeket ($p = 0,356$ 12 óra után és $p = 0,598$ 24 óra után). A $\log_{10}$ CFU középértékeket a **26. ábrán** mutatjuk be:

26. ábra ESBL-termelő *K. pneumoniae*-vel történő fertőzést követő baktérium koncentrációk kezeletlen és ciprofloxacinnal illetve levofloxacinnal kezelt egerekben

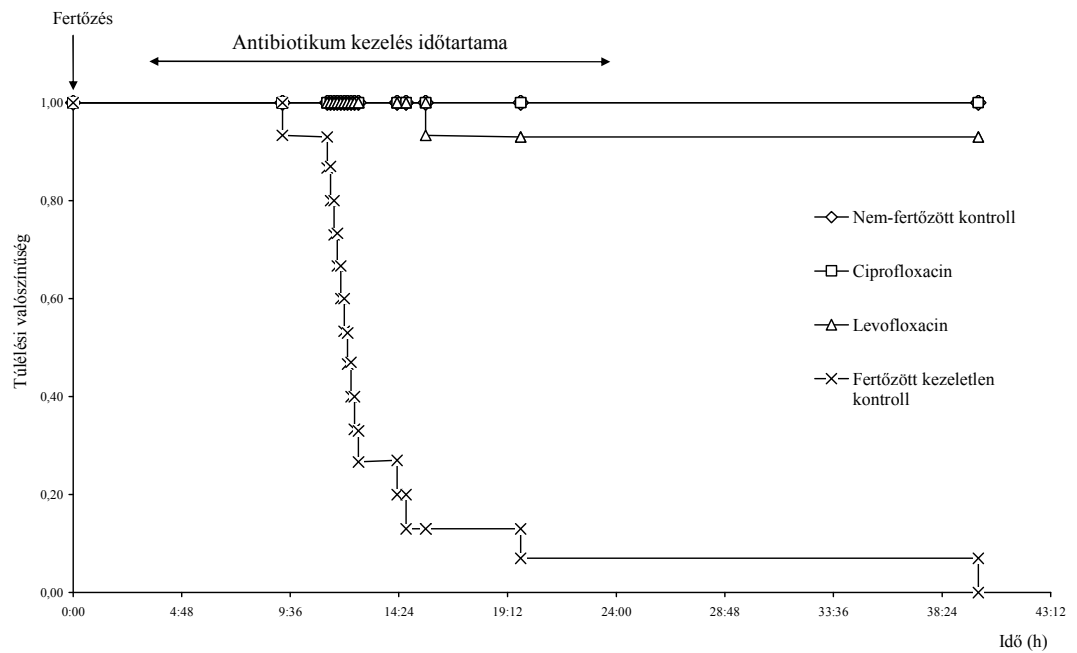


7.6.3.6. Túlélési analízis

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 ciprofloxacin és a levofloxacin jelentősen meghosszabbította az egerek túlélését a fertőzött kezeletlen csoporttal összehasonlítva (27. ábra)

27. ábra ESBL-termelő *K. pneumoniae*-vel fertőzött, ciprofloxacinnal illetve levofloxacinnal kezelt egerek túlélési görbéje



7.6.4. A3-APO peptid hatékonyságának vizsgálata szisztémás *Escherichia coli* fertőzésekben különböző egérmodellekben

A klinikai mintákból egyre gyakrabban izolált multirezisztens baktériumtörzsek főképp *Enterobacteriaceae* törzsek által okozott fertőzések terápiás lehetőségei egyre szűkebbek. Az antimikrobiális peptideket (AMP-k) már hosszú ideje a kismolekulájú antibiotikumok lehetséges alternatívájaként tartják számon (312). Vizsgálatunkhoz az AMP-k közül az A3-APO peptidet választottuk, mivel igen jól penetrál sejtbe, szelektíven kötődik a bakteriális DnaK C-terminális hélixéhez és nem vált ki antitest termelést. Szisztémás alkalmazásukat korlátozzák azonban a nem megfelelő biztonsági határok és a vesén keresztül történő gyors kiürülés. Vizsgálataink során meghatároztuk a toxikus dózisokat a peptid i.p. bevitele esetén és tanulmányoztuk az A3-APO alkalmasságát szisztémás fertőzések kezelésére i.p. alkalmazás esetén.

7.6.4.1. Kísérletek leírása

Az akut toxicitási vizsgálatok során egyszeri adag A3-APO-t adtuk be 10, 25 és 50 mg/kg dózisban i.p. az egereknek. Az ismételt toxicitási vizsgálatához 10, 25 és 50 mg/kg dózist alkalmaztunk 8 óránként 24 órán át.

Az A3-APO hatékonyságának vizsgálatakor az egereket i.p. 10^8 CFU/g *E. coli* 5770 törzsszel fertőztük, majd 4, 8 illetve 12 órával a fertőzés után i.p. 2.5mg/kg, 5 mg/kg és 10 mg/kg A3-APO-val kezeltük az egereket. Az A3-APO hatékonyságának vizsgálatát elvégeztük cisplatinnal előkezelt állatokon is.

7.6.4.2. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredménye

E. coli 5770 törzs érzékenysége a következő volt: imipenem MIC értéke 2 µg/ml, A3-APO MIC értéke 8 µg/ml, ciprofloxacín MIC értéke 128 µg/ml és az ampicillin MIC értéke 128 µg/ml volt.

7.6.4.3. Toxicitási vizsgálat

Az A3-APO szisztémás toxicitása i.p. beadás esetén két lépésben került kiértékelésre. Az egyszeri akut letális dózis 50 mg/kg volt a CFW-1 egerekben. 25 mg/kg-os dózis esetében az egerek túléltek, de súlyos átmeneti mellékhatásokkal. Az ismételt kísérletben az A3-APO peptidet háromszor adtuk 24 óra alatt, ilyen körülmények között az egerek túléltek, de 3x40 mg/kg esetén

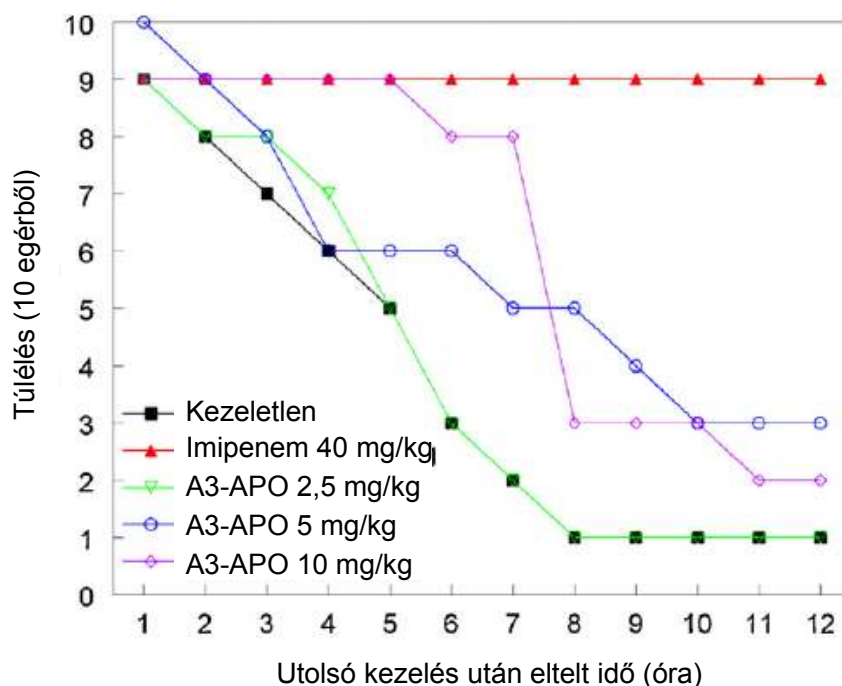
belső vérzést észleltünk. A Nem Kimutatható Káros Hatás Határértéke (NKKHH) az egerekben 3x20 mg/kg volt. Ebből következően a további szisztémás fertőzés modellekben a peptidet háromszor adtuk 2.5, 5, 10 vagy 20 mg/kg dózisokban

7.6.4.4. A3-APO hatékonyságának vizsgálata bacteraemia modellel

Az egereket az ESBL-termelő *E. coli* 5770 törzs LD₅₀: 2×10^8 CFU/g dóziséval fertőztük i.p. A csíraszám meghatározáshoz és túlélés analízishez négy fertőzött és kezelt (2.5 mg/kg, 5 mg/kg vagy 10 mg/kg A3-APO-val kezelt, illetve 3x40 mg/kg imipenemmel kezelt) illetve két kontroll csoportot - nem fertőzött és kezelt illetve fertőzött és nem kezelt csoportokat – hoztunk létre.

7.6.4.5. Túlélési analízis

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 (3x40 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 mg/kg, 5 mg/kg illetve a 10 mg/kg

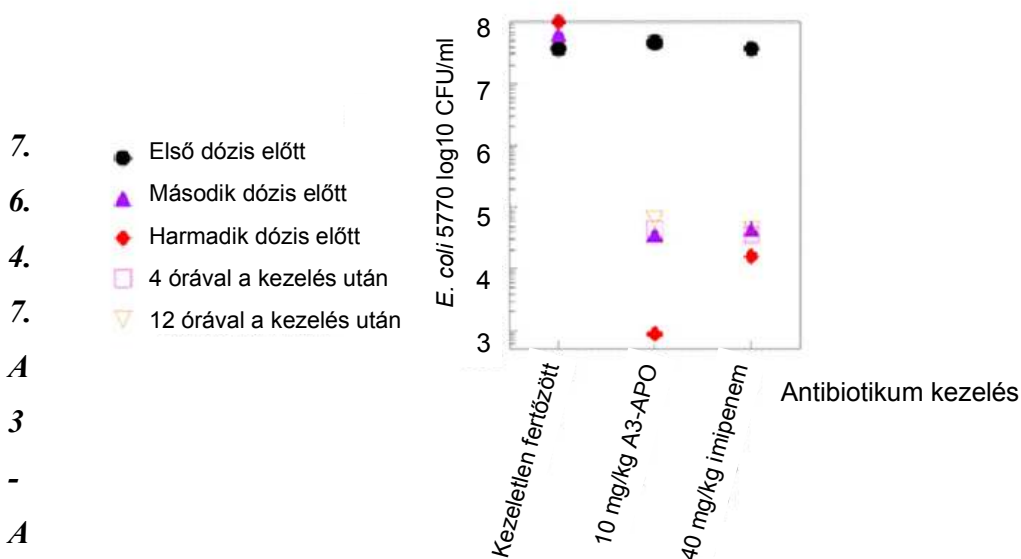


28. ábra *E. coli* 5770 törzsszel fertőzött majd A3-APO-val és imipenemmel kezelt egerek túlélése

dózisoknál (28. ábra). Ugyanezeknél a dózisoknál (2.5, 5 és 10 mg/kg) a késői (25 óra) túlélési arány kevésbé volt látványos 10 %, 30 % illetve 20 % volt. A statisztikai elemzés (χ^2) 0,05-nél kisebb P értékeket adott a legmagasabb 10 mg/kg-os A3-APO dózusra a vizsgálatban.

7.6.4.6. Az egerek vérében a baktérium koncentráció meghatározása

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 (29. ábra). 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. Ugyanebben a vizsgálatban 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 (29. ábra). Még 24 órával a fertőzés (12 órával az utolsó terápiás dózis) után is a vér baktérium koncentrációja több mint három nagyságrenddel alacsonyabb volt, mint a kezeletlenül túlélő állatokban.



29. ábra A vérben a baktérium koncentrációk az A3-APO-val kezelt *E. coli* 5770 törzsszel fertőzött CD-1 egerekben cisplatinos előkezelés nélkül

atékonyosságának vizsgálata cisplatinnal előkezelt bacteraemia modellel

18mg/kg cisplatin i.p. injekcióval adtunk a CD-1-es egereknek a fertőzés előtt 3 nappal, a veseműködés leállítására céljából. Az egereket az ESBL-termelő *E. coli* 5770 LD₅₀ 2×10^8 CFU/g dózissal fertőztük i.p. A csíraszám meghatározáshoz

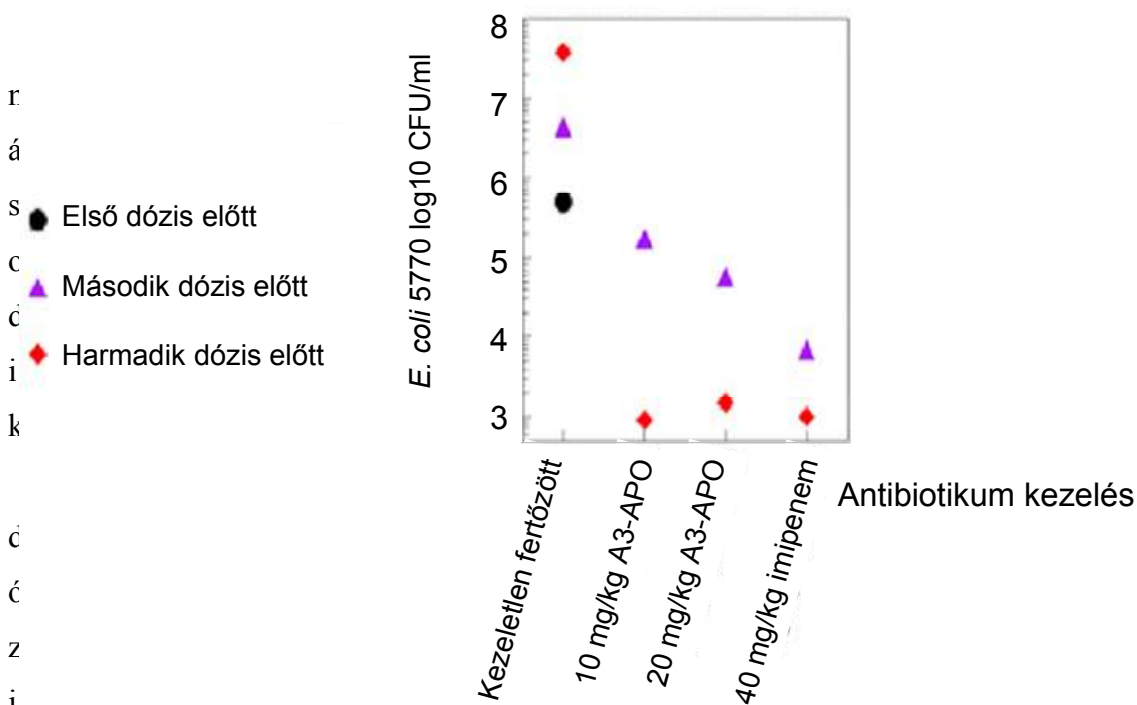
és a túlélési analízishez négy fertőzött és kezelt (2.5mg/kg, 5 mg/kg illetve 10 mg/kg A3-APO-val kezelt, 3x40 mg/kg imipenemmel kezelt) valamint két kontroll csoportot - nem fertőzött és kezelt illetve fertőzött és nem kezelt – használtunk.

7.6.4.8. Túlélési analízis

A fertőzött nem kezelt csoport túlélése 10 % volt 24 és 48 órával a fertőzés után, 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 fertőzés után 24 illetve 48 óra múlva. Ezek az értékek éppen az imipenem esetén megfigyelt szint alatt voltak. A peptid dózisének 20 mg/kg-ra növelése nem eredményezett farmakológiai javulást.

7.6.4.9. Az egerek vérében a baktérium koncentráció meghatározása

A kezeletlen egerek vérének baktérium koncentrációja folyamatosan emelkedett és 12 óra elteltével elérte a 6×10^7 CFU/ml-es maximumot (**30. ábra**). Az első dózis imipenem a vér baktérium koncentrációját 10^2 CFU/ml-rel csökkentette, és



30. ábra A vérben a baktérium koncentrációk az A3-APO-val kezelt *E. coli* 5770 törzsszel fertőzött CD-1 egerekben cisplatinos előkezeléssel

imipenem után a vér baktérium tartalma közelítette a 10^3 CFU/ml-es értéket, ami a detektálás alsó határa. Az első adag 10 mg/kg és 20 mg/kg dózisban alkalmazott A3-APO esetén a baktérium koncentráció 40 illetve 60-szoros csökkenése volt megfigyelhető. A második dózis A3-APO az imipenemhez hasonlóan a baktérium koncentrációt a 10^3 CFU/ml-es alsó határra csökkentette **(30. ábra)**. A 10 mg/kg A3-APO-val kezelt egerek esetében a második dózis alkalmazása után az egerek 100%-ban a vér baktérium koncentrációja a detektálási határérték alá csökkent. A 20 mg/kg A3-APO-val kezelt egerek esetében pedig az egerek vérében 40 %-ban nem volt detektálható baktérium.

8.MEGBESZÉLÉS

8.1. Epidemiológia

8.1.1. Az első magyarországi ESBL-termelő *Klebsiella pneumoniae* törzsek által okozott esethalmozódás molekuláris epidemiológiai jellemzése

Az első magyarországi esethalmozódás során izolált *K. pneumoniae* törzsek SHV-5 típusú ESBL-enzimet termeltek, mely Európában is a leggyakoribb enzimek közé tartozik. Magyarországon addig csak sporadikus esetek fordultak elő, ahol a törzsek SHV-2 és SHV-5 típusú ESBL enzimet termeltek (191, 238). Mind az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek, mind az ESBL-termelő *S. marcescens* törzs egy-egy nagy, konjugatív, egyéb rezisztencia géneket is tartalmazó plazmidot hordozott. A kromoszómális DNS molekuláris biológiai vizsgálata az epidemiológiai analízissel együtt, egy klónba tartozó ESBL-termelő *K. pneumoniae* láncszerű terjedését igazolta. Emellett sikerült kimutatnunk a plazmid terjedését is, ugyanis az azonos plazmidot hordozó ESBL-termelő *K. pneumoniae* és ESBL-termelő *S. marcescens* egymás utáni kimutatása ugyanabból a koraszülöttről azt igazolta, hogy az SHV-5 ESBL enzimet kódoló plazmid átkerülhetett egyik speciesből a másikba *in vivo*. A plazmidon kódolt ESBL-rezisztencia könnyű átvihetőségét bizonyítja, hogy *in vitro* az *E. coli* törzsbe transzformációval és konjugációval is átvihető volt a multirezisztenciát kódoló plazmid. Nem tudtuk azonban tisztázni, hogy az első ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzset behurcolták a koraszülött intenzív osztályra, vagy esetleg egy nem-ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzs átalakulása történt ESBL-termelő *K. pneumoniae*-vá a ceftazidim empirikus terápiaként használata miatt, amint azt más szerzők leírták (112, 179, 193).

Tanulmányunk alapján a szelekciós hatást feltételezve az osztályom felfüggesztésre került a ceftazidim empirikus használata, azonban ez önmagában nem volt képes megakadályozni az új esetek megjelenését, sőt az előfordulás gyakorisága emelkedni kezdett. A három hónappal később bevezetett szigorított elkülönítés hatására mérséklődött csak az ESBL-KP terjedése. A további két hónapos megfigyelési periódus során újabb esetek már nem fordultak elő, amely a megelőző intézkedések hatékonyságára utalt.

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

Az ESBL-termelő *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* törzsek megjelenése, illetve jelenléte a PIC-eken komoly klinikai problémát okoz. Vizsgálatunkban ismertettük ESBL-termelő *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* infekciók molekuláris epidemiológiáját egyazon PIC-en, két különböző időszakban. Két SHV-típust azonosítottunk: az SHV-5-t és az SHV-12-t. A vizsgálati időszakban az SHV-5 típus volt a leggyakrabban előforduló típus mind Magyarországon mind Európában (269, 277). Az SHV-12 típus, melyet gyakran izoláltak Spanyolországban, Franciaországban és Olaszországban (70, 111, 259), addig csak egyetlen *E. cloacae* törzsből izolálták Magyarországon (277). Egyazon ESBL-variáns eltérő földrajzi és időbeli felbukkanása a konvergens evolúciós eseményeknek tulajdonítható.

Érdekes módon két különböző ESBL-termelő *K. oxytoca* törzset is izoláltunk, amelyek járványt okoztak 2003-ban és 2005-ben. A *K. oxytoca*, a *K. pneumoniae*-hoz hasonlóan, gyakori kórokozó a perinatalis intenzív osztályokon. A *K. pneumoniae* törzsek jóval gyakrabban termelnek ESBL-eket, míg a *K. oxytoca* esetében ez igen ritka. Míg az SHV-12 termelő *K. oxytoca* újdonság volt Magyarországon, addig Franciaországban már izolálták SHV-12 termelő *K. oxytoca*-t (34). A vizsgálatunkig csak egyetlen (SHV-5) ESBL-termelő *K. oxytoca* okozta perinatalis intenzív osztályon zajlott járványról számoltak be (289).

A kockázati tényezőket vizsgálva nem találtunk statisztikailag jelentős különbséget a fertőzésre vonatkozó kockázati tényezők tekintetében az ESBL-termelő és nem ESBL-termelő *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* törzsek között, hasonlóan másokhoz (130). Bár a mortalitás magasabb volt az ESBL-termelő *Klebsiella* fajokhoz tartozó csoportban, mint a nem ESBL-termelő csoportban, ez a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. A szignifikancia hiánya azonban magyarázható az alacsony mintaszámmal is; bár a klinikai adatok is vitatottak (73, 130, 136).

Számos korábbi tanulmányban vizsgálták az ESBL-termelő organizmusok molekuláris epidemiológiáját a PIC-ek vonatkozásában. Ezen tanulmányok többségében csak egyetlen járványt okozó törzset azonosítottak, egy rövidebb időszak során (hetek-hónapok) (88, 91, 261, 269, 291, 310). Azonban vannak olyan tanulmányok is, amelyekben időről-időre számos törzs cirkulálásáról számolnak be, bár ezek olyan PIC-ekre vonatkoznak, amelyek más, a szülésnek helyet adó kórházból fogadtak újszülötteket (148). Azt is kimutattuk, hogy egy járványt okozó törzs eltűnhet és helyét újabb járványt okozó törzsek vehetik át egy hosszabb időszak alatt. Az általunk vizsgált PIC-re az összes újszülött a szülészeti osztályról került át, igaz az újszülöttek más osztályok személyzetével is kapcsolatban voltak. Mindazonáltal nem tudtunk detektálni egyetlen SHV-5 és SHV-12 termelő *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* törzset sem ugyanazon kórház más osztályain és az adott időszakban az osztály környezeti vizsgálata is negatív eredményt hozott. A bizonyíték ellenére lehetséges, hogy a fertőzéseknek volt egy közös környezeti forrása (27, 54, 91). A fertőzés egyik lehetséges forrása, a gyermekek anyja, 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.

Mivel az ESBL-termelő organizmusok világszerte egyre több beteget érintenek, a PIC-eken előforduló ESBL-termelő baktériumok molekuláris epidemiológiája még összetettebbé kezd válni. Sajnos az ESBL-termelés megjelenik olyan törzsekben, mint a *K. oxytoca*, ahol korábban ez igen ritka volt.

8.2. ESBL enzimek újabb fenotípusos és genotípusos detektálási lehetősége

8.2.1. ESBL enzimek fenotípusos detektálása *Enterobacter cloacae* törzsekben

Az első ESBL-termelő *E. cloacae* törzsekkel kapcsolatos beszámolók az Egyesült Államokban jelentek meg 1988-ban izolált TEM-12 és TEM-26 termelő *E. cloacae* törzsekről (246), majd SHV-3 ESBL-termelő *E. cloacae* törzsek is megjelentek Bostonban a kilencvenes években (59). Ma már világszerte igen sok közlemény számol be ESBL-termelő *E. cloacae* törzsekről (10, 22, 96, 113, 133, 185, 210, 212), sok közülük az Egyesült Államokból (59, 153, 246). Levison és munkatársai izoláltak elsőként SHV-7 és SHV-12 termelő *E. cloacae* törzseket három különböző kórházban Philadelphia-ban 2000-ben és 2001-ben (153). Ezt fontos kiemelni, mert ezt követően Pittsburgh-ben is izoláltunk SHV-2, -5, -7, -12, -14 és -30 típusú ESBL-t termelő *E. cloacae* törzseket egy egyéves időszakban hemokultúrából származó *E. cloacae* izolátumok vizsgálata során. A törzsek 33 %-a (15/45) bizonyult ESBL-termelőnek. Sajnos kevés adat áll rendelkezésre, amelyek alapján meghatározható lenne, hogy ez a százalékos arány magas-e, vagy más hasonló kórházakban tapasztalt értékekhez hasonló. Egy hasonló időszokban publikált koreai tanulmányban a hemokultúrából származó *E. cloacae* izolátumok 43 %-a bizonyult ESBL-termelőnek (210).

Vajon miért evolválódnának SHV-típusú ESBL-ek egy *E. cloacae* gazdasejtben? Izolátumainkban az SHV-típusú ESBL-ek derepresszált AmpC-vel β -laktamáz enzimmal együtt voltak jelen. Az AmpC β -laktamáz fokozott termelése oximino-cefalosporinokra és β -laktám/ β -laktamáz-gátló kombinációkra kiterjedő rezisztenciát okoz. Egy ESBL jelenléte szelektív előnyt biztosít a cefepim ellen. Ezenkívül a nagymennyiségű AmpC termelésével a cefalosporinok és a β -laktamáz inhibitorok ellen biztosított védelem az ESBL-ek evolúcióját lehetővé tévő mikrobiológiai környezetet teremthet. Ismert, hogy az ESBL-ek katalitikusan nem hatékonyak a penicillinek ellen és különösen érzékenyek a β -laktamáz gátlókra. A katalitikus aktivitás hiányosságát egy erős penicillináz, a

TEM-1 és egy inhibitor-rezisztens cefalosporináz kompenzálhatja, melynek eredménye a cefepimre kiterjedő rezisztencia lehet.

A CLSI és az EUCAST által meghatározott ESBL fenotípusos szűrővizsgálatok csak *Klebsiella spp.*, *E. coli* és *P. mirabilis* törzsekre tartalmazznak ajánlásokat (48, 79). A kromoszómális AmpC-típusú β -laktamáz termelő törzsek esetében azonban ezek az ajánlások nem kidolgozottak. *E. cloacae* esetében a CLSI által ajánlott cefotaximot vagy ceftazidimet alkalmazó ESBL-termelés detektálására szolgáló módszerek nem megbízhatóak a kromoszómális β -laktamáz enzim egyidejű termelése miatt. Mivel csupán 15 ESBL-termelő és 30 nem ESBL-termelő izolátumot vizsgáltunk, nem mondhatunk kategorikus ítéletet az ESBL-termelés detektálására szolgáló módszerekkel kapcsolatban az *E. cloacae* törzsekben. A szokványos, cefotaximot vagy ceftazidimet alkalmazó módszerek eredményeink alapján azonban nem megbízhatóak. Mindazonáltal a ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ -es cefepim MIC-érték az ESBL-termelés következetesen erőteljes markerének tekinthető. Míg a cefepimet és klavulánsavat használó tesztek néhány alacsonyabb MIC-értékkel rendelkező ESBL-termelő törzset is detektálhatnak, a tesztek szenzitivitását nem találtuk nagyobbak 75 %-nál.

A cefepim piacra kerülése előtt a vad típusú *E. cloacae* törzsek cefepimre vonatkozó MIC-értékei 0.06 és 0.5 $\mu\text{g/ml}$ között volt (267). Bizonytalan azonban, hogy az ezekben a tanulmányokban vizsgált törzsek termeltek-e ESBL-eket. A cefepim farmakokinetikájának és farmakodinámiájának értékelése a CLSI Antimikrobás szerek Érzékenységeinek Tesztelése bizottsága szerint a cefepim nem hatásos súlyos fertőzések kezelésében a 12 óránkénti 1 g-os dózisban 8 $\mu\text{g/ml}$ vagy magasabb MIC-értékkel rendelkező mikroorganizmus esetén, mint például ESBL-termelő *Klebsiella* fajok és *E. coli* okozta súlyos fertőzésben szenvedő betegek esetében. A klinikai adatok azt a nézetet támasztják alá, miszerint a cefepim aktivitása csökkent lehet néhány ESBL-termelő mikroba ellen, amelyek MIC-értékei a jelenlegi érzékeny tartományba esnek (216, 311). Összefoglalásképpen, a súlyos fertőzéseket okozó *E. cloacae* izolátumok ESBL termelése nem ritka. Alkalmanként a páciensekben genotípusosan hasonló izolátumok fordultak elő, de ezek az ESBL-termelő izolátumok elsősorban de novo alakultak ki. Mivel a klinikumban megfogalmazódott kétely a cefepim ESBL-termelő törzs elleni hatékonyságával kapcsolatban, ajánlatos lenne a cefepim CLSI határértékeit ismét áttekinteni.

8.2.2. ESBL enzimek újabb genotípusos detektálási lehetősége

Az *Enterobacter* fajok kromoszómáisan kódolt AmpC β -laktamázt termelnek, és egyre gyakrabban izolálnak TEM- és SHV-típusú ESBL-termelő törzseket is (295).

Gyors és megbízható módszereket, amelyek a β -laktamázok és az őket kódoló génnek jellemzésére alkalmasak, továbbra sem találtak. Egyetlen baktérium izolátumban két különböző *bla*_{SHV} gént azonosítani nem könnyű. Ennek érdekében az SHV-specifikus PCR termékek vizsgálatára kifejlesztették az izoelektromos fókuszálás és a restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus (RFLP) kombinációját (107). Mint korábban megjegyeztük, az enzim pI-jának meghatározása nem elegendő az SHV-eredetű β -laktamázok azonosításához a pI-értékek gyakori hasonlósága miatt. A PCR-RFLP technika egyszerű és gyors alternatíva, de nem tud minden ismert mutációt azonosítani, pl. az SHV enzimnek a 8-as, a 238-as és a 240-es aminosav helyen lévő mutációkat sem. A PCR egyszálú konformációs polimorfizmus analízist az SHV-családba tartozó β -laktamázok jellemzésére fejlesztették ki (165). Ezt a módszert már felhasználták egyazon izolátumban található két eltérő *bla*_{SHV} géntípus megkülönböztetésére (166, 309). A restrikciós hely inzerciós PCR módszert azon *bla*_{SHV} gén-mutációk azonosítására használták, amelyeket PCR-RFLP módszerrel nem lehetett azonosítani. Ebben a technikában olyan primereket használnak, amelyekben 1-3 bázis eltérés van a 3'-vég közelében, amelynek hatására módosulnak a restrikciós helyek (41). Az összes felsorolt technika a restrikciós endonukleázok igen specifikus restrikciós helyeket felismerő tulajdonságán alapul.

Az általunk vizsgált ESBL-termelő *E. cloacae* törzsek közül az ES24 izolátum AmpC, TEM-1 és SHV-7 β -laktamázokat termelt és egy új típusú SHV-enzimet, az SHV-30-at 6.7-es izoelektromos ponttal. Ez az első alkalom, hogy *Enterobacter* fajból SHV-30 enzim került izolálására és az első beszámoló két különböző SHV enzimet termelő *E. cloacae* törzsről. Az SHV-30 aminosavsorrendje három aminosavban tért el az SHV-1 aminosav szekvenciájától: izoleucin helyett fenilalanin a 8-as, arginin helyett szerin a 43-as és glicin helyett szerin a 238-as helyen.

Korábban a *bla*_{SHV} ESBL-ok gyors detektálására a real-time PCR-t és az olvasási görbe elemzését alkalmazták (244). Mi egy FRET real-time PCR-on alapuló gyors módszert használtunk a különböző *bla*_{SHV} génnek azonosítására. A

real-time allél megkülönböztetés egy fluoreszcencia detektáló rendszer, amely az amplifikálás során méri a fluoreszcenciát. A DNS-assay amplifikálással és detektálással egyetlen lépésben teszi lehetővé az amplifikációs termék elemzését, hosszadalmas posztamplifikációs eljárások nélkül. A próba és a célhely közötti eltérés jelentősen csökkenti a próba hibridizációjának és az azt követő hidrolízisnek a hatékonyságát.

Ezzel a módszerrel próbákat lehet tervezni minden célhely azonosítására, még azokra is, amelyek nem képeznek restriktációs endonukleáz hasítási helyeket. Ezzel a módszerrel potenciálisan kettőnél több allél is elkülöníthető. A módszer további előnye, hogy más típusú β -laktamázokat kódoló gének, pl. a *bla*_{CTX-M} vagy a *bla*_{TEM} esetében is használható.

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 két β -laktamáz is jelen volt. A módszert igen jól reprodukálhatónak találtuk és posztamplifikációs lépések nélkül is kivitelezhetőnek bizonyult. Ez az assay megfelelő standard termociklikus körülmények között lehetővé teszi akár számos SNP egyidejű azonosítását. Ez különösen hasznos lehet nagy populációkon végzett követéses vizsgálatoknál, amelyek a β -laktamáz gének molekuláris epidemiológiájának meghatározására irányulnak.

8.3. Új ESBL enzimek izolálása és karakterizálása

Az újonnan azonosított ESBL enzimek közül a TEM-63 szekvenciája négy aminosavban tért el a TEM-1 aminosavsorrendjétől, míg a TEM-131-ben egy további különbség is van a TEM-63-hoz képest. Ez a különbség (alanin cseréje treoninra a 237-es helyen) megtalálható a TEM-5-ben, a TEM-24-ben és a TEM-86-ban is. Érdekes megfigyelésünk a TEM-131 termelő transzformált törzsek TEM-63 termelő transzformált törzsekhez képest valamelyest magasabb cefotaxim MIC-értékei. A ceftazidim MIC-értékei jelentősen emelkedtek (> 256 µg/ml) mind a TEM-63, mind a TEM-131 termelő törzsekben. Az emelkedett cefotaxim MIC értékekért az Ala237Thr szubsztitúció volt a felelős.

A MIC-értékek enyhe emelkedése kapcsán korábban már felmerült annak lehetősége, hogy a szignál szekvenciában található Ile8Phe mutáció (1-24 aminosavak az SHV-ben) fokozhatja a β-laktám rezisztenciát a β-laktamáz periplazmatikus térbe történő hatékonyabb transzportjával (243). Egy fehérje szignál peptidszekvenciája három részből áll: 1-5 pozitívan töltött aminosavból álló N-terminális, 10-15 oldallánc alkotta központi hidrofób régió és 3-5 hidrofíl aminosavból álló C-terminális szakasz. Úgy gondoljuk, hogy a nettó pozitív töltés jelenléte az N-terminálison növeli a transzport hatékonyságát; a core régiónak hidrofílnak kell lennie; míg a szignál hasítási régió ideálisan hat aminosav hosszúságú, kis odalláncú aminosavakkal a -1 és -3 helyen. A TEM-mel ellentétben az SHV-vel kapcsolatban még nem végeztek alapos tanulmányokat a szignál szekvencia szerepével kapcsolatban. Vizsgálták ugyan az Arg43Ser mutáció hatását SHV enzimben, ugyanakkor nem tudták meggyőzően kimutatni, hogy a mutáció befolyásolta-e az SHV-1 fenotípusát (243).

Az SHV-1 kristályszerkeztét vizsgálva arra voltunk kíváncsiak, hogy a mutációknak az első számban lehet-e hatásuk a távolabbi kulcsfontosságú oldalláncokra, amelyek meghatározzák az ESBL (Gly238) vagy inhibitor-rezisztens (Arg244, Leu275, Asn276) fenotípust. Az SHV-1 szerkezetének vizsgálata azt mutatta, hogy az Arg43 közel helyezkedik el az Asn276-hoz. Egy pozitívan töltött aminosav poláros-semleges oldalláncra történő cseréje módosíthatja a terminális helix csúcspontját, elmozdítva az Asn276-ot és érintve az Arg244-et. Másképp fogalmazva, ezen a helyen a mutációk okozhatnak olyan

egyéb hatásokat, amelyeket nem látunk vad típusú környezetben (SHV-1), csak ESBL esetén figyelhetők meg (SHV-2).



31. ábra Az SHV-1 β -laktamáz enzim háromdimenziós szerkezete, amelyen látható, hogy az Arg43 közel helyezkedik el az Asn276-hoz az utolsó hélixen, illetve az Arg244-hez viszonyított helyzete

SHV-2 környezetben az Ile8Phe és Arg43Ser aminosavszubsztitúciók növelik a harmadik generációs cefalosporinok MIC-értékeit. Agarhígítási módszerrel az SHV-30-at expresszáló *E. coli* DH10B enyhe emelkedést mutatott a cefotaxim, ceftazidim és ceftriaxon MIC-értékekben, az SHV-2-vel összehasonlítva. A kinetikai elemzés alapján az Arg43Ser szubsztitúció Gly238Ser környezetben (SHV-30) visszaállította az enzim ampicillinre vonatkozó katalitikus kapacitását az SHV-1 szintjére, és növelte a cefotaxim hidrolízisének hatékonyságát, alátámasztva a MIC-értékekkel kapcsolatos eredményeket. Az SHV-30 esetén az Ile8Phe-Arg43Ser szubsztitúciók visszafordították a Gly238Ser aminosavcsere okozta fokozott érzékenységet klavulánsavra, szulbaktámra és tazobaktámra. Az Ile8Phe mutációnak önmagában kompenzáló hatása volt a β -laktám/ β -laktamáz inhibitor kombinációkra való fokozott érzékenységre. Az SHV-2 és SHV-30 K_D értéke nem különbözött számottevően, ami arra utal, hogy az Arg43Ser nem jelentős régió a tazobaktámhoz való affinitás szempontjából. Az Arg43Ser mutáció csökkenti a cefotaximra vonatkozó K_M -et.

Azt gyanítjuk, hogy a β -laktamáz expresszióban bekövetkezett növekedés lehet az oka a megnövekedett inhibitor rezisztenciának, amelyet az *E. coli* Arg43Ser-

Gly238Ser esetén láttunk, az Ile8Phe-Arg43Ser-Gly238Ser mutációt tartalmazó *E. coli*-val összehasonlítva. Következtetéseinket azonban óvatosan kell értelmezni. A vezető szekvencia és az Arg43Ser valódi jelentősége az SHV expresszióban egyelőre még nem teljesen világos. Hogy ezek és más mutációk miként hatnak a szekrécóra és a bakteriális proteázokra való érzékenységre az enzim életciklusa során, még mindig nem tisztázódott.

CTX-M-59 enzimmel végzett vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy a CTX-M-59 kinetikai tulajdonságait a H89L szubsztitúció nem változtatta meg az elődjéhez, a CTX-M-2-höz képest.

8.4. Plazmidon kódolt kinolon-rezisztencia (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* és *aac(6')-Ib-cr*) gének vizsgálata ESBL-termelő *Enterobacteriaceae* törzsekben

Vizsgálatunk során mindhárom Qnr csoportot és az AAC(6')-Ib-cr-t detektálni tudtuk. 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 összes izolátumban a *qnrA* prevalenciája volt a legnagyobb. A *qnrA* determinánsok nemzetközi elterjedtsége ellenére csak a *qnrA1*-et tudtuk detektálni (213, 233, 250). A *qnrA1* és *qnrS1* altípusok prevalenciája az ESBL-termelő *Enterobacteriaceae* körében alacsony volt: ~ 3 % *qnrA1*-re és 0.4 % *qnrS1*-re, ami nagyon hasonló a nemzetközi tanulmányokban leírt értékekhez (213, 232, 250). Meglepő módon két fajban csak *qnrB* géneket tudtunk detektálni.

QnrA1 mellett *qnrB2* gént mutattunk ki egy *K. pneumoniae* törzsben és *qnrB2* gént találtunk egy *C. freundii* izolátumban is. *QnrB* géneket eddig csak az Egyesült Államokban és Ázsiában észleltek (212, 250). Más szerzők is megfigyelték, hogy a QnrB széles határok között változó kinolon MIC-értékekkel rendelkező izolátumokban van jelen, beleértve a teljes érzékenységet is (211). A *qnr*-pozitív törzsek MIC-értékeinek széles tartománya felhívja a figyelmet arra, hogy a *qnr* gének detektálása a klinikai izolátumokban fenotípusosan igen nehéz lehet.

A *qnr*-pozitív törzsekből és a *qnr*-pozitív konjugált baktériumokból izolált plazmidok azonos méretűek voltak (>10 kb). A *qnr* gének pontos lokalizációja egyéb törzsekben még nincs meghatározva, de ha plazmidon helyezkedik el, lehetséges, hogy a plazmid nem konjugatív vagy a konjugáció folyamán a *qnr* elvész. Más tanulmányokban is kimutatták, hogy nem az összes *qnrA* pozitív izolátum volt képes átadni a kinolon-rezisztenciát (249, 300).

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy *qnr*-pozitív törzsek gyakran expresszálnak ESBL enzimeket, mint az SHV-2, SHV-7, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15 és a VEB-1 (211, 232, 249). Magyarországon a *qnrA1* gén jelenléte kapcsolt volt SHV-5, SHV-12 és CTX-M-15 enzimekhez. A *qnrB2*

jelenléte SHV-12-vel volt kapcsolatos. A *qnrS1* gén az SHV-2 ESBL enzimmel együtt fordult elő.

A *aac(6')-Ib-cr* jelenléte nem eredményezett nagy emelkedést a kinolonok MIC-értékeiben, bár jelentősen növelte a kromozómális mutánsok szelekciójának gyakoriságát.

Összefoglalva, elsőként számolunk be plazmid-mediálta kinolon-rezisztenciáról ESBL-termelő *Enterobacteriaceae* baktériumoknál Magyarországon. Ezek az eredmények a három *qnr* génnek és *aac(6')-Ib-cr* lassú szétterjedésére utalhatnak az ESBL-termelő *Enterobacteriaceae* törzsek esetén. Ez az első beszámoló a *qnrB* gén megjelenéséről Európában, ami a kiterjedt spektrumú cefalosporinokra és a kinolonokra vonatkozó rezisztencia átadásában részt vevő plazmidok széleskörű elterjedtségére utal a klinikai izolátumokban.

8.5. Karbapenem rezisztens Gram-negatív baktériumok vizsgálata

8.5.1. Ertapenem rezisztens *Enterobacter cloacae* törzs vizsgálata

Az ertapenem *in vitro* aktív antibiotikum az *Enterobacteriaceae* család tagjai ellen (219). A *K. pneumoniae* törzsek esetében alkalmanként megfigyelt emelkedett ertapenem MIC értékek összefüggésben voltak az ESBL és- vagy AmpC β -laktamáz enzimek egyidejű termelésével, illetve az egyidejűleg megfigyelt OmpK35 és OmpK36 külső membránfehérjék expressziójának elégtelenségével (120, 122).

Ebben a vizsgálatban egy hemokultúrából izolált ertapenem-rezisztens *E. cloacae* izolátumot hasonlítottunk össze az ugyanabból a betegből származó korábbi ertapenem-érzékeny *E. cloacae* izolátummal. Bár az ertapenem-rezisztens izolátumban kissé fokozottabb volt a β -laktamáz termelés, nem volt különbség a két törzs között a termelt β -laktamáz enzimek számában és típusában. Azonban az ertapenem-rezisztens izolátumban az *ompF* és *ompD* gének RNS-transzkriptuma csökkent mértékben volt jelen az ertapenem-érzékeny izolátumhoz képest. Fontos megemlíteni, hogy vizsgálataink során RT-PCR módszert használtunk a porin transzkriptumok szintjének meghatározásához. Ez a módszer kiküszöböl néhány nehézséget a külső membránfehérje profilok szubjektív interpretálásával kapcsolatban.

Korábban kimutatták, hogy klinikai *E. cloacae* izolátumokban a külső membrán csökkent permeabilitása és a magas-szintű cefalosporináz-termelés együttesen karbapenem-rezisztenciához vezethet (30, 149). Az ertapenem-rezisztens törzsekben eddig nem találtak fenotípusos bizonyítékot az efflux-pumpa fokozott expressziójára vonakozóan (122). Azonban amikor a PA β N efflux-pumpa inhibitort alkalmaztunk a MIC értékek meghatározásához, azt tapasztaltuk, hogy a ciprofloxacín, az ertapenem és a meropenem MIC-értékek jelentősen csökkentek PA β N jelenlétében. A ciprofloxacín és a meropenem az efflux-pumpák régóta ismert szubsztrátjai (208), de az ertapenemről eddig nem volt ismert, hogy efflux-pumpa szubsztrát lenne.

Számos korábbi tanulmányban foglalkoztak az efflux-pumpáknak (főleg az AcrAB pumpáknak) az *Enterobacteriaceae* család antibiotikum rezisztencia-

mechanizmusában betöltött szerepével (44, 160, 169). Ugyan vizsgálatunk során nem találtunk különbséget az AcrB expressziójában az ertapenem-érzékeny és ertapenem-rezisztens *E. cloacae* törzsek között, azonban az eredményeink alapján azt gyanítjuk, hogy létezik egy még ismeretlen efflux-pumpa, amely befolyással bír az ertapenem-rezisztenciára. Azonban míg a PA β N-hatás alátámasztja egy efflux-pumpa létezését, ez még nem jelenti szükségszerűen annak hiperexpresszióját. Az efflux-pumpa mediálta rezisztenciát részint a külső membrán permeabilitása határozza meg. Az *ompF* és *ompD* gének csökkent mennyiségű RNS-transzkriptuma arra utal, hogy az ertapenem-rezisztens izolátum külső membránja kevésbé volt permeábilis, mint az érzékeny törzsé - valószínűleg ez vezethetett egy pumpa által okozott magasabb szintű rezisztenciához anélkül, hogy annak hiperexpressziója önmagában szükséges lenne.

8.5.2. Ertapenem rezisztens *Klebsiella pneumoniae* és *Klebsiella oxytoca* törzs vizsgálata

Az ESBL-termelő, multirezisztens *Enterobacteriaceae* törzsek elterjedésével, a Gram-negatív baktériumok okozta súlyos fertőzések kezelésére elsősorban karbapenemeket használnak. Napjainkban azonban számos vizsgálat már egyértelműen bizonyította a karbapenem rezisztens törzsek szelektálódását karbapenemmel történő kezelés hatására (72, 147, 194, 241, 266, 288, 305). Az EARSS 2007. évi jelentésében felhívta a figyelmet a karbapenem rezisztens *Enterobacteriaceae* törzsek európai terjedésének veszélyére. Emelkedik gyakoriságuk, azonban feltehetően az eltérő antimikrobás kezelési szokások miatt széles tartományban variál gyakoriságuk: Görögország (45.9 %), Izrael (21.9 %), Törökország (2.2 %), Németország (1.7 %), Olaszország (1.7 %) (80). Karbapenem rezisztenciához vezet többek között a törzsek karbapenemáz termelése is. Komoly probléma a karbapenemáz enzim termelésével, hogy annak ellenére, hogy a karbapenemáz enzimek jól bontják a karbapenemeket, az *Enterobacteriaceae* törzseknél sokszor nem alakítanak ki rezisztens fenotípust és így a rutin diagnosztikában problémát jelenthet felismerésük.

A Nemzeti ESBL Referencia laboratórium vizsgálatai eddig azt mutatták, hogy Magyarországon az *Enterobacteriaceae* törzsek karbapenem rezisztenciájáért legnagyobb részt a cefalosporináz és kapcsolt mechanizmusok voltak a

felelősek, de terjedőben vannak a KPC termelő törzsek is (278). 2009-ig nem volt igazolható MBL-termelő törzs Magyarországon az *Enterobacteriaceae* családba tartozó speciesekben. Ismereteink szerint először igazoltuk VIM-termelés megjelenését hazai *Enterobacteriaceae* családba tartozó törzsekben. VIM-4-termelést *K. oxytoca*-ban mi igazoltunk a világon először.

A VIM-termelő *Klebsiella* speciesek megjelenése hazánkban aggodalomra ad okot. A class-1 gén kazetták homogenitása a *Klebsiella spp.* között és a korábban leírt *P. aeruginosa* és *Aeromonas hydrophila* között a VIM-4 rezisztencia kazetta közös eredetére utal. Bár a *bla_{VIM}*-tartalmú integronok főleg transzferábilis plazmidokkal terjednek a legtöbb bélbaktériumban, a plazmidok terjedése azonos mintázattal különböző specieshez tartozó izolátumok között, mint az általunk megfigyelt esetben, nem gyakori. Eredményeink rávilágítanak a horizontális terjedés szerepére az integron vagy plazmid terjedésében és/vagy ezek ismételt aquirálására különböző klinikai törzsekben.

Külön aggodalomra adhat okot, hogy a VIM-4 termelő *K. pneumoniae* izolátum egy rendkívül sikeres multirezisztens ST11 klónhoz tartozik. Az ST11 klón csak egy mutációban, különbözik ST258 klóntól, mely KPC gén aquirálása után nemzetközileg elterjedté vált. Sajnos felmerül a gyanú, hogy egy sikeres integron, mely *Aeromonas*-ból, *Pseudomonas*-ból *Klebsiella*-ba átkerült és egy sikeres klón találkozása a törzs nemzetközi elterjedéséhez fog vezetni, mint a KPC termelő klón esetében.

8.5.3. Karbapenem rezisztens *Pseudomonas aeruginosa* és *Acinetobacter baumannii* törzsek vizsgálata

A különböző baktériumfajok által termelt ESBL-enzim típusa alapján eddig Magyarországon SHV-, TEM- és CTX-M típusú ESBL-termelő *Klebsiella* fajokat és *E. coli* törzseket izoláltak (61, 277) – míg Egyiptomban az ESBL-fenotípust *K. pneumoniae* és CTX-M termelő *E. coli* törzsekben figyelték meg (22, 183). A PER-1 β -laktamáz évekig csak Törökországban fordult elő (286). Azonban a főként *P. aeruginosa*-ban megtalálható PER-1 β -laktamázt már számos országban, így Törökországban, Franciaországban, Belgiumban, Spanyolországban, Olaszországban, Lengyelországban, Romániában, Japánban és Dél-Koreában is detektálták (69, 76, 140, 181, 188, 189, 207, 212, 301). Az *Acinetobacter* fajok PER-1 termelését gyakrabban figyelték meg

Törökországban és Koreában (124, 287, 306). Tudomásunk szerint ez volt az első beszámoló PER-1 termelő *P. aeruginosa*-ról és PER-1 termelő *A. baumannii*-ről Magyarországon, azonban azóta több PER-1 termelő *P. aeruginosa* törzset is izoláltak már Magyarországon is (156).

Az általunk vizsgált törzsek – a *P. aeruginosa* 1 és az *A. baumannii* törzs - az antibiotikum-érzékenységek, az izoelektromos fókuszálás és a szekvenálási eredmények alapján a PER-1 ESBL-enzimet termeltek. Az *A. baumannii* törzs TEM-1-et is termelt, a *P. aeruginosa* 1 törzs pedig OXA-10 széles spektrumú β -laktamázt. A *P. aeruginosa* 2 törzs kizárólag kromozómális AmpC cefalosporinázt termelt, ami azt sejteti, hogy az OprD elvesztése volt a felelős az imipenem-rezisztenciáért. A *P. aeruginosa* 3 törzs az OXA-1 széles spektrumú β -laktamázt és a VIM-2 MBL-enzimet termelte. A *K. pneumoniae* törzs SHV-5 és TEM-1 enzimeket termelt.

Az MBL-enzimek számos típusát – IMP-típus, VIM-típus, SPM-1, GIM-1, SIM-1 – azonosították *P. aeruginosa*-ban (241). Európában a VIM-enzimek a leggyakoribbak (89). Az általunk detektált VIM-2 enzimet korábban már világszerte számos fajban megtalálták, ez tűnik a legnagyobb prevalenciájú allélformának (1, 104, 225, 293, 294, 302). Magyarországon VIM-termelő *P. aeruginosa* törzseket már izoláltak, de MBL-termelő törzsekről Egyiptomban eddig még nem számoltak be (155, 157).

Mindemellett a *P. aeruginosa* 1, *P. aeruginosa* 2 és *P. aeruginosa* 3 PFGE vizsgálata megerősíti, hogy a három *P. aeruginosa* törzs – a PER-1 termelő *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa* 1), az OprD-t elvesztett *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa* 2) és a VIM-2 termelő *P. aeruginosa* (*P. aeruginosa* 3) – külső eredetű volt és Egyiptomból hozhatták át Magyarországra. A PER-1 termelő *P. aeruginosa* és *A. baumannii* törzsek eltűntek a kórházból, azóta nem figyeltek meg több fertőzést ezekkel a törzsekkel.

A PER- termelő és az MBL-termelő törzsek felbukkanása és azt követő terjedése riasztó mértékű. Valószínű, hogy ezek a rezisztencia-mechanizmusok más országokban is jelen lehetnek, a PER-enzim elterjedése a világon nagyobb mértékű lehet, részben azért, mert a *P. aeruginosa* törzsek ESBL-termelésének rutin tesztelése megoldatlan probléma. A CLSI ajánlása a különböző

baktériumfajokban történő ESBL-termelés szűrésével kapcsolatban nem teljes, csak a *Klebsiella* fajokra és *E. coli* törzsekre vonatkozik (48).

Befejezésül, ez a munka megerősíti a PER-1 termelő *P. aeruginosa* és *A. baumannii* izolátumok, VIM-2 termelő *P. aeruginosa* törzsek megjelenését Magyarországon. Szemlélteti a β -laktamáz mediálta rezisztencia-mechanizmusok országok illetve földrészek közötti terjedésének lehetőségét. Vizsgálatunk jellemzi az antibiotikum-rezisztencia földrészek közötti terjedését, rámutatva a gondos szűrés és a külföldről érkező betegek elkülönítésének jelentőségére.

8.6. ESBL-termelő törzsek által okozott fertőzések terápiási lehetőségei kísérletes állatmodellben

Az ESBL-géneket nagy plazmidok hordozzák, amelyek más antimikrobás szerekre való rezisztenciáért is felelősek lehetnek, mint az aminoglikozidok, trimethoprim-sulfamethoxazol, tetracyclinek és chloramphenicol (77, 264). Korlátozott antibiotikum-érzékenységük miatt intenzív kutatás folyik az *Enterobacteriaceae* család ESBL-termelő törzsei által okozott fertőzések hatékony antibiotikus kezelésével kapcsolatban (83, 87, 132, 151, 178, 247, 248, 274). A legtöbb tanulmányban β -laktámokat önmagukban vagy β -laktamázgátlókkal kombinálva vizsgáltak, ellentmondásos eredményekkel (83, 87, 151, 178). Azonban más antibiotikummal az általunk elvégzett vizsgálatig nem végeztek kísérleteket.

Az antimikrobás szerek hatékonyságának kiértékelésében az állatmodellek alkalmazása igen fontossá vált. A humán farmakokinetikai profil állatmodellekkel történő szimulálása szükséges a hatékonyság felméréséhez, amely azután klinikai körülményekre is alkalmazható (3).

8.6.1. A ciszplatin hatása az egér farmakokinetikai paramétereire

A veseműködési zavar nefrotoxikus szerrel történő előidézése egyszerű módszernek bizonyult a vese által kiválasztott gyógyszerek humán szérumszintje időbeli lefolyásának szimulálására kis állatokban (95).

Vizsgálatunkban egy citosztatikus szert, a vesekárosító hatással is rendelkező ciszplatint használtunk a veseműködés zavarának kiváltására. A cefepim volt a vizsgált gyógyszer, clearance-ét kellően hasonlóknak találták a kreatinin clearance-éhez (202). 18 illetve 22 mg/kg ciszplatinnal oltva az egereket, letalitásuk nem különbözött jelentősen a negatív kontroll csoporttól, azonban a cefepim kiürülési féléletideje jelentősen megnőtt. A beadást követő hatodik óráig a cefepim szérumszintjei a 0.5 g intravénás beadását követően a humán értékek fölött voltak, kivéve a csúcskoncentrációt, amely a 2 g intravénás dózis alatt volt (5). A 18 illetve a 22 mg/kg ciszplatinnal oltott csoport között nem volt különbség: hasonló cefepim féléletidőket és túlélési arányokat figyeltünk meg. A

cisplatin dózisát 26 mg/kg-ra növelve, az állatok túlélési aránya csökkent, de a kiürülési félidő nem volt jelentősen hosszabb a 18 mg/kg esetén számítottnál.

Eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy a humán szérumszinteket el lehet érni állatkísérletekben cisplatin előkezeléssel intenzív laboratóriumi eljárások nélkül is. Így a kísérletesen vizsgált gyógyszerek alkalmazása közti időszakok hasonlóak lesznek a klinikai körülményekhez, ami megkönnyíti az antibiotikus kezelést érintő számos tényező tanulmányozását.

8.6.2. Imipenem, cefepim és amikacin hatékonyságának vizsgálata SHV-5 típusú ESBL-termelő *Klebsiella pneumoniae* törzsből

Az ESBL-termelő törzsek *in vitro* cefepim-érzékenysége 52-90% volt a vizsgálattól függően (125, 262). Az ESBL-termelő törzsek cefepimmal történő kezelést az *in vitro* tapasztalt érzékenység alapján javasolták egyes szerzők (103). Azonban mások még *in vitro* hatékonysága ellenére sem ajánlották a cefepimet terápiás szerként, az inokulum-hatásra, a dózis-függésre és egyéb faktorokra hivatkozva (125, 274). Az eredményeink magas csíraszám esetében a cefepim *in vitro* és *in vivo* hatástalanságát bizonyították be.

A karbapenemekről ismert, hogy stabilak az ESBL enzimekkel szemben és ezért az elsőként választandó terápiás szerek (121, 248). Tanulmányunkban az imipenem ugyan enyhe csíraszám-függést mutatott, de hatásosnak bizonyult. Az imipenem jelenlétében folyamatosan csökkent mind az *in vitro* mind az *in vivo* baktérium mennyiség, és az imipenem kezelés biológiailag is hatékonynak bizonyult.

Az amikacinnak szintén jó *in vitro* aktivitása van az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek ellen az irodalmi adatok szerint (125, 242). Tanulmányunkban az amikacin nem mutatott csíraszám-függést, ami előny a β -laktámokkal szemben. *In vitro* nem figyeltünk meg szinergizmust az amikacin és a cefepim között, és a kombináció *in vivo* sem volt hatékonyabb, mint az amikacin önmagában.

Összefoglalva az eredményeinket, a megfigyelt biológiai különbségek relevánsnak tekinthetők, mivel a farmakokinetikai adatok megfelelőek voltak az összes antibiotikum esetén. Eredményeink alapján az *in vitro* érzékenységi teszt: a standard csíraszámmal számított MIC érték nem prediktív a cefepim biológiai hatékonyságával kapcsolatban a lehetséges *in vivo* inokulum-hatás

miatt. A vizsgálatunk alapján az imipenem vagy az amikacin lehet a választandó kezelés ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek ellen, amelyek standard csíraszám esetén érzékenynek mutatkoznak, míg a cefepim nem javasolható még érzékenységet mutató organizmusok esetén sem.

8.6.3. Ciprofloxacin és levofloxacin hatékonyságának vizsgálata SHV-5 típusú ESBL-termelő *Klesiella pneumoniae* törzsben

A fluorokinolonok fontos és széles körben használt antibiotikum-csoport. A fluorokinolonok korábbi tagjainak, mint például a ciprofloxacinnak csak az aerob Gram-negatív baktérium ellen van aktivitása, míg az új kinolonok, például a levofloxacin szélesebb aktivitási spektrummal rendelkezik, megnövekedett hatékonysággal a Gram-pozitív baktériumok ellen, továbbá kitűnő Gram-negatív baktérium és atípusos mikroorganizmus ellenes aktivitással is bír (16, 201, 298). Vizsgálatunk idejében az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek 68-80%-a bizonyult *in vitro* érzékenynek ciprofloxacinra (123, 125), de a levofloxacin-érzékenységet akkor még nem vizsgálták. A ciprofloxacin hatékonyságára az ESBL-termelő törzsek okozta fertőzések kezelése során is csak utaltak néhány klinikai beszámolóban (132, 215, 224). Az *in vitro* érzékenység és e klinikai beszámolók alapján a ciprofloxacin hatékony terápiás szer az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek ellen, de az *in vivo* és a nagyobb klinikai vizsgálatok hiányoztak.

Kísérletünkben mind a ciprofloxacinnak, mind a levofloxacinnak jó *in vitro* aktivitása volt az ESBL-termelő *K. pneumoniae* ellen. A kapott alacsony MIC- és MBC-értékek illetve az inokulum-hatás hiánya előny lehet a β -laktámokkal összehasonlítva (68). A ciprofloxacin és a levofloxacin gyorsan és folyamatosan csökkentette a baktérium-koncentrációt is az ölési görbe vizsgálatokor, és nem figyeltünk meg rezisztens baktérium felbukkanását sem.

Egyes szerzők a ciprofloxacint hatékonyabbnak találták, mások a levofloxacint (90, 137), mi a tanulmányunkban nem találtunk különbséget a két szer között, kísérletünkben a ciprofloxacin és a levofloxacin *in vivo* hatékonysága megegyezett, nem volt számottevő különbség a vér baktérium-koncentrációjában és a túlélési rátában a két kezelt csoport között. A fertőzött-kezelt csoportot összehasonlítva a fertőzött-kezeletlen csoporttal szignifikáns különbség volt a vér baktérium-koncentrációjában és az egerek túlélésében.

A fluorokinolonokkal történő kezelés kimenetelét az AUC_{0-24} -hez és MIC-re vonatkozó C_{max} -hoz kapcsolták (57, 117, 280). Tanulmányunkban a ciprofloxacin és a levofloxacin AUC_{0-24} értéke hasonló volt a humán értékekhez (152, 196). Az AUC_{0-24}/MIC hányadosok magasabbak voltak, mint ami az állatkísérletek és klinikai tanulmányok alapján a bakteriális eradikációhoz szükséges (117, 196). A jó *in vivo* eredmények ezzel a farmakokinetikai háttérrel magyarázhatók.

Befejezésül, a ciprofloxacin és a levofloxacin kitűnő *in vitro* és *in vivo* aktivitása ígéretesnek tűnik az *Enterobacteriaceae* család ESBL-termelő tagjai által okozott súlyos fertőzések kezelésében.

8.6.4. A3-APO peptid hatékonyságának vizsgálata szisztémás *Escherichia coli* fertőzésekben különböző egérmodellekben

Az A3-APO olyan antimikrobiális peptid, amelyben mind a bakteriális membránnal mind az intracellularis célponttal kölcsönhatásba lépő domének megtalálhatók és fokozott stabilitást mutat a proteolitikus emésztéssel szemben (203, 204). Az A3-APO elpusztítja a β -laktám- és fluorokinolon-rezisztens klinikai izolátumokat szérumban proteázok jelenlétében is. A MIC középértéke *Salmonella enterica* serovar. typhimurium sorozatra továbbá húgyúti fertőzésből izolált *E. coli* és *K. pneumoniae* törzsekre 12 $\mu\text{g/ml}$ volt (204). Azért az A3-APO-t használtuk a kísérleteinkben, mert igen jól bejut a sejtbe, megbontja a bakteriális membrán szerkezetét és gátolja a 70 KDa-os DnaK hősokkfehérjét, továbbá szinergizmust mutat kismolekulájú antibiotikumokkal (203-205). A prolingazdag peptidek szelektíven kötődnek a bakteriális DnaK C-terminális hélixéhez (így gátolva a hősokkfehérjék segítségével történő fehérje feltekeredést), de nem az emlősökéhez (142). A további előnye, hogy az A3-APO nem vált ki antitest-termelést egerekben (200).

Az AMP-k szisztémás alkalmazását korlátozza, hogy nincsenek megfelelő biztonsági határok és a vesén keresztül történő gyors kiürülésük. Így a legtöbb fejlesztés alatt álló AMP-t csak helyi alkalmazásra hagyták jóvá eddig (31).

Általános vélemény a megfelelő *in vivo* dózisokkal kapcsolatban, hogy gyógyszerre azok az antibiotikumok fejleszthetők, amelyek MIC-értéke nem nagyobb 12 $\mu\text{g/ml}$ -nél (31). A vizsgált MDR törzsek kb. 60 %-ánál az A3-APO peptid nem tesz eleget ennek a követelménynek. Azonban az AMP-kről az is

ismert, hogy sok cellularis és szöveti célpontjuk van, mint például az immunrendszer erős aktivátorai (203). AMP-k *in vivo* hatékonysági paraméterei jelentősen meghaladják azt az aktivitást, amelyet a MIC-értékekből önmagában magyarázni lehet (203). Ezért a jövőben még további vizsgálatok szükségesek az A3-APO toxicitásával és szisztémás hatékonyságával kapcsolatban.

A tervezett prolingazdag A3-APO peptid vonzó biokémiai, mikrobiológiai és farmakológiai tulajdonságokkal bír és azon igen kisszámú szintetikus peptid közé tartozik, amely hatékonyan bizonyult bakterémia egérmodellekben, hasonlóan a karbapenemekhez (75). A jelenleg ismert rezisztenciamechanizmusok nem érintik a tervezett prolingazdag peptid aktivitását sem *in vitro*, sem *in vivo* (37, 58).

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. A vér baktérium koncentrációja érzékenyebb indikátora volt a peptiddel történő kezelés hatékonyságának, mint az egerek túlélése, mert az antimikróbás terápia során esetlegesen bekövetkező gyors endotoxin felszabadulás megölte az állatokat (33).

9. A TÉZISEK LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSA

9.1. 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.

9.2. 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 restrikciós endonukleáz hasítási helyeket, illetve kettőnél több allél is elkülöníthető. Ez különösen hasznos lehet nagy populációkon végzett követéses vizsgálatoknál, amelyek a β -laktamáz gének molekuláris epidemiológiájának meghatározására irányulnak.

9.3. 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 hidroliziséért 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.

9.4. 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: $\sim 3\%$ 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.

9.5. 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-mechanizmusok 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.

9.6. 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 mikroorganizmusok esetében sem a kísérleteink során bizonyítottan *in vivo* is megfigyelhető inokulum hatás miatt.

A tervezett prolingazdag A3-APO peptid hatékonynak bizonyult jól-tolerált dózisokban bakterémia egérmodellekben, így potenciális jelölt lehet a rezisztens fertőzések elleni kezelésben önmagában vagy hagyományos antibiotikumokkal kombinációban.

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. **Aboufaycal, H., H. S. Sader, K. Rolston, L. M. Deshpande, M. Toleman, G. Bodey, I. Raad, and R. N. Jones.** 2007. *bla*_{VIM-2} and *bla*_{VIM-7} carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in a tertiary care medical center in the United States: report from the MYSTIC program. *J Clin Microbiol* **45**:614-5.
2. **Ambler, R. P., A. F. Coulson, J. M. Frere, J. M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tiraby, and S. G. Waley.** 1991. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem J* **276**:269-70.
3. **Andes, D., and W. A. Craig.** 1998. *In vivo* activities of amoxicillin and amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae*: application to breakpoint determinations. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:2375-9.
4. **Anhalt, J.** 1985. Assays for antimicrobial agents in body fluids., p. 1009-1014. *In* B. A. Lennette EH, Hausler WJ Jr, Shadomy and HJ (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, American Society for Microbiology ed, Washington DC.
5. **Barbhaiya, R. H., S. T. Forgue, C. R. Gleason, C. A. Knupp, K. A. Pittman, D. J. Weidler, and R. R. Martin.** 1990. Safety, tolerance, and pharmacokinetic evaluation of cefepime after administration of single intravenous doses. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:1118-22.
6. **Barbhaiya, R. H., C. A. Knupp, M. Pfeffer, and K. A. Pittman.** 1992. Lack of pharmacokinetic interaction between cefepime and amikacin in humans. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:1382-6.
7. **Barroso, H., A. Freitas-Vieira, and A. Duarte.** 1999. Molecular characterization of a ceftazidime-resistant *Morganella morganii* isolate producing a TEM-10 β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:434-5.
8. **Bauernfeind, A., E. Rosenthal, E. Eberlein, M. Holley, and S. Schweighart.** 1993. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase among hospitalized patients. *Infection* **21**:18-22.
9. **Bauernfeind, A., I. Stemmlinger, R. Jungwirth, S. Ernst, and J. M. Casellas.** 1996. Sequences of β -lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:509-13.
10. **Bell, J. M., J. D. Turnidge, and R. N. Jones.** 2003. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in the Asia-Pacific region: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3989-93.
11. **Ben-Hamouda, T., T. Foulon, and K. Ben-Mahrez.** 2004. Involvement of SHV-12 and SHV-2a encoding plasmids in outbreaks of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *Microb Drug Resist* **10**:132-8.
12. **Benson, S. A., and A. Decloux.** 1985. Isolation and characterization of outer membrane permeability mutants in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **161**:361-7.
13. **Bert, F., C. Branger, and N. Lambert-Zechovsky.** 2002. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* **50**:11-8.

14. **Biendo, M., C. Manoliu, G. Laurans, S. Castelain, B. Canarelli, D. Thomas, F. Hamdad, F. Rousseau, and F. Eb.** 2008. Molecular typing and characterization of extended-spectrum TEM, SHV and CTX-M β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Res Microbiol* **159**:590-4.
15. **Blanco, M., M. P. Alonso, M. H. Nicolas-Chanoine, G. Dahbi, A. Mora, J. E. Blanco, C. Lopez, P. Cortes, M. Llagostera, V. Leflon-Guibout, B. Puentes, R. Mamani, A. Herrera, M. A. Coira, F. Garcia-Garrote, J. M. Pita, and J. Blanco.** 2009. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* **63**:1135-41.
16. **Blondeau, J. M.** 1999. Expanded activity and utility of the new fluoroquinolones: a review. *Clin Ther* **21**:3-40; discussion 1-2.
17. **Bonnet, R., J. L. Sampaio, C. Chanal, D. Sirot, C. De Champs, J. L. Viallard, R. Labia, and J. Sirot.** 2000. A novel class A extended-spectrum β -lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3061-8.
18. **Bonnet, R.** 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1-14.
19. **Bonnin, R. A., P. Nordmann, A. Potron, H. Lecuyer, J. R. Zahar, and L. Poirel.** 2011. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:349-54.
20. **Bonomo, R. A., and D. Szabo.** 2006. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* **43 Suppl 2**:S49-56.
21. **Bosnjak, Z., B. Bedenic, A. Mazzariol, N. Jarza-Davila, S. Suto, and S. Kalenic.** 2010. VIM-2 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Zagreb, Croatia. *Scand J Infect Dis* **42**:193-7.
22. **Bouchillon, S. K., B. M. Johnson, D. J. Hoban, J. L. Johnson, M. J. Dowzicky, D. H. Wu, M. A. Visalli, and P. A. Bradford.** 2004. Determining incidence of extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002. *Int J Antimicrob Agents* **24**:119-24.
23. **Bradford, P. A., C. E. Cherubin, V. Idemyor, B. A. Rasmussen, and K. Bush.** 1994. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago hospitals: identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing β -lactamases in a single isolate. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:761-6.
24. **Bradford, P. A., C. Urban, A. Jaiswal, N. Mariano, B. A. Rasmussen, S. J. Projan, J. J. Rahal, and K. Bush.** 1995. SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:899-905.
25. **Bradford, P. A., C. Urban, N. Mariano, S. J. Projan, J. J. Rahal, and K. Bush.** 1997. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:563-9.

26. **Bradford, P. A., S. Bratu, C. Urban, M. Visalli, N. Mariano, D. Landman, J. J. Rahal, S. Brooks, S. Cebular, and J. Quale.** 2004. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* **39**:55-60.
27. **Branger, C., A. L. Lesimple, B. Bruneau, P. Berry, and N. Lambert-Zechovsky.** 1998. Long-term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamase in a university hospital. *J Med Microbiol* **47**:201-9.
28. **Budak, F., P. Nordmann, D. Girlich, and D. Gur.** 2009. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella* isolates in a children's hospital in Ankara--first report of SHV-2a and SHV-9 in *Salmonella* spp. from Turkey. *Turk J Pediatr* **51**:28-34.
29. **Bugnon, D., G. Potel, Y. Q. Xiong, J. Caillon, M. F. Kergueris, P. Le Conte, D. Baron, and H. Drugeon.** 1996. *In vivo* antibacterial effects of simulated human serum profiles of once-daily versus thrice-daily dosing of amikacin in a *Serratia marcescens* endocarditis experimental model. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:1164-9.
30. **Bush, K., S. K. Tanaka, D. P. Bonner, and R. B. Sykes.** 1985. Resistance caused by decreased penetration of β -lactam antibiotics into *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* **27**:555-60.
31. **Bush, K., M. Macielag, and M. Weidner-Wells.** 2004. Taking inventory: antibacterial agents currently at or beyond phase 1. *Curr Opin Microbiol* **7**:466-76.
32. **Bush, K., and G. A. Jacoby.** 2010. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:969-76.
33. **Byl, B., P. Clevenbergh, A. Kentos, F. Jacobs, A. Marchant, J. L. Vincent, and J. P. Thys.** 2001. Ceftazidime- and imipenem-induced endotoxin release during treatment of gram-negative infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **20**:804-7.
34. **Cambau, E., C. Lascols, W. Sougakoff, C. Bebear, R. Bonnet, J. D. Cavallo, L. Gutmann, M. C. Ploy, V. Jarlier, C. J. Soussy, and J. Robert.** 2006. Occurrence of *qnrA*-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005. *Clin Microbiol Infect* **12**:1013-20.
35. **Caron, F., L. Gutmann, A. Bure, B. Pangon, J. M. Vallois, A. Pechinot, and C. Carbon.** 1990. Ceftriaxone-sulbactam combination in rabbit endocarditis caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-broad-spectrum TEM-3 β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:2070-4.
36. **Casin, I., B. Hanau-Bercot, I. Podglajen, H. Vahaboglu, and E. Collatz.** 2003. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *bla*(PER-1)-carrying plasmid pSTII encodes an extended-spectrum aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase of type Ib. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:697-703.
37. **Cassone, M., and A. Giordano.** 2009. Resistance genes traveling the microbial internet: down the drain, up the food chain? *Expert Rev Anti Infect Ther* **7**:637-9.
38. **Castanheira, M., M. A. Toleman, R. N. Jones, F. J. Schmidt, and T. R. Walsh.** 2004. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:4654-61.

39. **Cattoir, V., and P. Nordmann.** 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem* **16**:1028-46.
40. **Celenza, G., C. Pellegrini, M. Caccamo, B. Segatore, G. Amicosante, and M. Perilli.** 2006. Spread of *bla*_{CTX-M-type} and *bla*_{PER-2} β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother* **57**:975-8.
41. **Chanawong, A., F. H. M'Zali, J. Heritage, A. Lulitanond, and P. M. Hawkey.** 2001. Discrimination of SHV β -lactamase genes by restriction site insertion-PCR. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2110-4.
42. **Chang, F. Y., L. K. Siu, C. P. Fung, M. H. Huang, and M. Ho.** 2001. Diversity of SHV and TEM β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: gene evolution in Northern Taiwan and two novel β -lactamases, SHV-25 and SHV-26. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2407-13.
43. **Chia, J. H., C. Chu, L. H. Su, C. H. Chiu, A. J. Kuo, C. F. Sun, and T. L. Wu.** 2005. Development of a multiplex PCR and SHV melting-curve mutation detection system for detection of some SHV and CTX-M β -lactamases of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. *J Clin Microbiol* **43**:4486-91.
44. **Chollet, R., J. Chevalier, C. Bollet, J. M. Pages, and A. Davin-Regli.** 2004. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2518-23.
45. **Cholley, P., D. Hocquet, C. Alauzet, A. Cravoisy-Popovic, D. Talon, N. Aissa, P. Plesiat, and X. Bertrand.** 2010. Hospital outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing extended-spectrum oxacillinase OXA-19. *J Med Microbiol* **59**:866-9.
46. **Chow, J. W., M. J. Fine, D. M. Shlaes, J. P. Quinn, D. C. Hooper, M. P. Johnson, R. Ramphal, M. M. Wagener, D. K. Miyashiro, and V. L. Yu.** 1991. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med* **115**:585-90.
47. **Clermont, O., M. Lavollay, S. Vimont, C. Deschamps, C. Forestier, C. Branger, E. Denamur, and G. Arlet.** 2008. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother* **61**:1024-8.
48. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S15. CLSI, Wayne, PA, USA.
49. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** 2009. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement M100-S19. CLSI, Wayne, PA, USA.
50. **Coovadia, Y. M., A. P. Johnson, R. H. Bhana, G. R. Hutchinson, R. C. George, and I. E. Hafferjee.** 1992. Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal nursery: the importance of maintenance of infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks. *J Hosp Infect* **22**:197-205.
51. **Cornaglia, G., K. Russell, G. Satta, and R. Fontana.** 1995. Relative importances of outer membrane permeability and group 1 β -lactamase as determinants of meropenem and imipenem activities against *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:350-5.

52. **Cornaglia, G., M. L. Riccio, A. Mazzariol, L. Lauretti, R. Fontana, and G. M. Rossolini.** 1999. Appearance of IMP-1 metallo- β -lactamase in Europe. *Lancet* **353**:899-900.
53. **Cornaglia, G., A. Mazzariol, L. Lauretti, G. M. Rossolini, and R. Fontana.** 2000. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo- β -lactamase. *Clin Infect Dis* **31**:1119-25.
54. **Cotton, M. F., E. Wasserman, C. H. Pieper, D. C. Theron, D. van Tubbergh, G. Campbell, F. C. Fang, and J. Barnes.** 2000. Invasive disease due to extended spectrum β -lactamase -producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit: the possible role of cockroaches. *J Hosp Infect* **44**:13-7.
55. **Craig, W.** 1993. Relevance of animal models for clinical treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **12 Suppl 1**:S55-7.
56. **Craig, W. A., J. Redington, and S. C. Ebert.** 1991. Pharmacodynamics of amikacin *in vitro* and in mouse thigh and lung infections. *J Antimicrob Chemother* **27 Suppl C**:29-40.
57. **Craig, W. A.** 1998. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* **26**:1-10; quiz 11-2.
58. **Cudic, M., C. V. Lockatell, D. E. Johnson, and L. Otvos, Jr.** 2003. *In vitro* and *in vivo* activity of an antibacterial peptide analog against uropathogens. *Peptides* **24**:807-20.
59. **D'Agata, E., L. Venkataraman, P. DeGirolami, L. Weigel, M. Samore, and F. Tenover.** 1998. The molecular and clinical epidemiology of *Enterobacteriaceae*-producing extended-spectrum β -lactamase in a tertiary care hospital. *J Infect* **36**:279-85.
60. **Dahmen, S., L. Poirel, W. Mansour, O. Bouallegue, and P. Nordmann.** 2010. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Enterobacteriaceae* from Tunisia. *Clin Microbiol Infect* **16**:1019-23.
61. **Damjanova, I., A. Toth, J. Paszti, A. Bauernfeind, and M. Fuzi.** 2006. Nationwide spread of clonally related CTX-M-15-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **25**:275-8.
62. **Danel, F., L. M. Hall, D. Gur, H. E. Akalin, and D. M. Livermore.** 1995. Transferable production of PER-1 β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **35**:281-94.
63. **Danel, F., L. M. Hall, D. Gur, and D. M. Livermore.** 1995. OXA-14, another extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1881-4.
64. **Danel, F., L. M. Hall, D. Gur, and D. M. Livermore.** 1997. OXA-15, an extended-spectrum variant of OXA-2 β -lactamase, isolated from a *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:785-90.
65. **Danel, F., L. M. Hall, D. Gur, and D. M. Livermore.** 1998. OXA-16, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:3117-22.
66. **Danel, F., L. M. Hall, B. Duke, D. Gur, and D. M. Livermore.** 1999. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1362-6.

67. **Datta, N., and P. Kontomichalou.** 1965. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* **208**:239-41.
68. **Davey, P. G., and M. Barza.** 1987. The inoculum effect with gram-negative bacteria *in vitro* and *in vivo*. *J Antimicrob Chemother* **20**:639-44.
69. **De Champs, C., L. Poirel, R. Bonnet, D. Sirot, C. Chanal, J. Sirot, and P. Nordmann.** 2002. Prospective survey of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3031-4.
70. **De Champs, C., C. Chanal, D. Sirot, R. Baraduc, J. P. Romaszko, R. Bonnet, A. Plaidy, M. Boyer, E. Carroy, M. C. Gbadamassi, S. Lalueque, O. Oules, M. C. Poupert, M. Villemain, and J. Sirot.** 2004. Frequency and diversity of Class A extended-spectrum β -lactamases in hospitals of the Auvergne, France: a 2 year prospective study. *J Antimicrob Chemother* **54**:634-9.
71. **Diancourt, L., V. Passet, J. Verhoef, P. A. Grimont, and S. Brisse.** 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* **43**:4178-82.
72. **Doumith, M., M. J. Ellington, D. M. Livermore, and N. Woodford.** 2009. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother* **63**:659-67.
73. **Du, B., Y. Long, H. Liu, D. Chen, D. Liu, Y. Xu, and X. Xie.** 2002. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. *Intensive Care Med* **28**:1718-23.
74. **Duljasz, W., M. Gniadkowski, S. Sitter, A. Wojna, and C. Jebelean.** 2009. First organisms with acquired metallo- β -lactamases (IMP-13, IMP-22, and VIM-2) reported in Austria. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:2221-2.
75. **Edwards, J. R., S. Williams, and K. Nairn.** 1989. Therapeutic activity of meropenem in experimental infections. *J Antimicrob Chemother* **24 Suppl A**:279-85.
76. **Empel, J., K. Filczak, A. Mrowka, W. Hryniewicz, D. M. Livermore, and M. Gniadkowski.** 2007. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum β -lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. *J Clin Microbiol* **45**:2829-34.
77. **Essack, S. Y.** 2000. Treatment options for extended-spectrum β -lactamase-producers. *FEMS Microbiol Lett* **190**:181-4.
78. **Essack, S. Y., L. M. Hall, D. G. Pillay, M. L. McFadyen, and D. M. Livermore.** 2001. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:88-95.
79. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).** http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. [Online.]
80. **European Antimicrobial Resistance Surveillance and System (AERSS).** 2007. EARSS Annual report 2007.
81. **Ewen, C., and J. H. Hendry.** 1990. The effects of the platinum anti-tumour agents on renal cell kinetics and the response to a second cytotoxic agent. *Cell Tissue Kinet* **23**:61-70.

82. Ewers, C., M. Grobbel, I. Stamm, P. A. Kopp, I. Diehl, T. Semmler, A. Fruth, J. Beutlich, B. Guerra, L. H. Wieler, and S. Guenther. 2010. Emergence of human pandemic O25:H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* among companion animals. *J Antimicrob Chemother* **65**:651-60.
83. Fantin, B., B. Pangon, G. Potel, F. Caron, E. Vallee, J. M. Vallois, J. Mohler, A. Bure, A. Philippon, and C. Carbon. 1990. Activity of sulbactam in combination with ceftriaxone in vitro and in experimental endocarditis caused by *Escherichia coli* producing SHV-2-like β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:581-6.
84. Fernandez, A., M. J. Pereira, J. M. Suarez, M. Poza, M. Trevino, P. Villalon, J. A. Saez-Nieto, B. J. Regueiro, R. Villanueva, and G. Bou. 2011. Emergence in Spain of a Multidrug Resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolate producing SFO-1 extended-spectrum β -lactamase. *J Clin Microbiol*.
85. Fillastre, J. P., and G. Raguenez-Viotte. 1989. Cisplatin nephrotoxicity. *Toxicol Lett* **46**:163-75.
86. Fluckiger, U., C. Segessenmann, and A. U. Gerber. 1991. Integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics of imipenem in a human-adapted mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1905-10.
87. Fournier, J. L., F. Ramisse, A. C. Jacolot, M. Szatanik, O. J. Petitjean, J. M. Alonso, and M. R. Scavizzi. 1996. Assessment of two penicillins plus β -lactamase inhibitors versus cefotaxime in treatment of murine *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:325-30.
88. French, G. L., K. P. Shannon, and N. Simmons. 1996. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 β -lactamase. *J Clin Microbiol* **34**:358-63.
89. Fritsche, T. R., H. S. Sader, M. A. Toleman, T. R. Walsh, and R. N. Jones. 2005. Emerging metallo- β -lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis* **41 Suppl 4**:S276-8.
90. Fu, K. P., S. C. Lafredo, B. Foleno, D. M. Isaacson, J. F. Barrett, A. J. Tobia, and M. E. Rosenthale. 1992. In vitro and in vivo antibacterial activities of levofloxacin (l-ofloxacin), an optically active ofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:860-6.
91. Gaillot, O., C. Maruejols, E. Abachin, F. Lecuru, G. Arlet, M. Simonet, and P. Berche. 1998. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. *J Clin Microbiol* **36**:1357-60.
92. Gavalda, J., P. J. Cardona, B. Almirante, J. A. Capdevila, M. Laguarda, L. Pou, E. Crespo, C. Pigrau, and A. Pahissa. 1996. Treatment of experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis* using once-daily dosing regimen of gentamicin plus simulated profiles of ampicillin in human serum. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:173-8.
93. Gaynes, R., and J. R. Edwards. 2005. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* **41**:848-54.
94. Gazouli, M., M. E. Kaufmann, E. Tzelepi, H. Dimopoulou, O. Paniara, and L. S. Tzouvelekis. 1997. Study of an outbreak of cefoxitin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital. *J Clin Microbiol* **35**:508-10.

95. **Giacomini, K. M., S. M. Roberts, and G. Levy.** 1981. Evaluation of methods for producing renal dysfunction in rats. *J Pharm Sci* **70**:117-21.
96. **Giakkoupi, P., L. S. Tzouvelekis, A. Tsakris, V. Loukova, D. Sofianou, and E. Tzelepi.** 2000. IBC-1, a novel integron-associated class A β -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2247-53.
97. **Giakkoupi, P., A. Xanthaki, M. Kanelopoulou, A. Vlahaki, V. Miriagou, S. Kontou, E. Papafraggas, H. Malamou-Lada, L. S. Tzouvelekis, N. J. Legakis, and A. C. Vatopoulos.** 2003. VIM-1 Metallo- β -lactamase -producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol* **41**:3893-6.
98. **Gibaldi, M., and D. Perrier.** 1982. Pharmacokinetics. Marcel Dekker Inc., New York.
99. **Girlich, D., L. Poirel, A. Schluter, and P. Nordmann.** 2005. TLA-2, a novel Ambler class A expanded-spectrum β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4767-70.
100. **Girlich, D., L. Poirel, and P. Nordmann.** 2010. PER-6, an extended-spectrum β -lactamase from *Aeromonas allosaccharophila*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:1619-22.
101. **Giske, C. G., B. Libisch, C. Colinon, E. Scoulica, L. Pagani, M. Fuzi, G. Kronvall, and G. M. Rossolini.** 2006. Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo- β -lactamase -producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* **44**:4309-15.
102. **Glatz, K., A. Toth, and J. Paszti.** 2007. Emergence of SHV-2a producing *Enterobacter cloacae* in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung* **54**:151-8.
103. **Gould, I. M.** 1999. Do we need fourth-generation cephalosporins? *Clin Microbiol Infect* **5 Suppl 1**:S1-S5.
104. **Guerin, F., C. Henegar, G. Spiridon, O. Launay, D. Salmon-Ceron, and C. Poyart.** 2005. Bacterial prostatitis due to *Pseudomonas aeruginosa* harbouring the *bla* VIM-2 metallo- β -lactamase gene from Saudi Arabia. *J Antimicrob Chemother* **56**:601-2.
105. **Gundes, S., A. E. Arisoy, F. Kolayli, E. Karaali, G. Turker, A. Sanic, E. S. Arisoy, and H. Vahaboglu.** 2005. An outbreak of SHV-5 producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit; meropenem failed to avoid fecal colonization. *New Microbiol* **28**:231-6.
106. **Hall, L. M., D. M. Livermore, D. Gur, M. Akova, and H. E. Akalin.** 1993. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:1637-44.
107. **Hanson, N. D., K. S. Thomson, E. S. Moland, C. C. Sanders, G. Berthold, and R. G. Penn.** 1999. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *J Antimicrob Chemother* **44**:377-80.
108. **Hanson, N. D., E. S. Moland, A. Hossain, S. A. Neville, I. B. Gosbell, and K. S. Thomson.** 2002. Unusual *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* **49**:1011-4.
109. **Hatano, K., Y. Wakai, Y. Watanabe, and Y. Mine.** 1994. Simulation of human plasma levels of β -lactams in mice by multiple dosing and the

- relationship between the therapeutic efficacy and pharmacodynamic parameters. *Chemotherapy* **40**:1-7.
110. **Helfand, M. S., M. A. Totir, M. P. Carey, A. M. Hujer, R. A. Bonomo, and P. R. Carey.** 2003. Following the reactions of mechanism-based inhibitors with β -lactamase by Raman crystallography. *Biochemistry* **42**:13386-92.
 111. **Hernandez, J. R., L. Martinez-Martinez, R. Canton, T. M. Coque, and A. Pascual.** 2005. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:2122-5.
 112. **Hibbert-Rogers, L. C., J. Heritage, D. M. Gascoyne-Binzi, P. M. Hawkey, N. Todd, I. J. Lewis, and C. Bailey.** 1995. Molecular epidemiology of ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* from patients on a paediatric oncology ward. *J Antimicrob Chemother* **36**:65-82.
 113. **Ho, P. L., R. H. Shek, K. H. Chow, R. S. Duan, G. C. Mak, E. L. Lai, W. C. Yam, K. W. Tsang, and W. M. Lai.** 2005. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases among bloodstream isolates of *Enterobacter* spp. in Hong Kong, 2000-2002. *J Antimicrob Chemother* **55**:326-32.
 114. **Hrabak, J., J. Empel, M. Gniadkowski, Z. Halbhuber, K. Rebl, and P. Urbaskova.** 2008. CTX-M-15-producing *Shigella sonnei* strain from a Czech patient who traveled in Asia. *J Clin Microbiol* **46**:2147-8.
 115. **Hujer, A. M., K. M. Hujer, and R. A. Bonomo.** 2001. Mutagenesis of amino acid residues in the SHV-1 β -lactamase: the premier role of Gly238Ser in penicillin and cephalosporin resistance. *Biochim Biophys Acta* **1547**:37-50.
 116. **Hujer, A. M., K. M. Hujer, M. S. Helfand, V. E. Anderson, and R. A. Bonomo.** 2002. Amino acid substitutions at Ambler position Gly238 in the SHV-1 β -lactamase: exploring sequence requirements for resistance to penicillins and cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3971-7.
 117. **Hyatt, J. M., P. S. McKinnon, G. S. Zimmer, and J. J. Schentag.** 1995. The importance of pharmacokinetic/pharmacodynamic surrogate markers to outcome. Focus on antibacterial agents. *Clin Pharmacokinet* **28**:143-60.
 118. **Ikonomidis, A., N. Spanakis, A. Poulou, S. Pournaras, F. Markou, and A. Tsakris.** 2007. Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* carrying VIM-4 metallo- β -lactamase and SHV-2a extended-spectrum β -lactamase in a conjugative plasmid. *Microb Drug Resist* **13**:221-6.
 119. **Imtiaz, U., E. M. Billings, J. R. Knox, and S. Mobashery.** 1994. A structure-based analysis of the inhibition of class A β -lactamases by sulbactam. *Biochemistry* **33**:5728-38.
 120. **Jacoby, G., P. Han, and J. Tran.** 1997. Comparative *in vitro* activities of carbapenem L-749,345 and other antimicrobials against multiresistant gram-negative clinical pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:1830-1.
 121. **Jacoby, G. A., and A. A. Medeiros.** 1991. More extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1697-704.
 122. **Jacoby, G. A., D. M. Mills, and N. Chow.** 2004. Role of β -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3203-6.
 123. **Jan, I. S., P. R. Hsueh, L. J. Teng, S. W. Ho, and K. T. Luh.** 1998. Antimicrobial susceptibility testing for *Klebsiella pneumoniae* isolates

- resistant to extended-spectrum β -lactam antibiotics. J Formos Med Assoc **97**:661-6.
124. **Jeong, S. H., I. K. Bae, S. B. Kwon, K. Lee, D. Yong, G. J. Woo, J. H. Lee, H. I. Jung, S. J. Jang, K. H. Sung, and S. H. Lee.** 2005. Investigation of a nosocomial outbreak of *Acinetobacter baumannii* producing PER-1 extended-spectrum β -lactamase in an intensive care unit. J Hosp Infect **59**:242-8.
 125. **Jett, B. D., D. J. Ritchie, R. Reichley, T. C. Bailey, and D. F. Sahm.** 1995. In vitro activities of various β -lactam antimicrobial agents against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* resistant to oxyimino cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother **39**:1187-90.
 126. **Juan, C., X. Mulet, L. Zamorano, S. Alberti, J. L. Perez, and A. Oliver.** 2009. Detection of the novel extended-spectrum β -lactamase OXA-161 from a plasmid-located integron in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Spain. Antimicrob Agents Chemother **53**:5288-90.
 127. **Kado, C. I., and S. T. Liu.** 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol **145**:1365-73.
 128. **Kalai Blagui, S., W. Achour, M. S. Abbassi, M. Bejaoui, A. Abdeladhim, and A. Ben Hassen.** 2007. Nosocomial outbreak of OXA-18-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Tunisia. Clin Microbiol Infect **13**:794-800.
 129. **Kanayama, A., T. Iyoda, K. Matsuzaki, T. Saika, F. Ikeda, Y. Ishii, K. Yamaguchi, and I. Kobayashi.** 2010. Rapidly spreading CTX-M-type β -lactamase -producing *Proteus mirabilis* in Japan. Int J Antimicrob Agents **36**:340-2.
 130. **Kang, C. I., S. H. Kim, D. M. Kim, W. B. Park, K. D. Lee, H. B. Kim, M. D. Oh, E. C. Kim, and K. W. Choe.** 2004. Risk factors for and clinical outcomes of bloodstream infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Infect Control Hosp Epidemiol **25**:860-7.
 131. **Karah, N., L. Poirel, S. Bengtsson, M. Sundqvist, G. Kahlmeter, P. Nordmann, A. Sundsfjord, and O. Samuelsen.** 2010. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* from Norway and Sweden. Diagn Microbiol Infect Dis **66**:425-31.
 132. **Karas, J. A., D. G. Pillay, D. Muckart, and A. W. Sturm.** 1996. Treatment failure due to extended spectrum β -lactamase. J Antimicrob Chemother **37**:203-4.
 133. **Kartali, G., E. Tzelepi, S. Pournaras, C. Kontopoulou, F. Kontos, D. Sofianou, A. N. Maniatis, and A. Tsakris.** 2002. Outbreak of infections caused by *Enterobacter cloacae* producing the integron-associated β -lactamase IBC-1 in a neonatal intensive care unit of a Greek hospital. Antimicrob Agents Chemother **46**:1577-80.
 134. **Kasap, M., K. Fashae, S. Torol, F. Kolayli, F. Budak, and H. Vahaboglu.** 2010. Characterization of ESBL (SHV-12) producing clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* from a tertiary care hospital in Nigeria. Ann Clin Microbiol Antimicrob **9**:1.
 135. **Kaye, K. S., S. Cosgrove, A. Harris, G. M. Eliopoulos, and Y. Carmeli.** 2001. Risk factors for emergence of resistance to broad-spectrum

- cephalosporins among *Enterobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother **45**:2628-30.
136. **Kim, Y. K., H. Pai, H. J. Lee, S. E. Park, E. H. Choi, J. Kim, J. H. Kim, and E. C. Kim.** 2002. Bloodstream infections by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. Antimicrob Agents Chemother **46**:1481-91.
 137. **Klesel, N., K. H. Geweniger, P. Koletzki, D. Isert, M. Limbert, A. Markus, G. Riess, H. Schramm, G. Seibert, P. Iyer, and et al.** 1995. Activity of levofloxacin, ofloxacin, D-ofloxacin and ciprofloxacin against systemic and respiratory tract infections in laboratory animals. Drugs **49 Suppl 2**:211-4.
 138. **Kliebe, C., B. A. Nies, J. F. Meyer, R. M. Tolxdorff-Neutzling, and B. Wiedemann.** 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother **28**:302-7.
 139. **Knothe, H., P. Shah, V. Krcmery, M. Antal, and S. Mitsuhashi.** 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection **11**:315-7.
 140. **Kolayli, F., G. Gacar, A. Karadenizli, A. Sanic, and H. Vahaboglu.** 2005. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. FEMS Microbiol Lett **249**:241-5.
 141. **Kotsakis, S. D., C. C. Papagiannitsis, E. Tzelepi, N. J. Legakis, V. Miriagou, and L. S. Tzouvelekis.** 2010. GES-13, a β -lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **54**:1331-3.
 142. **Kragol, G., S. Lovas, G. Varadi, B. A. Condie, R. Hoffmann, and L. Otvos, Jr.** 2001. The antibacterial peptide pyrrocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. Biochemistry **40**:3016-26.
 143. **Kruger, T., D. Szabo, K. H. Keddy, K. Deeley, J. W. Marsh, A. M. Hujer, R. A. Bonomo, and D. L. Paterson.** 2004. Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. Antimicrob Agents Chemother **48**:4263-70.
 144. **Kuzin, A. P., M. Nukaga, Y. Nukaga, A. M. Hujer, R. A. Bonomo, and J. R. Knox.** 1999. Structure of the SHV-1 β -lactamase. Biochemistry **38**:5720-7.
 145. **Lau, S. H., M. E. Kaufmann, D. M. Livermore, N. Woodford, G. A. Willshaw, T. Cheasty, K. Stamper, S. Reddy, J. Cheesbrough, F. J. Bolton, A. J. Fox, and M. Upton.** 2008. UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 β -lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. J Antimicrob Chemother **62**:1241-4.
 146. **Lauretti, L., M. L. Riccio, A. Mazzariol, G. Cornaglia, G. Amicosante, R. Fontana, and G. M. Rossolini.** 1999. Cloning and characterization of *bla_{VM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother **43**:1584-90.
 147. **Leavitt, A., S. Navon-Venezia, I. Chmelnitsky, M. J. Schwaber, and Y. Carmeli.** 2007. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant

- Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. Antimicrob Agents Chemother **51**:3026-9.
148. **Lebessi, E., H. Dellagrammaticas, P. T. Tassios, L. S. Tzouveleakis, S. Ioannidou, M. Foustoukou, and N. J. Legakis.** 2002. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit in the high-prevalence area of Athens, Greece. J Clin Microbiol **40**:799-804.
 149. **Lee, E. H., E. Collatz, J. Trias, and L. Gutmann.** 1992. Diffusion of β -lactam antibiotics into proteoliposomes reconstituted with outer membranes of isogenic imipenem-susceptible and -resistant strains of *Enterobacter cloacae*. J Gen Microbiol **138**:2347-51.
 150. **Lee, K., J. H. Yum, D. Yong, H. M. Lee, H. D. Kim, J. D. Docquier, G. M. Rossolini, and Y. Chong.** 2005. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. Antimicrob Agents Chemother **49**:4485-91.
 151. **Leleu, G., M. D. Kitzis, J. M. Vallois, L. Gutmann, and J. M. Decazes.** 1994. Different ratios of the piperacillin-tazobactam combination for treatment of experimental meningitis due to *Klebsiella pneumoniae* producing the TEM-3 extended-spectrum β -lactamase. Antimicrob Agents Chemother **38**:195-9.
 152. **Lettieri, J. T., M. C. Rogge, L. Kaiser, R. M. Echols, and A. H. Heller.** 1992. Pharmacokinetic profiles of ciprofloxacin after single intravenous and oral doses. Antimicrob Agents Chemother **36**:993-6.
 153. **Levison, M. E., Y. V. Mailapur, S. K. Pradhan, G. A. Jacoby, P. Adams, C. L. Emery, P. L. May, and P. G. Pitsakis.** 2002. Regional occurrence of plasmid-mediated SHV-7, an extended-spectrum β -lactamase, in *Enterobacter cloacae* in Philadelphia Teaching Hospitals. Clin Infect Dis **35**:1551-4.
 154. **Libisch, B., M. Gacs, K. Csiszar, M. Muzslay, L. Rokusz, and M. Fuzi.** 2004. Isolation of an integron-borne *bla*_{VIM-4} type metallo- β -lactamase gene from a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Hungary. Antimicrob Agents Chemother **48**:3576-8.
 155. **Libisch, B., M. Muzslay, M. Gacs, J. Minarovits, M. Knausz, J. Watine, G. Ternak, E. Kenez, I. Kustos, L. Rokusz, K. Szeles, B. Balogh, and M. Fuzi.** 2006. Molecular epidemiology of VIM-4 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas sp.* isolates in Hungary. Antimicrob Agents Chemother **50**:4220-3.
 156. **Libisch, B., C. G. Giske, B. Kovacs, T. G. Toth, and M. Fuzi.** 2008. Identification of the first VIM metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. J Clin Microbiol **46**:1878-80.
 157. **Libisch, B., J. Watine, B. Balogh, M. Gacs, M. Muzslay, G. Szabo, and M. Fuzi.** 2008. Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary. Res Microbiol **159**:162-8.
 158. **Lin, S., M. Thomas, D. M. Shlaes, S. D. Rudin, J. R. Knox, V. Anderson, and R. A. Bonomo.** 1998. Kinetic analysis of an inhibitor-resistant variant of the OHIO-1 β -lactamase, an SHV-family class A enzyme. Biochem J **333** (Pt 2):395-400.

159. **Lin, S., M. Thomas, S. Mark, V. Anderson, and R. A. Bonomo.** 1999. OHIO-1 β -lactamase mutants: the Arg244Ser mutant and resistance to β -lactams and β -lactamase inhibitors. *Biochim Biophys Acta* **1432**:125-36.
160. **Linde, H. J., F. Notka, C. Irtenkauf, J. Decker, J. Wild, H. H. Niller, P. Heisig, and N. Lehn.** 2002. Increase in MICs of ciprofloxacin *in vivo* in two closely related clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* **49**:625-30.
161. **Litake, G. M., V. S. Ghole, K. B. Niphadkar, and S. G. Joshi.** 2009. PER-1-type extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from India. *Int J Antimicrob Agents* **34**:388-9.
162. **Liu, W., X. Liu, J. Liao, Y. Zhang, and X. Liang.** 2010. Identification of *bla*_{OXA-128} and *bla*_{OXA-129}, two novel OXA-type extended-spectrum- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*, in Hunan Province, China. *J Basic Microbiol* **50 Suppl 1**:S116-9.
163. **Livak, K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**:402-8.
164. **Livermore, D. M.** 1995. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**:557-84.
165. **M'Zali, F. H., D. M. Gascoyne-Binzi, J. Heritage, and P. M. Hawkey.** 1996. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV β -lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). *J Antimicrob Chemother* **37**:797-802.
166. **M'Zali, F. H., J. Heritage, D. M. Gascoyne-Binzi, A. M. Snelling, and P. M. Hawkey.** 1998. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum β -lactamase and to identify different SHV genes within the same strain. *J Antimicrob Chemother* **41**:123-5.
167. **Ma, L., F. Y. Chang, C. P. Fung, T. L. Chen, J. C. Lin, P. L. Lu, L. Y. Huang, J. C. Chang, and L. K. Siu.** 2005. Variety of TEM-, SHV-, and CTX-M-type beta- β -lactamases present in recent clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* from Taiwan. *Microb Drug Resist* **11**:31-9.
168. **Mahmood, I., and D. H. Waters.** 1994. A comparative study of uranyl nitrate and cisplatin-induced renal failure in rat. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **19**:327-36.
169. **Mallea, M., J. Chevalier, C. Bornet, A. Eyraud, A. Davin-Regli, C. Bollet, and J. M. Pages.** 1998. Porin alteration and active efflux: two *in vivo* drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology* **144** (Pt 11):3003-9.
170. **Mammeri, H., G. Laurans, M. Eveillard, S. Castelain, and F. Eb.** 2001. Coexistence of SHV-4- and TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* strains before a large outbreak of TEM-24-producing strains in a French hospital. *J Clin Microbiol* **39**:2184-90.
171. **Mansour, W., S. Dahmen, L. Poirel, K. Charfi, D. Bettaieb, N. Boujaafar, and O. Bouallegue.** 2009. Emergence of SHV-2a extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital in Tunisia. *Microb Drug Resist* **15**:295-301.
172. **Marchandin, H., C. Carriere, D. Sirot, H. J. Pierre, and H. Darbas.** 1999. TEM-24 produced by four different species of *Enterobacteriaceae*,

- including *Providencia rettgeri*, in a single patient. Antimicrob Agents Chemother **43**:2069-73.
173. **Martinez-Martinez, L., S. Hernandez-Alles, S. Alberti, J. M. Tomas, V. J. Benedi, and G. A. Jacoby.** 1996. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother **40**:342-8.
 174. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G. A. Jacoby.** 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet **351**:797-9.
 175. **Martinez-Martinez, L., A. Pascual, S. Hernandez-Alles, D. Alvarez-Diaz, A. I. Suarez, J. Tran, V. J. Benedi, and G. A. Jacoby.** 1999. Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **43**:1669-73.
 176. **Matsumoto, Y., and M. Inoue.** 1999. Characterization of SFO-1, a plasmid-mediated inducible class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother **43**:307-13.
 177. **Medeiros, A. A.** 1984. β -lactamases. Br Med Bull **40**:18-27.
 178. **Mentec, H., J. M. Vallois, A. Bure, A. Saleh-Mghir, F. Jehl, and C. Carbon.** 1992. Piperacillin, tazobactam, and gentamicin alone or combined in an endocarditis model of infection by a TEM-3-producing strain of *Klebsiella pneumoniae* or its susceptible variant. Antimicrob Agents Chemother **36**:1883-9.
 179. **Meyer, K. S., C. Urban, J. A. Eagan, B. J. Berger, and J. J. Rahal.** 1993. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. Ann Intern Med **119**:353-8.
 180. **Mimoz, O., A. Jacolot, S. Leotard, N. Hidri, K. Samii, P. Nordmann, and O. Petitjean.** 1998. Efficacies of cefepime, ceftazidime, and imipenem alone or in combination with amikacin in rats with experimental pneumonia due to ceftazidime-susceptible or -resistant *Enterobacter cloacae* strains. Antimicrob Agents Chemother **42**:3304-8.
 181. **Miro, E., B. Mirelis, F. Navarro, A. Rivera, R. J. Mesa, M. C. Roig, L. Gomez, and P. Coll.** 2005. Surveillance of extended-spectrum β -lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain. J Antimicrob Chemother **56**:1152-5.
 182. **Mirsalehian, A., M. Feizabadi, F. A. Nakhjavani, F. Jabalameli, H. Goli, and N. Kalantari.** 2010. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. Burns **36**:70-4.
 183. **Mohamed Al-Agamy, M. H., M. S. El-Din Ashour, and I. Wiegand.** 2006. First description of CTX-M β -lactamase-producing clinical *Escherichia coli* isolates from Egypt. Int J Antimicrob Agents **27**:545-8.
 184. **Morosini, M. I., A. Valverde, M. Garcia-Castillo, P. Nordmann, and R. Canton.** 2010. Persistent isolation of Salmonella Concord harbouring CTX-M-15, SHV-12 and QnrA1 in an asymptomatic adopted Ethiopian child in Spain also colonized with CTX-M-14- and QnrB-producing *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother **65**:1545-6.
 185. **Munday, C. J., G. M. Whitehead, N. J. Todd, M. Campbell, and P. M. Hawkey.** 2004. Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum β -lactamases in York, UK. J Antimicrob Chemother **54**:628-33.

186. **Munday, C. J., J. Xiong, C. Li, D. Shen, and P. M. Hawkey.** 2004. Dissemination of CTX-M type β -lactamases in *Enterobacteriaceae* isolates in the People's Republic of China. *Int J Antimicrob Agents* **23**:175-80.
187. **Naas, T., L. Philippon, L. Poirel, E. Ronco, and P. Nordmann.** 1999. An SHV-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:1281-4.
188. **Naas, T., P. Bogaerts, C. Bauraing, Y. Degheldre, Y. Glupczynski, and P. Nordmann.** 2006. Emergence of PER and VEB extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. *J Antimicrob Chemother* **58**:178-82.
189. **Naas, T., P. Nordmann, and A. Heidt.** 2007. Inter-country transfer of PER-1 extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* from Romania. *Int J Antimicrob Agents* **29**:226-8.
190. **Nagano, N., Y. Nagano, C. Cordevant, N. Shibata, and Y. Arakawa.** 2004. Nosocomial transmission of CTX-M-2 β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. *J Clin Microbiol* **42**:3978-84.
191. **Nagy, E., Z. Pragai, Z. Koczian, E. Hajdu, and E. Fodor.** 1998. Investigation of the presence of different broad-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Acta Microbiol Immunol Hung* **45**:433-46.
192. **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).** 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Document M7-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, USA.
193. **Naumovski, L., J. P. Quinn, D. Miyashiro, M. Patel, K. Bush, S. B. Singer, D. Graves, T. Palzkill, and A. M. Arvin.** 1992. Outbreak of ceftazidime resistance due to a novel extended-spectrum β -lactamase in isolates from cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother* **36**:1991-6.
194. **Navon-Venezia, S., A. Leavitt, and Y. Carmeli.** 2007. High tigecycline resistance in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* **59**:772-4.
195. **Nicolas-Chanoine, M. H., J. Blanco, V. Leflon-Guibout, R. Demarty, M. P. Alonso, M. M. Canica, Y. J. Park, J. P. Lavigne, J. Pitout, and J. R. Johnson.** 2008. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* **61**:273-81.
196. **Nightingale, C. H., E. M. Grant, and R. Quintiliani.** 2000. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of levofloxacin. *Chemotherapy* **46 Suppl 1**:6-14.
197. **Nordmann, P., E. Ronco, T. Naas, C. Duport, Y. Michel-Briand, and R. Labia.** 1993. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:962-9.
198. **Nordmann, P., and T. Naas.** 1994. Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:104-14.
199. **Normark, S., T. Grundstrom, and S. Bergstrom.** 1980. Susceptibility to penicillins and cephalosporins in β -lactamase producing strains of *E. coli* and relative amount of β -lactamase produced from these strains. *Scand J Infect Dis Suppl* **25**:23-9.

200. **Noto, P. B., G. Abbadessa, M. Cassone, G. D. Mateo, A. Agelan, J. D. Wade, D. Szabo, B. Kocsis, K. Nagy, F. Rozgonyi, and L. Otvos, Jr.** 2008. Alternative stabilities of a proline-rich antibacterial peptide in vitro and in vivo. *Protein Sci* **17**:1249-55.
201. **O'Donnell, J. A., and S. P. Gelone.** 2000. Fluoroquinolones. *Infect Dis Clin North Am* **14**:489-513, xi.
202. **Okamoto, M. P., R. K. Nakahiro, A. Chin, and A. Bedikian.** 1993. Cefepime clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* **25**:88-102.
203. **Otvos, L., Jr.** 2005. Antibacterial peptides and proteins with multiple cellular targets. *J Pept Sci* **11**:697-706.
204. **Otvos, L., Jr., J. D. Wade, F. Lin, B. A. Condie, J. Hanrieder, and R. Hoffmann.** 2005. Designer antibacterial peptides kill fluoroquinolone-resistant clinical isolates. *J Med Chem* **48**:5349-59.
205. **Otvos, L., Jr., V. de Olivier Inacio, J. D. Wade, and P. Cudic.** 2006. Prior antibacterial peptide-mediated inhibition of protein folding in bacteria mutes resistance enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3146-9.
206. **Pagani, L., M. Perilli, R. Migliavacca, F. Luzzaro, and G. Amicosante.** 2000. Extended-spectrum TEM- and SHV-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains causing outbreaks in intensive care units in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**:765-72.
207. **Pagani, L., E. Mantengoli, R. Migliavacca, E. Nucleo, S. Pollini, M. Spalla, R. Daturi, E. Romero, and G. M. Rossolini.** 2004. Multifocal detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum β -lactamase in Northern Italy. *J Clin Microbiol* **42**:2523-9.
208. **Pages, J. M., M. Masi, and J. Barbe.** 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol Med* **11**:382-9.
209. **Pai, H., E. H. Choi, H. J. Lee, J. Y. Hong, and G. A. Jacoby.** 2001. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum β -lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol* **39**:3747-9.
210. **Pai, H., J. Y. Hong, J. H. Byeon, Y. K. Kim, and H. J. Lee.** 2004. High prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing strains among blood isolates of *Enterobacter* spp. collected in a tertiary hospital during an 8-year period and their antimicrobial susceptibility patterns. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3159-61.
211. **Park, C. H., A. Robicsek, G. A. Jacoby, D. Sahm, and D. C. Hooper.** 2006. Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3953-5.
212. **Park, Y. J., S. Y. Park, E. J. Oh, J. J. Park, K. Y. Lee, G. J. Woo, and K. Lee.** 2005. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases among chromosomal AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens* in Korea and investigation of screening criteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* **51**:265-9.
213. **Park, Y. J., J. K. Yu, S. Lee, E. J. Oh, and G. J. Woo.** 2007. Prevalence and diversity of *qnr* alleles in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *J Antimicrob Chemother* **60**:868-71.
214. **Pasteran, F., M. Rapoport, A. Petroni, D. Faccione, A. Corso, M. Galas, M. Vazquez, A. Procopio, M. Tokumoto, and V. Cagnoni.** 2006.

- Emergence of PER-2 and VEB-1a in *Acinetobacter baumannii* Strains in the Americas. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3222-4.
215. **Paterson, D. L., L. Mulazimoglu, J. M. Casellas, W. C. Ko, H. Goossens, A. Von Gottberg, S. Mohapatra, G. M. Trenholme, K. P. Klugman, J. G. McCormack, and V. L. Yu.** 2000. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin Infect Dis* **30**:473-8.
 216. **Paterson, D. L., W. C. Ko, A. Von Gottberg, J. M. Casellas, L. Mulazimoglu, K. P. Klugman, R. A. Bonomo, L. B. Rice, J. G. McCormack, and V. L. Yu.** 2001. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* **39**:2206-12.
 217. **Paterson, D. L., L. B. Rice, and R. A. Bonomo.** 2001. Rapid method of extraction and analysis of extended-spectrum β -lactamases from clinical strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* **7**:709-11.
 218. **Paterson, D. L., K. M. Hujer, A. M. Hujer, B. Yeiser, M. D. Bonomo, L. B. Rice, and R. A. Bonomo.** 2003. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3554-60.
 219. **Paterson, D. L., F. Rossi, F. Baquero, P. R. Hsueh, G. L. Woods, V. Satishchandran, T. A. Snyder, C. M. Harvey, H. Teppler, M. J. Dinubile, and J. W. Chow.** 2005. *In vitro* susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *J Antimicrob Chemother* **55**:965-73.
 220. **Pena, C., M. Pujol, C. Ardanuy, A. Ricart, R. Pallares, J. Linares, J. Ariza, and F. Gudiol.** 1998. Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:53-8.
 221. **Perilli, M., B. Segatore, M. R. de Massis, M. L. Riccio, C. Bianchi, A. Zollo, G. M. Rossolini, and G. Amicosante.** 2000. TEM-72, a new extended-spectrum β -lactamase detected in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2537-9.
 222. **Philippon, A., R. Labia, and G. Jacoby.** 1989. Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **33**:1131-6.
 223. **Philippon, L. N., T. Naas, A. T. Bouthors, V. Barakett, and P. Nordmann.** 1997. OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2188-95.
 224. **Pillay, T., D. G. Pillay, M. Adhikari, and A. W. Sturm.** 1998. Piperacillin/tazobactam in the treatment of *Klebsiella pneumoniae* infections in neonates. *Am J Perinatol* **15**:47-51.
 225. **Pitout, J. D., B. L. Chow, D. B. Gregson, K. B. Laupland, S. Elsayed, and D. L. Church.** 2007. Molecular epidemiology of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. *J Clin Microbiol* **45**:294-8.

226. **Poirel, L., T. Naas, M. Guibert, E. B. Chaibi, R. Labia, and P. Nordmann.** 1999. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* **43**:573-81.
227. **Poirel, L., I. Le Thomas, T. Naas, A. Karim, and P. Nordmann.** 2000. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:622-32.
228. **Poirel, L., D. Girlich, T. Naas, and P. Nordmann.** 2001. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:447-53.
229. **Poirel, L., P. Gerome, C. De Champs, J. Stephanazzi, T. Naas, and P. Nordmann.** 2002. Integron-located oxa-32 gene cassette encoding an extended-spectrum variant of OXA-2 β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:566-9.
230. **Poirel, L., E. Lebessi, M. Castro, C. Fevre, M. Foustoukou, and P. Nordmann.** 2004. Nosocomial outbreak of extended-spectrum β -lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:2277-9.
231. **Poirel, L., L. Brinas, A. Verlinde, L. Ide, and P. Nordmann.** 2005. BEL-1, a novel clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In120 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:3743-8.
232. **Poirel, L., C. Leviandier, and P. Nordmann.** 2006. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3992-7.
233. **Poirel, L., P. Nordmann, C. De Champs, and C. Eloy.** 2007. Nosocomial spread of QnrA-mediated quinolone resistance in *Enterobacter sakazakii*. *Int J Antimicrob Agents* **29**:223-4.
234. **Poirel, L., J. D. Docquier, F. De Luca, A. Verlinde, L. Ide, G. M. Rossolini, and P. Nordmann.** 2010. BEL-2, an extended-spectrum β -lactamase with increased activity toward expanded-spectrum cephalosporins in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:533-5.
235. **Poirel, L., J. M. Rodriguez-Martinez, N. Al Naiemi, Y. J. Debets-Ossenkopp, and P. Nordmann.** 2010. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:2420-4.
236. **Potron, A., L. Poirel, K. Elhag, F. Al Yaqoubi, and P. Nordmann.** 2009. VEB-6 extended-spectrum β -lactamase-producing *Proteus mirabilis* from Sultanate of Oman. *Int J Antimicrob Agents* **34**:493-4.
237. **Pournaras, S., A. Tsakris, M. Maniati, L. S. Tzouveleakis, and A. N. Maniatis.** 2002. Novel variant bla_{VIM-4} of the metallo- β -lactamase gene bla_{VIM-1} in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:4026-8.
238. **Pragai, Z., Z. Koczian, and E. Nagy.** 1998. Characterization of the extended-spectrum β -lactamases and determination of the antibiotic susceptibilities of *Klebsiella pneumoniae* isolates in Hungary. *J Antimicrob Chemother* **42**:401-3.

239. **Prodinger, W. M., M. Fille, A. Bauernfeind, I. Stemplinger, S. Amann, B. Pfausler, C. Lass-Flörl, and M. P. Dierich.** 1996. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase: parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. *J Clin Microbiol* **34**:564-8.
240. **Quale, J. M., D. Landman, P. A. Bradford, M. Visalli, J. Ravishankar, C. Flores, D. Mayorga, K. Vangala, and A. Adedeji.** 2002. Molecular epidemiology of a citywide outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection. *Clin Infect Dis* **35**:834-41.
241. **Queenan, A. M., and K. Bush.** 2007. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* **20**:440-58, table of contents.
242. **Quinn, J. P.** 1998. Clinical strategies for serious infection: a North American perspective. *Diagn Microbiol Infect Dis* **31**:389-95.
243. **Randegger, C. C., A. Keller, M. Irla, A. Wada, and H. Hachler.** 2000. Contribution of natural amino acid substitutions in SHV extended-spectrum β -lactamases to resistance against various β -lactams. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:2759-63.
244. **Randegger, C. C., and H. Hachler.** 2001. Real-time PCR and melting curve analysis for reliable and rapid detection of SHV extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1730-6.
245. **Ribot, E. M., R. K. Wierzbna, F. J. Angulo, and T. J. Barrett.** 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, and 1995. *Emerg Infect Dis* **8**:387-91.
246. **Rice, L. B., S. H. Willey, G. A. Papanicolaou, A. A. Medeiros, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., and G. A. Jacoby.** 1990. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum β -lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:2193-9.
247. **Rice, L. B., J. D. Yao, K. Klimm, G. M. Eliopoulos, and R. C. Moellering, Jr.** 1991. Efficacy of different beta-lactams against an extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain in the rat intra-abdominal abscess model. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:1243-4.
248. **Rice, L. B., L. L. Carias, and D. M. Shlaes.** 1994. *In vivo* efficacies of beta-lactam- β -lactamase inhibitor combinations against a TEM-26-producing strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **38**:2663-4.
249. **Robicsek, A., G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* **6**:629-40.
250. **Robicsek, A., J. Strahilevitz, D. F. Sahm, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2006. *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2872-4.
251. **Rodriguez-Martinez, J. M., P. Nordmann, N. Fortineau, and L. Poirel.** 2010. VIM-19, a metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:471-6.
252. **Rodriguez, M. M., P. Power, M. Radice, C. Vay, A. Famiglietti, M. Galleni, J. A. Ayala, and G. Gutkind.** 2004. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:4895-7.

253. **Rogers, B. A., H. E. Sidjabat, and D. L. Paterson.** 2011. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother* **66**:1-14.
254. **Ruzin, A., M. A. Visalli, D. Keeney, and P. A. Bradford.** 2005. Influence of transcriptional activator RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1017-22.
255. **Salabi, A. E., M. A. Toleman, J. Weeks, T. Bruderer, R. Frei, and T. R. Walsh.** 2010. First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:582.
256. **Sanbongi, Y., A. Shimizu, T. Suzuki, H. Nagaso, T. Ida, K. Maebashi, and N. Gotoh.** 2009. Classification of OprD sequence and correlation with antimicrobial activity of carbapenem agents in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates collected in Japan. *Microbiol Immunol* **53**:361-7.
257. **Sanders, C. C., W. E. Sanders, Jr., and R. V. Goering.** 1982. *In vitro* antagonism of beta-lactam antibiotics by cefoxitin. *Antimicrob Agents Chemother* **21**:968-75.
258. **Sanders, C. C., and W. E. Sanders, Jr.** 1992. β -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* **15**:824-39.
259. **Segatore, B., D. Setacci, M. Perilli, L. Franchino, N. Franceschini, A. Agnifili, G. M. Rossolini, and G. Amicosante.** 2004. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing complex β -lactamase patterns including extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* **23**:480-6.
260. **Sevall, J. S.** 2001. Rapid allelic discrimination from real-time DNA amplification. *Methods* **25**:452-5.
261. **Shannon, K., K. Fung, P. Stapleton, R. Anthony, E. Power, and G. French.** 1998. A hospital outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* investigated by RAPD typing and analysis of the genetics and mechanisms of resistance. *J Hosp Infect* **39**:291-300.
262. **Silva, J., C. Aguilar, M. A. Estrada, G. Echaniz, N. Carnalla, A. Soto, and F. J. Lopez-Antunano.** 1998. Susceptibility to new beta-lactams of enterobacterial extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producers and penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Mexico. *J Chemother* **10**:102-7.
263. **Silva, J., C. Aguilar, G. Ayala, M. A. Estrada, U. Garza-Ramos, R. Lara-Lemus, and L. Ledezma.** 2000. TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:997-1003.
264. **Siroto, D., J. Siroto, R. Labia, A. Morand, P. Courvalin, A. Darfeuille-Michaud, R. Perroux, and R. Cluzel.** 1987. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* **20**:323-34.
265. **Sougakoff, W., S. Goussard, G. Gerbaud, and P. Courvalin.** 1988. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis* **10**:879-84.
266. **Souli, M., F. V. Kontopidou, E. Papadomichelakis, I. Galani, A. Armaganidis, and H. Giamarellou.** 2008. Clinical experience of serious

- infections caused by *Enterobacteriaceae* producing VIM-1 metallo- β -lactamase in a Greek University Hospital. Clin Infect Dis **46**:847-54.
267. **Stock, I., T. Gruger, and B. Wiedemann.** 2001. Natural antibiotic susceptibility of strains of the *Enterobacter cloacae* complex. Int J Antimicrob Agents **18**:537-45.
 268. **Sykes, R. B., and M. Matthew.** 1979. Detection, assay and immunology of β -lactamases, p. 17–49, β -lactamases. Academic Press, Ltd., London.
 269. **Szabo, D., Z. Filetoth, J. Szentandrassy, M. Nemedi, E. Toth, C. Jeney, G. Kispal, and F. Rozgonyi.** 1999. Molecular epidemiology of a cluster of cases due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase in the premature intensive care unit of a Hungarian hospital. J Clin Microbiol **37**:4167-9.
 270. **Tansawai, U., N. Boonkerd, P. Polwichai, S. Dejsirilert, and P. R. Niumsup.** 2009. SHV-12 extended spectrum β -lactamase associated with high-level ceftazidime resistance in *Enterobacter cloacae* isolated from Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health **40**:148-54.
 271. **Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, and B. Swaminathan.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol **33**:2233-9.
 272. **Tenover, F. C., S. L. Emery, C. A. Spiegel, P. A. Bradford, S. Eells, A. Endimiani, R. A. Bonomo, and J. E. McGowan, Jr.** 2009. Identification of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, and *Proteus* species can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. J Clin Microbiol **47**:294-9.
 273. **Tessier, F., C. Arpin, A. Allery, and C. Quentin.** 1998. Molecular characterization of a TEM-21 β -lactamase in a clinical isolate of *Morganella morganii*. Antimicrob Agents Chemother **42**:2125-7.
 274. **Thauvin-Eliopoulos, C., M. F. Tripodi, R. C. Moellering, Jr., and G. M. Eliopoulos.** 1997. Efficacies of piperacillin-tazobactam and cefepime in rats with experimental intra-abdominal abscesses due to an extended-spectrum β -lactamase-producing strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **41**:1053-7.
 275. **Toleman, M. A., A. M. Simm, T. A. Murphy, A. C. Gales, D. J. Biedenbach, R. N. Jones, and T. R. Walsh.** 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother **50**:673-9.
 276. **Toleman, M. A., K. Rolston, R. N. Jones, and T. R. Walsh.** 2003. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **47**:2859-63.
 277. **Toth, A., M. Gacs, K. Marialigeti, G. Cech, and M. Fuzi.** 2005. Occurrence and regional distribution of SHV-type extended-spectrum β -lactamases in Hungary. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **24**:284-7.
 278. **Toth, A., I. Damjanova, E. Puskas, L. Janvari, M. Farkas, A. Dobak, K. Borocz, and J. Paszti.** 2010. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **29**:765-9.

279. Towne, T. G., J. S. Lewis, 2nd, M. Herrera, B. Wickes, and J. H. Jorgensen. 2010. Detection of SHV-type extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacter* isolates. *J Clin Microbiol* **48**:298-9.
280. Turnidge, J. D., G. R. Nimmo, and G. Francis. 1996. Evolution of resistance in *Staphylococcus aureus* in Australian teaching hospitals. Australian Group on Antimicrobial Resistance (AGAR). *Med J Aust* **164**:68-71.
281. Uchida, Y., T. Mochimaru, Y. Morokuma, M. Kiyosuke, M. Fujise, F. Eto, Y. Harada, M. Kadowaki, N. Shimono, and D. Kang. 2010. Geographic distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* strains in Asia. *Int J Antimicrob Agents* **35**:387-91.
282. Uemura, S., S. Yokota, H. Mizuno, E. Sakawaki, K. Sawamoto, K. Maekawa, K. Tanno, K. Mori, Y. Asai, and N. Fujii. 2010. Acquisition of a transposon encoding extended-spectrum β -lactamase SHV-12 by *Pseudomonas aeruginosa* isolates during the clinical course of a burn patient. *Antimicrob Agents Chemother* **54**:3956-9.
283. Urban, C., P. A. Bradford, M. Tuckman, S. Segal-Maurer, W. Wehbeh, L. Grenner, R. Colon-Urban, N. Mariano, and J. J. Rahal. 2008. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase β -lactamases associated with long-term care facilities. *Clin Infect Dis* **46**:e127-30.
284. Vahaboglu, H., L. M. Hall, L. Mulazimoglu, S. Dodanli, I. Yildirim, and D. M. Livermore. 1995. Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 β -lactamase, in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. *J Med Microbiol* **43**:294-9.
285. Vahaboglu, H., S. Dodanli, C. Eroglu, R. Ozturk, G. Soyletir, I. Yildirim, and V. Avkan. 1996. Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium* stains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. *J Clin Microbiol* **34**:2942-6.
286. Vahaboglu, H., R. Ozturk, G. Aygun, F. Coskunkan, A. Yaman, A. Kaygusuz, H. Leblebicioglu, I. Balik, K. Aydin, and M. Otkun. 1997. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum β -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2265-9.
287. Vahaboglu, H., F. Coskunkan, O. Tansel, R. Ozturk, N. Sahin, I. Koksall, B. Kocazeybek, M. Tatman-Otkun, H. Leblebicioglu, M. A. Ozinel, H. Akalin, S. Kocagoz, and V. Korten. 2001. Clinical importance of extended-spectrum β -lactamase (PER-1-type)-producing *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Med Microbiol* **50**:642-5.
288. Vatopoulos, A. 2008. High rates of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece--a review of the current evidence. *Euro Surveill* **13**.
289. Venezia, R. A., F. J. Scarano, K. E. Preston, L. M. Steele, T. P. Root, R. Limberger, W. Archinal, and M. A. Kacica. 1995. Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacteriaceae* isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis* **21**:915-23.
290. Vignoli, R., G. Varela, M. I. Mota, N. F. Cordeiro, P. Power, E. Ingold, P. Gadea, A. Sirok, F. Schelotto, J. A. Ayala, and G. Gutkind. 2005.

- Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum β -lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. *J Clin Microbiol* **43**:2940-3.
291. **Wachino, J., Y. Doi, K. Yamane, N. Shibata, T. Yagi, T. Kubota, H. Ito, and Y. Arakawa.** 2004. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A β -lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1960-7.
 292. **Waley, S. G.** 1992. β -Lactamase: mechanism of action, p. 198-228, The chemistry of β -lactams, In M. I. Page ed. A. and P. Blaskie, London.
 293. **Walsh, T. R., M. A. Toleman, W. Hryniewicz, P. M. Bennett, and R. N. Jones.** 2003. Evolution of an integron carrying *bla* VIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* **52**:116-9.
 294. **Wang, C., J. Wang, and Z. Mi.** 2006. *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- β -lactamases and carrying two aminoglycoside-modifying enzymes in China. *J Hosp Infect* **62**:522-4.
 295. **Wang, M., D. F. Sahm, G. A. Jacoby, and D. C. Hooper.** 2004. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:1295-9.
 296. **Weill, F. X., M. Demartin, D. Tande, E. Espie, I. Rakotoarivony, and P. A. Grimont.** 2004. SHV-12-like extended-spectrum- β -lactamase-producing strains of *Salmonella enterica* serotypes Babelsberg and Enteritidis isolated in France among infants adopted from Mali. *J Clin Microbiol* **42**:2432-7.
 297. **Wiener, J., J. P. Quinn, P. A. Bradford, R. V. Goering, C. Nathan, K. Bush, and R. A. Weinstein.** 1999. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA* **281**:517-23.
 298. **Wimer, S. M., L. Schoonover, and M. W. Garrison.** 1998. Levofloxacin: a therapeutic review. *Clin Ther* **20**:1049-70.
 299. **Woodford, N., E. J. Fagan, and M. J. Ellington.** 2006. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* **57**:154-5.
 300. **Wu, J. J., W. C. Ko, S. H. Tsai, and J. J. Yan.** 2007. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *QnrA*, *QnrB*, and *QnrS* among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1223-7.
 301. **Yamano, Y., T. Nishikawa, T. Fujimura, T. Yutsudou, M. Tsuji, and H. Miwa.** 2006. Occurrence of PER-1 producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Japan and their susceptibility to doripenem. *J Antibiot (Tokyo)* **59**:791-6.
 302. **Yan, J. J., W. C. Ko, C. L. Chuang, and J. J. Wu.** 2002. Metallo- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother* **50**:503-11.
 303. **Yan, J. J., S. H. Tsai, C. L. Chuang, and J. J. Wu.** 2006. OXA-type β -lactamases among extended-spectrum cephalosporin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a university hospital in southern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* **39**:130-4.

304. **Yang, Y., N. Bhachech, P. A. Bradford, B. D. Jett, D. F. Sahm, and K. Bush.** 1998. Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates producing TEM-10 and TEM-43 β -lactamases from St. Louis, Missouri. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:1671-6.
305. **Yigit, H., A. M. Queenan, G. J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J. W. Biddle, C. D. Steward, S. Alberti, K. Bush, and F. C. Tenover.** 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:1151-61.
306. **Yong, D., J. H. Shin, S. Kim, Y. Lim, J. H. Yum, K. Lee, Y. Chong, and A. Bauernfeind.** 2003. High prevalence of PER-1 extended-spectrum β -lactamase -producing *Acinetobacter* spp. in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1749-51.
307. **Yong, D., M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee, and T. R. Walsh.** 2009. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla* (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:5046-54.
308. **Yoshimura, F., and H. Nikaido.** 1985. Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother* **27**:84-92.
309. **Yuan, M., H. Aucken, L. M. Hall, T. L. Pitt, and D. M. Livermore.** 1998. Epidemiological typing of *Klebsiellae* with extended-spectrum β -lactamases from European intensive care units. *J Antimicrob Chemother* **41**:527-39.
310. **Yuan, M., L. M. Hall, P. H. Savelkoul, C. M. Vandenbroucke-Grauls, and D. M. Livermore.** 2000. SHV-13, a novel extended-spectrum β -lactamase, in *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients in an intensive care unit in Amsterdam. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:1081-4.
311. **Zanetti, G., F. Bally, G. Greub, J. Garbino, T. Kinge, D. Lew, J. A. Romand, J. Bille, D. Aymon, L. Stratchounski, L. Krawczyk, E. Rubinstein, M. D. Schaller, R. Chiolerio, M. P. Glauser, and A. Cometta.** 2003. Cefepime versus imipenem-cilastatin for treatment of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients: a multicenter, evaluator-blind, prospective, randomized study. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3442-7.
312. **Zasloff, M.** 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**:389-95.

11. A DISSZERTÁCIO ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ PUBLIKÁCIÓK ÉS ELŐADÁSOK

11.1. Közlemények

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, Némédi 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, Rókus 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**

16. **Szabó D**, Szentandrassy J, Juhász Z, Katona K, Nagy K, Rókus 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 blaVIM-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**

11.2. 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 Kemoterápiai 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 quinolone resistance mechanisms. Acta Microbiol Immunol Hung 54: (Suppl.) 120 2007.