

## **Methicillin-rezisztens Staphylococcus aureus (MRSA) gyakoriságának vizsgálata**

### *Módszerek*

A vizsgálati minták transzport közegben (Biotest Transport System) érkeztek a laboratóriumunkba. Minden minta véres agar táptalaj leoltásra, az orrváladékok folyékony táptalajba (Mueller-Hinton) dúsításra kerültek. A konvencionális kataláz,  $\beta$ -haemolysis, pigment termelés, koaguláz, latex-agglutináció, BioRad *Staphylococcus aureus* identifikálást a specifikus nucA gén polimeráz láncreakcióval (PCR) történő kimutatásával validáltuk. Az antibiotikum érzékenység vizsgálatot korongdiffúziós módszerrel az NCCLS ajánlásoknak megfelelően végeztük. A törzsek fágtypizálása nemzetközi, standard fág sorozattal történt.

A methicillin-rezisztens törzsek szűrésére 6 mg/L oxacillin tartalmú screen-agart alkalmaztunk, mikrodilúciós módszerrel elvégeztük az oxacillin és más antibiotikumok MIC értékeinek meghatározását az NCCLS ajánlásai szerint. A methicillin rezisztenciát a *mecA* gén PCR-rel történt kimutatásával igazoltuk. Az MRSA törzsek genotipizálását SmaI enzimes emésztés után pulzálatott mezejű gélelektroforézissel (PFGE) végeztük.

### *Semmelweis Egyetemen izolált törzsek*

Számítógépen értékeltük 2001-2004 között a Semmelweis Egyetem klinikáinak betegeiből a laboratóriumunkban izolált 4097 *S. aureus* törzs különböző antimikrobiális szerek iránti érzékenységének eredményeit. Törzsek 7,8%-a methicillin-rezisztensnek (MRSA) bizonyult. Az egyes években azonban emelkedő gyakoriságot kaptunk. Az MRSA törzsek különböző antibakteriális szerekkel szembeni rezisztenciája korongdiffúziós módszerrel szignifikánsan magasabb arányokat mutatott, mint a methicillin-szenzitív *S. aureus* (MSSA) törzseké. A %-os rezisztencia arányok a következők voltak (MRSA/MSSA): erythromycin

90/10; clindamycin 85/9; ciprofloxacin 82/1; doxycyclin 15/6; gentamicin 67/2; tobramycin 87/3; amikacin 70/2; sumetrolim 0,5/98. Az egyes években az MRSA törzsek bizonyos típusú antibakteriális szerekkel szembeni rezisztenciája növekedést mutatott (pl. makrolidok, linkozamidok, gentamicin), más típusú szereknél ez nem tapasztalható (pl. sulphonamid + trimethoprim). Nem találtunk vancomycin, teicoplanin, illetve linezolid rezisztens MRSA-t. Ebben az időszakban a Semmelweis Egyetemen leginkább elterjedt, 623-as fágtípusú klón volt a leggyakoribb (52, 8%).

### *Macedóniai törzsek vizsgálata*

Vizsgáltuk 3497 macedón *S. aureus* törzs megoszlását methicillin-rezisztencia vizsgálati minta, klinikai profil, a klinika elhelyezkedése és antibiotikum rezisztencia kombináció szerint. Az izolátumok többsége fertőzött sebből (28,5%), orr-tamponból (21%), intratrachealis tubusból (13%) és vérből (11,8%) került kitenyésztésre. 1100 izolátum (31, 4%) bizonyult MRSA-nak. Ezek 35,5%-a sebből, 30,5%-a intratrachealis tubusból és 10,4%-a vérből tenyésztett ki. Az MRSA törzsek 78,6%-a az Intenzív Ellátó Egység, 75%-a a Coma Centrum, 44,2%-a az Általános Sebészeti és 37,3%-a a Haematológiai Klinika betegeinek mintájából tenyésztett ki. Óriási különbségeket találtunk az MRSA gyakoriságában a különböző klinikai profilokat tartalmazó épületek és az egyes profilok között. A 2397 MSSA törzs döntő többsége a penicillinen kívül minden antistaphylococcalis szerre érzékenynek bizonyult. Az MRSA törzsek többsége (97, 5%) rezisztens volt ezekre, és csak 1-2 eltérő antibiotikum rezisztencia kép osztotta őket 4 fenotípusos rezisztencia mintázatú csoportra. Minden törzs érzékeny volt glycopeptidekre.

### *MRSA járványtörzsek a Debreceni Egyetem OEC klinikáin*

A 2005-ben 102 betegről kitenyésztett 339 izolátum 18 különböző klinikáról származott. A vizsgálatokban minden betegről az első izolátumot vettük figyelembe. Hasonlóan a Semmelweis Egyetemhez, Debrecenben, 2005-ben az *S. aureus* törzsek 7, 23%-a volt MRSA. Itt egy kevert fágcsoport a 617, 622, és 623 típusú fággal tipizálható törzsek voltak járványosak. (48%).

Egyes klinikákon nagyon magas volt az MRSA törzsek aránya, például a Sebészeti, a Tüdőgyógyászati és a Gyermekklinikán. A PFGE mintázat alapján 3 genotípus fordult elő. Az A típus 68%-ban, a B és C típus 16-16%-ban. Ez azt jelenti, hogy az esetek 2/3-ában egy klónból származó törzsek okozták a fertőzést.

### *MRSA kórokozás*

Kiemelkedő fontosságú az MRSA hordozás szűrés a hospitalizálásra kerülő betegek körében, hogy megelőzzük a nozokomiális kolonizáció/infekció kialakulását. Meghatároztuk a Semmelweis Egyetem klinikáin felvételre került 2039 beteg MSSA és MRSA hordozását 2004. január és 2005. július között szűrésre beérkezett orr- és torokváladék mintáiból. A szűrt betegek 20%-ában találtunk *S. aureus* hordozást. Az orrváladékokból izolált törzsek 7, 5%-a, a torokváladékokból izolált törzsek 4, 4%-a MRSA-nak bizonyult. A 2004-es évhez képest a 2005-ös évben jelentősen emelkedett az MRSA hordozás gyakorisága. Összesen a szűrt betegek 1,5%-a hordozott az orrában és 0,9%-a a torkában MRSA-t. Az izolátumok a PFGE eredményeinek alapján három különböző nagy klónba tartoznak. Mivel emelkedik az MRSA hordozás gyakorisága, mely indokolja a szűrővizsgálatok kötelező bevezetését tervezett hospitalizáció előtt. Hasonló arányban voltak *S. aureus* hordozók a III. éves orvostanhallgatók, de *mecA*-gént ezekben az izolátumokban nem detektáltunk. A minimális gátlókoncentráció (MIC) meghatározás

eredményei: Oxacillin MIC=0,125–2 mg/L, MIC50=0,25 mg/L, MIC90=0,5 mg/L. Vancomycin MIC=0.25–2 mg/L, MIC50=0,5 mg/L, MIC90=1 mg/L. A többi antibiotikum esetében az érzékenységi mintázat változatos volt.

### **A Semmelweis Egyetemen kezelt betegek mintáiból izolált MRSA és MSSA törzsek quantitív antibiotikum érzékenységének különbségei**

A vizsgálat célja az MSSA és az MRSA törzsek antistaphylococcalis szerek iránti quantitív érzékenységének összehasonlítása volt a MIC értékek alapján. 121 MSSA és 165 MRSA törzs antibiotikum-érzékenységét határoztunk meg mikrodilúciós módszerekkel. A törzsek hospitalizált betegek klinikai mintáiból kerültek izolálásra, nagyrészt invazív mintákból. A MIC alapján az MRSA törzsek számos antibiotikummal szemben rezisztensebbnek bizonyultak a MSSA törzseknél. Az MRSA törzsek nagyobb arányban voltak rezisztensek makrolid, ketolid és linkózamid antibiotikumokkal szemben: az MSSA-k 26%-a, míg az MRSA 96%-a volt rezisztens clarithromycinre, 7, 3%-uk ill. 95, 7%-uk telithromycinre, 70%-uk ill. 100%-uk clindamycinre. Az MSSA törzsek aminoglikozidok iránt is érzékenyebbek voltak, mint az MRSA-k: az MSSA-k 3,25%-a, az MRSA-k 81,2% volt rezisztens gentamicinre, míg amikacinra az MSSA-k 5,7%-a és az MRSA-k 18,2%-a volt rezisztens. Valamennyi törzs érzékenynek bizonyult vancomycinre. Teicoplanin iránt az MRSA törzsek 2,4%-a rezisztens volt, míg valamennyi MSSA törzs érzékeny volt erre a szerre. A fluoroquinolonok hatásos szerek MSSA törzsek ellen: ciprofloxacinra, levofloxacinra és moxifloxacinra ezen törzsek 87,8%-a, 68,3%-a és 78,8%-a érzékeny. Ezzel ellentétben MRSA fertőzések kezelésére nem javasolhatóak, mivel a törzsek 94,5%-a, 97,6%-a, illetve 90,9%-a rezisztens ezekre, a szerekre. Az MRSA törzsek quantitív rezisztenciája többségében 256 mg/L, vagy ennél magasabb volt minden szerrel.

## **Pathogenitást, virulenciát és toxigenitást kódoló gének molekuláris detectálása *S. aureus*ban**

Ezeknek a vizsgálatoknak az volt a célja, hogy meghatározzuk a Panton-Valentine lukocidin S és F gének, a staphylococcalis enterotoxin (se) A, B, C, D, E, G, H, I, J, L, M, N, O, Q, P, R és U gének, a toxikus shock syndrome toxin (TSST)-1 gén, az accessory gene, regulator type I-IV, az exfoliatin toxin A és B gén, az  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - haemolisin, a  $\gamma$  - haemolysinvariant gént és ahaemolysis compartment A, B, C gén jelenlétének gyakoriságát az *S. aureus* törzsekben. A primereket a VBC Genomicstól szereztük be. Multiplex PCR-t alkalmaztunk a Taq DNS polymerase (FERMENTAS) enzimmal, amikor csak lehetett. A reakció után az amplicont ethidium bromid festéssel tettük láthatóvá. Az értékeléshez SPSS számítógépes programot használtunk. A vizsgálatokat a Bécsi Orvostudományi Egyetem Fertőző Betegségek és Chemoterapiai Klinikájának kutató laboratóriumába viteleztük ki. A Semmelweis Egyetem klinikáira felvett betegekből kitenyésztett 204 *S. aureus* törzset vizsgáltuk. Közülük 110 MRSA 94 MSSA.

A törzsek *S.aureus* faji megerősítését a 23S rRNS gén PCR-rel történt kimutatásával végeztük.

### *Tapadási gének gyakorisága*

A proteinA-t kódoló *spaX* gént az MRSA-k 90%-ban, az MSSA-k 80%-ban, a fibronektin-kötésért felelős *fnbA* gént az MRSA törzsek 93%-ban, az MSSA törzsek 97%-ban, a kollagén-kötésért felelős *cna* gént az MRSA-k 24 %-ban, az MSSA-k 34%-ban, és az általános tapadásért felelős *icaA* gént az MRSA-k 93%-ban, az MSSA-k 90%-ban tartalmazták. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a proteinA fehérjét kódoló gén nem minden genetikailag *S. aureus*-nak bizonyuló törzsben van jelen. Az MRSA törzsek tapadásában a szituációtól függően az *icaA*, *fnbA*, illetve a *spaX*

gének által termelt proteinek játszanak főszerepet. Az MRSA törzseknek erősebb lehet a tapadási képessége, különösen véráram fertőzés esetén a 90%-os nem specifikus IgG-kötési képesség miatt. A kollagént exponáló klinikai szituációkban az MSSA törzsek adhéziós képessége lényegesen gyakoribb.

### *Enterotoxin gének gyakorisága*

A staphylococcalis enterotoxin (se) gének közül a *seG*, *seI*, *seM*, *seN* és *seO* a leggyakoribbak 64-71%-os előfordulási gyakorisággal. Az MRSA törzsekben ezek a gének kétszer olyan gyakoriak voltak, mint az MSSA-kban. A „tradicionális” *seA* és *seD* gén 43%-34%-ban volt jelen, dominánsan az MRSA-ban. A *seB*, *seC*, *seH*, *seI* és *seN* 10% alatt fordult elő. Érdekes, hogy egyetlen MRSA törzs sem tartalmazott *seC* és *seL* gént. A *seJ*, *seP* és *seR* gének jellemzők az MRSA törzsekre 64-67%-os előfordulási gyakorisággal.

### *Cytotoxin gének gyakorisága*

Az alfa- és delta haemolysin gént mindkét csoport törzsei hordozták. A béta-haemolysin gén az MRSA-kban 33%-ban az MSSA-kban 52%-ban voltak jelen. A gamma-haemolysin gént az MRSA-k 88%-ban, az MSSA-k 68%-ban hordozták. A haemolysin gamma variáns gén az MRSA-kban 100%-ban az MSSA-kban 84%-ban volt található.

A Pantón-Valentine (leukocidin S és F) gén jelenléte ritka. A TSST-1 gén ritkán van jelen, akkor is az MSSA törzsekben. Csak egy MSSA törzsben találtunk exfoliatin gént.

### *Regulátor gének gyakorisága*

Ami az accessory gene regulator típusokat illeti, az agrII több mint 50%-

ban van jelen, 2/3 az MRSA-ban, 1/3 az MSSA-ban. Ezt követi az agrI (32%), de ellentétes tendenciával. Az agrIII kevesebb mint 10%-ban volt jelen, és többnyire az MSSA-kban. Az agrIV kevesebb, mint 1,5%-ban mutatható ki. Ezeknek a nagyon érdekes és új eredményeknek a klinikai jelentőségét jelenleg még nem ismerjük. Vizsgálni kívánjuk a leggyakrabban előforduló gének expresszióját olyan feltételek mellett, amelyek imitálják a klinikai situatiókat, előbb szövetkultúrákon, aztán kísérleti állatokban. Ezek az adatok nagymértékben alátámasztják a pályázatunk alaphypothésisét, nevezetesen, hogy az MRSA törzsek annyira különböznek az MSSA törzsektől, hogy alfajt képeznek a *S. aureus* fajon belül.

### **Staphylococcus enterotoxin gének hordozókban**

A Semmelweis Egyetem egészséges hallgatóinak torok- és orrváladékából, valamint a kéz bőrének törléseiből izoláltuk a 137 *S. aureus* törzset. A 137 hallgatói törzs enterotoxin gén megoszlása a következő volt: *seA* 16% (n=22), *seB* 11% (n=15), *seC* 11.7% (n=16), *seD* 11% (n=15), *seE* 1.5% (n=2), *TSST-1* 6.6% (n=9), *seG* 34.3% (n=47), *seH* 5.1% (n=7), *seI* 38% (n=52), *seJ* 11% (n=15), *seK* 10,2% (n=14), *seL* 11% (n=15), *seM* 37.2% (n=51), *seN* 38.7% (n=53), *seO* 38% (n=52), *seP* 5.8% (n=8), *seQ* 16.1% (n=22).

Az enterotoxin gén pozitív *S. aureus* törzsek aránya magas (73,7%). A leggyakrabban detektált enterotoxin gének a *seG*, *seI*, *seM*, *seN*, *seO* voltak. Az enterotoxin gének legtöbbször kombináltan fordultak elő. Egy törzs esetében 11 különféle enterotoxin gén volt fellelhető. Sem, a hallgatókban sem a betegekben nem expresszázódtak ezek a gének, melynek oka egyelőre ismeretlen.

## Új antibakteriális szerek vizsgálata

Kollaborációban a Debreceni Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Tanszékéről Dr. Sztaricskai Ferenc és Dr. Herczegh Pál professzor munkacsoportjával megvizsgáltuk több, kémiaailag módosított teicoplanin, eremomycin, vancomycin, és ristocetin származék antibakteriális hatását *S. aureus*, *S. epidermidis* és *E. faecalis* törzsekre a célból, hogy melyik hat a legerősebben a methicillin-rezisztensekre, ill. vancomycin-rezisztensekre. Találtunk olyan származékokat, melyek feltételezhetően terápiás koncentrációban hatnak az MRSA és vancomycin-rezisztens *Enterococcus* törzsekre. Legújabbban olyan ciprofloxacin és norfloxacin antibakteriális hatását vizsgáltuk, melyek permanensen polyethylene glycol-hoz vannak kötve thiourea kötéssel.

Ezekről a jelentést az említett kutatók készítik el.

Kollaborációban a Temple Egyetemről Dr. Ötvös László professzor és munkatársaival vizsgáltuk egy prolinban gazdag peptid antibakteriális hatását. Megállapítottuk, hogy bár a Gram-pozitívok közül csak a *Staphylococcus saprophyticus* hat, igen erős hatása van az *Enterobacteriaceae* tagjaira mind *in vitro* mind *in vivo*. Az intraperitonealisan LD50-nyi kiterjedt spektrumú béta-lactamázt termelő *Escherichia coli* fertőzött egerekben a fertőzés után 4 órával kezdett 10 mg/tkg dózisban 3x4 órás intraperitonealis kezelés eliminálja a vérből a baktériumokat. Azonban, valószínűleg a gyors bacteriolysis miatt hirtelen nagy mennyiségben felszabaduló endotoxin hatás következtében ez az antibakteriális peptid ilyen koncentrációban nem védi meg a fertőzött egereket a pusztulástól.



## Korábbi vizsgálatok befejezése

Befejeztünk néhány korábbi kísérletet, ill. vizsgálatot. A pneumococcusok fluoroquinolon rezisztenciájának emelkedését találtuk, ennek oka, hogy a *parC* gén QRDR régiójában olyan pont mutáció történt, mely Lys-137-Asp aminosav változást eredményezett. Ez a genetikai módszer a későbbiekben alkalmazást nyer a staphylococcusok fluoroquinolon rezisztenciájának vizsgálatában. Kompletáltuk a vágásra került csirkékből izolált enterococcusok glycopeptid rezisztenciájának gyakoriságára vonatkozó vizsgálatainkat a *vanA-E* gének kimutatásával, és az *Enterococcus muntii*, *E. durans*, *E. faecium* és *E. casseliflavus* törzsek fajspecifikus genetikai azonosításával.

Kompletáltuk Ghidán Ágoston „VanA gént hordozó Enterococcus törzsek epidemiológiája: Magyarországon izolált törzsek molekuláris jellemzése, antibiotikum érzékenysége és filogenetikai vizsgálata” c. PhD értekezéséhez szükséges vizsgálatokat, melyek az előző OTKA T 32473 sz. pályázatban kezdődtek.

Nagyszámú *Enterococcus* törzset vizsgáltunk egészséges vágóhídi broiler csirkékből és két humán mintából származó *vanA* törzsszel hasonlítottuk össze. Az állati eredetű törzsek az ország több pontjáról kerültek gyűjtésre. A törzsek faji meghatározását, antibiotikum érzékenység, fenotípus vizsgálatát az irodalomban leírt útmutatók alapján molekuláris módszerekkel végeztük. Az *Enterococcus* törzseket PCR segítségével azonosítottuk. *E. faecium* species esetén a *ddl* *E. faecium*, az *E. durans* törzs esetén a *sod* gént amplifikáltuk. Az azonosítás során felállítottunk egy biokémiai sémát, ami a laborokban segítheti a meghatározást.

Jelentős számban találtunk *vanA* gén hordozó törzset, ami azt jelentette, hogy országunkban is megtalálhatóak a vancomycin rezisztens *Enterococcus* törzsek. Ezekben nagyon magas szintű vancomycin rezisztenciát (> 256 ug/mL) mértünk évekkal a glycopeptid származék avoparcin betiltása után is. A vizsgálat során magas arányban kaptunk

tetracyclin és erythromycin rezisztenciát. Ennek a háttérében talán a kapcsolt rezisztencia (azonos transzpozon?) állhat, amit a továbbiakban vizsgálni szeretnénk. Megállapítottuk, hogy a *vanA* gén domináns a broilercsirkékből származó *Enterococcus* mintákban. Két humán *vanA* gént tartalmazó törzset találtunk, ami Magyarországon ritka, napjainkban inkább *vanB* előfordulással lehet számolni. Az állati eredetű mintákban vancomycin-rezisztens *E. faecium*, *E. durans* és egyetlen *E. mundtii* törzset izoláltunk. A nemzetközi irodalomban is nagyon ritka a *vanA* pozitív *E. mundtii* törzsről szóló közlemény. A kereskedelmi kettek nem képesek ezt a speciést meghatározni. A vizsgálatainkból arra következtetünk, hogy a leggyakoribb speciestek mellett más speciestek is hordozhatják a *van* gént, ezért a laboratóriumoknak fel kellene készülniük e törzsek kimutatására is. A filogenetikai vizsgálatokra támaszkodva megállapítható, hogy a vancomycin-rezisztens *E. faecium* törzsek többnyire monoklonálisak vagy legalábbis egy domináns klón szóródott az ország nyugati felében. Másrészt a vancomycin-rezisztens *E. durans* törzsek poliklonális eredetűek. Ahhoz, hogy ezt egyértelműen igazolni tudjuk, tervezzük a transzpozon amplifikálást (Long-PCR), majd emésztő enzimmel darabokra hasítjuk a terméket és összehasonlítjuk a sávokat (PCR-RFLP). Ezekből, az eredményekből Ghidán Ágoston megvédte a PhD disszertációját.

Elkészítettük Dr. Máthé András „Egy széles spektrumú  $\beta$ -laktamáz termelő *Klebsiella pneumoniae* törzssel létrehozott kísérleti fertőzés antimikróbás kezelése” című PhD értekezését, melynek kísérletei még az előző OTKA T 32473 számú pályázatban kezdődtek.

Ehhez komplettáltuk a cisplatin hatásának vizsgálatát egérben a cefepim kiválasztására, hogy utánozhassuk az emberi vesében történő antibiotikum kiválasztást.

A kiegészítő vizsgálatok azt mutatták, hogy az amikacin in vitro és in vivo hatékony volt az ESBL termelő törzssel történt fertőzésben mind standard, mind magas csíraszámnál. Az egerek túlélése nem különbözött az

amikacinnal és az imipenemmel kezelt csoportokban. Ezek alapján az amikacin, in vitro érzékenység esetén az imipenem alternatívája lehet. Az amikacin és imipenem kombináció nem mutatott in vitro szinergizmust sem alacsony, sem magas csíraszámnál a chequerboard teszt és az ölési görbe vizsgálat alapján. A kombináció az állatmodellben sem bizonyult statisztikailag hatékonyabbnak a monoterápiáknál. Az imipenem és az amikacin kiváló aktivitással rendelkezik, kombinációjuk azonban nem mutatott előnyt.

Ezekből az eredményekből dr. Máthé András megvédte PhD disszertációját.

Komplettáltuk Szabó Zsuzsanna PhD hallgatónk „Klinikai mintákból izolált *Candida* törzsek identifikálása és antifungális érzékenység” c. disszertációjához szükséges vizsgálatokat kollaborációban a Debreceni Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézete Dr. Majoros László adjunktus vezette kutatócsoportjával. Szabó Zs. Családi körülményei úgy hozták, hogy vissza kellett mennie Debrecenben. Ahhoz, hogy PhD tanulmányait az én irányításommal de ott folytathassa, témát kellett változtatni az ottani fogadó-készségnek megfelelően.

Megállapítottuk, hogy a Micronaut-Candida rendszerrel több *Candida* faj identifikálható, mint az API ID32C módszerrel, ugyanakkor ki is egészítik egymást. A Time-Kill Method, bár kellő műszerettség nélkül munkaigényes, alkalmas a természetes antifungális rezisztenciával rendelkező gombák, így a *Candida inconspicua* faj törzseinek kvantitatív antifungális érzékenységének vizsgálatára.

### **Eredmények hasznosítása:**

Elkezdjük az eredmények gyakorlati alkalmazását. Mindennapos diagnosztikai és kutatási rendszerbe állítottuk a polimeráz láncreakciót (PCR) és a pulzáló mezejű gélelektroforézist (PFGE) a betegek vizsgálati anyagaiból kitenyésztett *Staphylococcus aureus* törzsek identifikálására a

23S rDNS, a *nucA* és *mecA* gén kimutatásával, ill. klonális összetartozásának vizsgálatára a PFGE genotípusok meghatározásával.