

SHV- és CTX-M-típusú kiterjedt-spektrumú β -laktamáz termelő *Klebsiella pneumoniae* törzsek komplex molekuláris-epidemiológiai vizsgálata Magyarországon

Doktori értekezés téziszűzete

dr. Damjanova Ivelina

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Füzi Miklós, Dokt. Habil., egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Pásti Gabriella Ph.D.

Dr. Pálos Gábor PhD

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Ludwig Endre, egyetemi tanár, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai:

Prof. Dr. Minárovits János, egyetemi tanár, MTA doktora

Dr. Ongrádi József, egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2011

1. Bevezetés

A *K. pneumoniae* species tagjai ubikviter szervezetek, szaprofitákként megtalálhatók a talajban, felszíni és szennyvizekben, növényeken. Az emberben és az állatokban szintén szaprofitaként jelen lehetnek a béltraktusban és az orrgaratban. Bizonyos földrajzi régiókban területen szerzett infekciók jelentős kórokozói, és mint opportunistá patogének felelősek az elsősorban intenzív terápiás osztályokon előforduló nozokomiális fertőzésekért, ahol nagy kockázatot jelentenek az ezeken az osztályokon ápolat immunkompromittált betegeknek. Hatalmas járványokozó képességgel rendelkeznek, és jelentős forrásai a horizontálisan terjedő antibiotikum rezisztenciának. Ma a kiterjedt-spektrumú β -laktamáz (ESBL) termelő *Klebsiella pneumoniae* törzsek világszerte a multirezisztens Gram-negatív baktériumok egyik legnagyobb csoportját alkotják.

A mobilis geneitekai elemek – főleg konjugatív plazmidok – segítségével pandémiás elterjedést elért TEM, SHV és CTX-M ESBL-eket hordozó multirezisztens *K. pneumoniae* törzsek által okozott fertőzések kezelésére döntően a karbapenemeket alkalmazták és alkalmazzák. Ennek eredményeként az utóbbi néhány évben szerzett, karbapenemeket hatástalanító karbapenemázok (pl. metallo- β -laktamázok (MBL), *K. pneumoniae* karbapenemázok (KPC)) jelentek meg a *K. pneumoniae* populációban. Az ilyen multirezisztens – főleg colistin rezisztenciával párosulva - törzsek által okozott fertőzésekre gyakorlatilag már nem létezik adekvát terápia, és ezek globális terjedése jelentősen hozzájárul az egészségügyi ellátás jelenlegi világméretű kríziséhez.

A Nemzeti ESBL-termelő Gram-negatív kórokozók Nemzeti Referencia Laboratórium (ESBL-NRL) adatai alapján az ESBL-termelő *K. pneumoniae* (ESBL-KP) a leggyakoribb ESBL-termelő patogén Magyarországon. 2002 óta az ESBL-termelő *Enterobacteriaceae* törzsek között 65-75%-os arányban fordulnak elő. A Nemzeti Bakteriológiai Surveillance alapján a hemokultúrákból izolált 3. gen. cephalosporin rezisztens *K. pneumoniae* törzsek aránya a 2003-ban tapasztalt 9%-ról közel 50%-ra emelkedett 2010-ben, továbbá ezeknek a törzseknek a 80%-a aminoglikozidokkal és fluoroquinolonokkal szemben is rezisztens volt.

A századfordulón Magyarországon ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek egyre több, súlyos nozokomiális járványt okoztak, főleg PIC-ban. A helyzet súlyossága indokolta az Enterális és Nozokomiális Baktériális Patogének Nemzeti referencia laboratóriumába (BP-NTRL) beküldött járványokból, halmozódásokból és sporadikus esetekből származó 3. generációs cefalosporin rezisztens *K. pneumoniae* izolátumok széleskörű, komplex molekuláris epidemiológiai vizsgálatát.

Dolgozatom legfőbb célja a 3. generációs cefalosporin rezisztens *K. pneumoniae* epidemiológiájának megértése, a populációban végbemenő változások nyomon követése, a multirezisztens epidémiás klónok és epidémiás plazmidok robbanásszerű országos terjedésének hátterében húzódo molekuláris-genetikai folyamatok feltérképezése. A több száz izolátum molekuláris-epidemiológiai jellemzéséhez döntően teljes genom makrorestrikciós profilanalízist (PFGE) alkalmaztam, kiegészítve plazmidprofil, feno- és genotípusos rezisztencia mechanizmus meghatározással, továbbá antibiotikum rezisztencia és háztartási gének (MLST) szekvencia meghatározásával. A számos izolátum PFGE

mintázataival olyan adatbázist építettem, amelyben az eredendően összehasonlító (komparatív) jellegű makrorestrikciós profilvizsgálatok eredményeit definitívvé (meghatározó) tettem és ezáltal térben és időben önállóan értelmezhetővé és értékelhetővé váltak. Eredményeim hozzájárulnak, hogy a Magyarországon egyik legjelentősebb nozokomiális kórokozóvá vált *K. pneumoniae* molekuláris epidemiológiáját és antibiotikumokkal szembeni rezisztenciáját alaposabban megismerjük, továbbá segítséget nyújthatnak az infektológus és kórházhigiénikus szakembereknek a súlyos hazai helyzet javításához.

2. Célkitűzések

1. A 2002-2003-ban Perinatális Intenzív Centrumokban (PIC) járványokat, illetve halmozódásokat okozó ESBL-termelő *Klebsiella spp.* törzsek genetikai rokonságának meghatározása, és az általuk hordozott ESBL-gének jellemzése, valamint összehasonlítása egy 1998-ban hazánkban lezajlott ESBL-termelő *K. pneumoniae* által okozott járvány törzseivel.
2. A hazánkban 2003-ban megjelent CTX-M-termelő *K. pneumoniae* törzsek jellemzése. A CTX-M-termelő törzsek terjedésének további monitorozása, és összehasonlítása a 2003-ban izolált törzsekkel. Nemzeti Tipizáló Adatbázis építése és folyamatos fejlesztése *K. pneumoniae* epidémiás klónok terjedésének monitorozására. Filogeográfiai térképek szerkesztése a multirezisztens *K. pneumoniae* klónok elterjedtségéről térben és időben.

3. Az első, Magyarországon megjelent SHV-típusú ESBL- és KPC-termelő *K. pneumoniae* izolátumok molekuláris epidemiológiai vizsgálata, genetikai jellemzése.
4. Az első, Magyarországon megjelent CTX-M-típusú ESBL- és VIM-termelő *K. pneumoniae* izolátumok molekuláris epidemiológiai vizsgálata, genetikai jellemzése.
5. A hazánkban 2009-ben megjelent plazmidon kódolt AmpC β -laktamáz és CTX-M-termelő *K. pneumoniae* izolátumok molekuláris epidemiológiai vizsgálata és terjedésének monitorozása.

3. Módszerek

Baktérium törzsek

A Fágtipizáló és molekuláris epidemiológiai osztályra, valamint az BP-NTRL-be az 1960-as évektől kezdődően küldik halmozódásokból, nozokomiális járványokból izolált *K. pneumoniae* törzseket tipizálására és további vizsgálatokra, valamint 2002. óta küldik az ESBL-termelésre gyanús izolátumokat is az ESBL-NRL-ba. Vizsgálatainkhoz az izolátumokat a 2002-2010 között beküldött, 3. generációs cefalosporinokkal szembeni rezisztenciát mutató 1708 *K. pneumoniae* izolátum között választottuk ki.

SHV-termelő Klebsiella spp. járványtörzsek vizsgálata: 1998-ban, valamint 2002-2003. között 5 megyei, illetve oktató kórház PIC osztályán lezajlott hét járványból izolált 126 ESBL-termelő *Klebsiella spp.* izolátumot választottuk ki komplex molekuláris epidemiológiai vizsgálatokra.

CTX-M-termelő K. pneumoniae törzsek vizsgálata: 2003-ban az FMEO és az ESBL-NRL-ba beküldött ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumok közül 17

magas szintű ciprofloxacín rezisztenciát mutatott és öt megye nyolc kórházának felnőtt beteg ellátó osztályairól származott. 2004-ben csak 4, 2005-ben pedig 196 *K. pneumoniae* izolátum volt CTX-M-termelő és magas szinten ciprofloxacín rezisztens. A 13 megye 35 kórházából, öt járványból (n=137) valamint sporadikus esetekből származó izolátumok PFGE, MLST és plazmid tipizálását, továbbá a rezisztencia mechanizmusok vizsgálatát végeztük el.

Fluorokinolonokkal szembeni csökkent érzékenységet mutató ESBL-termelő K. pneumoniae törzsek vizsgálata: A 2006-2008 között folyamatosan végzett monitorozás során megerősítésre/további vizsgálatokra beküldött 488 ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátum közül 27, öt egészségügyi intézmény felnőtt és csecsemő ápolási osztályairól származó izolátum csökkent érzékenységet mutatott fluorokinolonokkal szemben. Az izolátumok molekuláris tipizálását és rezisztencia mechanizmusok vizsgálatát végeztük el.

KPC-termelő K. pneumoniae izolátumok vizsgálata: 2008. október és 2009. április között kilenc, karbapenemekkel szemben nem-érzékeny *K. pneumoniae* izolátumot küldtek be az ESBL-NRL-ba. Az izolátumok rezisztencia mechanizmus meghatározását és molekuláris tipizálását végeztük el.

MBL-termelő K. pneumoniae izolátum vizsgálata: 2009-ben egy Budapesti kórházban ápolott páciens broncho-alveoláris lavage mintájából a KP3686 *K. pneumoniae* izolátumot azonosították, melyet az előzetes fenotípusos vizsgálatok alapján MBL-termelés gyanújával küldtek be további vizsgálatra. Az izolátum PFGE és MLST tipizálását elvégeztük, a multirezisztencia genetikai hátterét meghatároztuk.

Plazmidon kódolt AmpC-típusú β -laktamáz-termelő K. pneumoniae izolátumok vizsgálata: 2009 év végén és 2010 év folyamán olyan *K. pneumoniae* izolátumokat küldtek be, amelyeknél a cefoxitin rezisztencia és a 3. generációs cefalosporinokkal szembeni csökkent érzékenység/ rezisztencia együttes megjelenése AmpC-típusú β -laktamáz termelésre utalt. A 2010-es év végéig 15 egészségügyi intézményből származó összesen 117 izolátum molekuláris tipizálását és rezisztencia mechanizmus vizsgálatát végeztük el.

Identifikálás biokémiai módszerekkel és antibiotikum érzékenységi vizsgálatok.

Az izolátumok identifikálását különböző félautomata identifikáló rendszerekkel végeztük: API20E, ATB ID32E (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Franciaország), Micronaut E (Genzyme Virotech GmbH). Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat korongdiffúziós módszerrel végeztük a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) aktuális ajánlásai alapján. Az ESBL-termelés megerősítésére a kombinált korong módszer elvén alapuló ESBL SET (MAST) kereskedelmi tesztet alkalmaztuk. A felételezett karbapenemáz termelés fenotípusos kimutatására módosított Hodge-tesztet alkalmaztunk. A különböző β -laktamáz típusok elkülönítésére további β -laktamáz gátlószerekkel kiegészített (a KPC-termelés kimutatásához 3-aminofenil-boronsav, a MBL-termelés vizsgálatához EDTA és dipikolinsav, az AmpC-enzim vizsgálatához cloxacillin) kombinált korong módszereket alkalmaztunk karbapenem tartalmú korongok felhasználásával. Az antibiotikumok minimális gátló koncentrációját (MIC) E-teszttel (AB

Biodisk), leveshígítási, illetve agarhígítási módszerrel végeztük a gyártó és a CLSI ajánlásai szerint.

Molekuláris módszerek

Polimeráz lánc reakció (PCR) módszert alkalmaztunk különböző antibiotikum rezisztencia gének keresésére kiválasztott izolátumoknál: β -laktám rezisztenciát kódoló gének (*bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-1-like}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{DHA}*), aminoglikozid rezisztenciát kódoló gének (*aac-(3)-IIa*, *aac-(6')-Ib*), kinolon rezisztenciát kódoló gének (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) és tetraciklin rezisztenciát kódoló gének (*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*).

A plazmid DNS kivonását és a vertikális gélelektroforézist Kado és Liu módszerével végeztük el. Az β -laktámáz gének átvihetőségét recipiens törzsekbe konjugációs és elektroporációs kísérletekkel vizsgáltuk. A transzkonjugáns vagy elektroporáns (TK/EP) törzsekből QIAprep Spin Miniprep Kit-tel (Qiagen) nyertük ki a plazmid DNS-t és plazmid-RFLP vizsgálatot végeztünk *Pst*I (New England BioLabs) restrikciós endonukleázzal. Az enzimes emésztés után 0,7%-s agaróz gélben futtattuk 5V/cm feszültségen 90 percig.

A *K. pneumoniae* magas szintű ciprofloxacín rezisztenciáját a giráz és topoisoméráz IV bizonyos alegységeit kódoló *gyrA* és *parC* gének kinolon rezisztenciát meghatározó régióiba (QRDR-k) bekövetkezett változásokat DNS-szekvenálásával vizsgáltuk kiválasztott izolátumoknál.

A *K. pneumoniae* izolátumok genetikai rokonságát pulzáltatott-mezejű gélelektroforézissel (PFGE) vizsgáltuk a CDC (Centers for Disease Control and Prevention) standardizált PFGE protokollja alapján a Chef-DR II

rendszer alkalmazásával (BioRad). A gélek értékelését és az adatbázis felépítését Fingerprinting II Informatix Software (BioRad) segítségével végeztük el. A PFGE mintázatok hasonlóságát Dice koefficienssel jellemeztük, a cluster analízis alapján szerkesztett dendrogram UPGMA („unweighted pair group method with arithmetic averages”) módszerrel készült.

A multi-lókuszos szekvencia tipizálást (MLST) kiválasztott *K. pneumoniae* izolátumoknál végeztük el Diancourt és mtsai által kidolgozott séma alapján. Az allél szekvenciák és a szekvencia típusok (ST) meghatározását a <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html> honlap segítségével végeztük el.

4. Eredmények

Perinatális intenzív centrumokban járványokat okozó SHV-típusú ESBL-termelő *Klebsiella spp.* izolátumok vizsgálata

1998-2003 között a hazai PIC osztályokon a legtöbb járványt *Klebsiella spp.* okozta (19/25, OEK-be bejelentett járványok alapján). Ezek közül hétben ESBL-termelő törzsek voltak a kórokozók. Az érintett 5 PIC osztályról származó 126 törzs fenotípusos és molekuláris vizsgálatait végeztük el.

Az összes izolátum multirezisztens volt, de érzékeny ciprofloxacinnal szemben. A PFGE vizsgálat alapján a 126 izolátum 12 különböző PT-ba tartozott. A makrorestrikciós profilokból készült dendrogram igazolta, hogy az 5 különböző kórház PIC osztályán a hét járványt 10 különböző genetikai klón okozta.

Az izolátumok 1-5 különböző, 2,3-228 kb méretű plazmidot hordoztak. Nyolc *K. pneumoniae* és 2 *K. oxytoca* járvány törzs bla_{SHV-5} gént, míg három *K. pneumoniae* járvány törzs bla_{SHV-2a} gént hordozott, és mindegyik izolátum esetében a gén átvihető volt konjugációval a recipiens törzsbe. 10 *K. pneumoniae* és 2 *K. oxytoca* donor izolátumnál az ESBL-gének kb. 90 kb nagyságú plazmidon helyezkedtek el. A TK-ból izolált plazmidok RFLP vizsgálata (emésztés *Pst*I enzimmal) után nagyon hasonló vagy azonos emésztési mintázat volt látható az összes bla_{SHV-5} gént hordozó plazmidnál, továbbá két bla_{SHV-2a} gént hordozó plazmidnál is.

CTX-M-termelő *K. pneumoniae* izolátumok vizsgálata 2003-2005 között

Először 2003-ban azonosítottunk magas szinten ciprofloxacinnal rezisztens, ESBL-KP izolátumokat. A 17 izolátum mindegyike $bla_{CTX-M-15}$ ESBL-gént hordozott és – a 3. gen. cefalosporinokkal szembeni rezisztencia mellett - magas szintű - tetraciklin, ciprofloxacinnal és gentamicinnal (egy izolátum kivételével) rezisztenciát mutatott. A TK-okból kb. 140 kb nagyságú plazmidon azonosítottuk a CTX-M-15 kódoló gént, valamint a gentamicinnal érzékeny törzs kivételével az *aac(3)-IIa* aminoglikozid rezisztencia gént is. *Pst*I enzimmal végzett plazmid RFLP nagyon hasonló mintázatot adott mindegyik plazmidnál. A 17 izolátum 5 megyében és Budapesten levő 8 egészségügyi intézményből származott, de a makrorestrikciós profil vizsgálat klonális kapcsolatot igazolt. Az izolátumokat az N PT-ba soroltuk és a Magyar Epidémiás Klón elnevezést ajánlottuk (HEC-Hungarian Epidemic Clone).

2005-ben a CTX-M-15-termelő, ciprofloxacinnal rezisztens *K. pneumoniae* izolátumok száma ugrásszerűen megemelkedett, így 13 megye 35 kórházából származó 196 izolátum komplex molekuláris epidemiológiai vizsgálatát végeztük el.

Az összes izolátum magas szintű rezisztenciát mutatott ceftazidimmal, cefotaximmal és ciprofloxacinnal szemben.

A PFGE vizsgálat összesen 3 PT-ba különítette el a 196 izolátumot: az N PT-ba (HEC) 129 izolátum 27 egészségügyi intézményből, az R PT-ba (Epidémiás Klón II, EK II) 46 izolátum 9 egészségügyi intézményből, míg 21 izolátum 4 egészségügyi intézményből az S PT-ba (Epidémiás Klón III, EK III) tartozott.

A plazmid profil analízis alapján a HEC izolátumokra egy kb. 140 vagy kb. 90 kb, az R PT-ba tartozó izolátumokra szintén egy kb. 90 kb, míg az S PT-ba tartozó izolátumokra egy 50 kb nagyságú plazmid volt jellemző. Mind a három PT-ból származó R-plazmid hordozta a *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *aac(6')*-*Ib-cr* és *aac(3)-IIa* géneket. Az *aac(3)-IIa* gén nem volt jelen a gentamicin érzékeny HEC izolátumok TK-inál. Kizárólag az S PT-hoz tartozó izolátumok 50 kb plazmidja hordozta a *bla*_{TEM-1} β -laktamáz gént is és csak itt lehetett *ISEcp1* elemet kimutatni. A HEC izolátumokból származó összes TK-ban – függetlenül a plazmid méretétől - azonosítottuk a *tet(A)* és a *tet(C)* tetraciklin rezisztenciáért felelős géneket is.

A magas szintű kinolon rezisztencia vizsgálatához kiválasztott izolátumok *gyrA* és *parC* QRDR-ét szekvenáltuk meg. A HEC és az S PT izolátumok *GyrA* QRDR-ében két aminosav cserét (Ser83Phe és Asp87Ala), valamint a *ParC*-ben egy aminosavcserét (Ser80Ile) mutattunk ki. Az R PT-ba tartozó

izolátumoknál mindkét génnél egy-egy aminosavszintű változást okozó mutációt azonosítottunk (GyrA Ser83Ile, ParC Ser80Ile).

Az MLST alapján is a három vizsgált PT három különböző szekvencia típusba tartozott: HEC (N PT) a ST15, a S PT a ST11, a R PT pedig a ST147.

ESBL-termelő *K. pneumoniae* molekuláris epidemiológiája 2006-2010 között és a *K. pneumoniae* Nemzeti PFGE adatbázisa

A három epidémiás klón terjedésének nyomon követéséhez létrehoztuk a KP PFGE nemzeti tipizáló adatbázisát, melyet azóta is folyamatosan bővítjük. A 2010. év végéig összesen 153, 35 kórházból származó a HEC-hez tartozó (N/ST15) izolátumot azonosítottunk. Az R/ST147 klón 12 EüI-ből származó 76 izolátummal, az S klón pedig 10 kórházból származó 51 izolátummal szerepel adatbázisunkban.

2006-ban egy negyedik ciprofloxacín rezisztens CTX-M-15-termelő epidémiás klón is megjelent, melyet Z/ST525 típusként jelöltük. Az öt év alatt számos nozokomiális járványt okozott országszerte, és 2010 végéig 37 egészségügyi intézményben fordult elő összesen 130 izolátummal.

A 2004 és 2010 között számos PIC-ban lezajlott járványokból és halmozódásokból származó izolátumok PFGE vizsgálatát végeztük el. Döntően egy járványból vagy halmozódásból egy (ritkán kettő) genetikai klónt azonosítottunk (M és O klónok 2004-ben, T 2005-ben, W és X 2006-ban, U, Y és V 2007-ben, KP025 2008-ban és KP041 2009-ben) és mindegyik SHV-5 vagy SHV-2a ESBL-gént hordozott. A Q, H, P és L klónok egynél több intézményben fordultak elő, akár évekkel később is.

A 27 ciprofloxacinnal szemben csökkent érzékenységet mutató 2006-2008 között izolált 5 EüI-ből származó ESBL-KP izolátum PFGE és MLST vizsgálata egyetlen genetikai klón – L/ST274 epidémiás klón - jelenlétét bizonyította mind a felnőtt, mind az újszülött osztályokon. A csecsemő osztályokról származó izolátumok kizárólag SHV-2a, a felnőtt betegeket ápoló osztályokról származó izolátumok pedig kizárólag CTX-M-15 típusú ESBL gént hordoztak. Két különböző aminoglikozid acetiltransferáz (AAC) kódoló gént azonosítottunk: az *aac(3)-II*-t, amely a gentamicin, tobramycin és netilmicin rezisztenciáért felelős enzimet kódolja és az *aac(6)-Ib-cr* variánst, amely amikacinnal szembeni rezisztenciáért és bizonyos kinolonok gyenge hidrolíziséért felelős. A koraszülött osztályokról származó izolátumok R-plazmidjai csak az *aac(3)-II*-t kódolták, a felnőtt osztályokról származó izolátumok R-plazmidjai mindkét gént hordozták.

A ciprofloxacin szembeni rezisztencia vizsgálatok során aktív ciprofloxacin efflux-pumpa működését egyetlen, koraszülött osztályról származó izolátum esetében igazoltuk. A *gyrA* és *parC* gének QRDR-nek direkt szekvenálásával kiderült, hogy mind a felnőtt, mind a koraszülött osztályokról származó izolátumok rendelkeznek a *gyrA* génjükben egy mutációval (83SER>TYR), míg a *parC* gén ezen régiójában mutáció nem volt.

A TK-ból és EP-ből izolált ~90 kb méretű *bla_{SHV-2a}* vagy *bla_{CTX-M-15}* géneket kódoló R-plazmidok restrikciós mintázatai lényegesen eltértek egymástól. A felnőtt betegekből izolált CTX-M-15 típusú β -laktamáz gént hordozó plazmidok mintázata azonos volt a HEC 140 kb R-plazmidjainak mintázatával, a koraszülött osztályokról származó SHV-2a termelő izolátumok R-plazmidjainak restrikciós mintázata viszont teljesen

megegyezett az 1998- és 2002-ben különböző PIC-ban izolált SHV-2a-termelő járvány törzsek plazmidjainak mintázataival.

DHA-1 AmpC-típusú β -laktamázok megjelenése és terjedése *K. pneumoniae* törzsekben

2009. év végén azonosítottuk az első CTX-M-típusú ESBL és indukálható, plazmidon-kódolt AmpC-termelő *K. pneumoniae* izolátumokat., melyek a cefalosporinok mellett aminoglikozidokkal, fluorokinolonokkal és sumetrolimmal szemben is rezisztensek voltak. Az izolátumok 30%-a legalább egy karbapenemmel szemben is rezisztens volt.

2010. év végéig 117, 15 EüI-ből származó *K. pneumoniae* izolátumot azonosítottunk, melyek plazmidon-kódolt, indukálható DHA-termelőknek bizonyultak. Ezek közül 108 CTX-M-típusú ESBL-termelő is volt. Az izolátumok 83%-a a KP053 PT-hoz és az ST11-hez tartozott. Ezenkívül 20 izolátum további 8 különböző PT-ba tartozott, egy-egy S/ST11 és Z/ST525 epidémiás klónokhoz tartozó izolátumban is azonosítottuk a *bla*_{DHA-1} gént.

KPC-termelő *Klebsiella pneumoniae* megjelenése Magyarországon

A kilenc izolátum magas szintű rezisztenciát mutatott a széles-spektrumú cefalosporinokkal és ciprofloxacinnal szemben, továbbá mindegyik rezisztens volt ertapenemmel, imipenemmel és amikacinnal szemben. Az első izolátum trimethoprim/sulfamethoxazollal szemben magas szinten rezisztens volt és érzékeny colistinre, viszont a további nyolc izolátum magasszintű rezisztenciával rendelkezett colistinnel szemben és érzékeny volt trimethoprim/sulfamethoxazollal szemben.

Az izolátumok az S PT-hoz és ST258-hez tartoztak és *bla*_{KPC-2}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-11} és *bla*_{SHV-12} géneket hordoztak.

Metallo- β -laktamáz termelő *K. pneumoniae* izolátum vizsgálata

A megerősítő vizsgálatok alapján 2009-ben azonosítottuk az első hazai MBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumot.

A KP3686 izolátum kromoszómáisan kódolt SHV-11 nem-ESBL típusú β -laktamázt termelt, az általa hordozott plazmidokon *bla*_{CTX-M-15} és *bla*_{TEM-1} (~50 kb plazmidon), továbbá 1. osztályú integronon *bla*_{VIM-4} (~90 kb plazmidon) géneket azonosítottuk. Az 1800 bp méretű integronon az 5' konzervatív szakasz után helyezkedett el az *aac(6')-Ib* aminoglikozid rezisztenciát kódoló gén, amelyet a *bla*_{VIM-4} MBL kódoló gén, követett, majd a 3' konzervatív szakasz. Az integron szerkezete azonos volt a Magyarországon korábban *Pseudomonas aeruginosa* és *Aeromonas hydrophyla* törzseknél leírt *bla*_{VIM-4} gént hordozó integronok szerkezetével.

A KP3686 izolátum a makrorestriktációs profil vizsgálat alapján a 2005-ben azonosított epidémiás elterjedésű S PT-hoz tartozott. Az MLST az izolátumot ST11-ként határozta meg.

5. Következtetések

SHV-típusú ESBL-termelő *Klebsiella spp.* által okozott járványok jellemzése

A 2002. és 2003. között beküldött törzsek 92%-a SHV-típusú ESBL-gént hordozott. A vizsgált izolátumok számottevő hányada 5 megyei kórház perinatális intenzív centrumaiban lejátszódott hét járványból származott. A hét járványból származó törzsek molekuláris epidemiológiai tipizálása 10 különböző ciprofloxacín-érzékeny genetikai klónt igazolt. Kiválasztott izolátumok ESBL-génjeinek szekvencia vizsgálata a Magyarországon ebben az időszakban domináns géntípusok - SHV-5 és a SHV-2a –jelenlétét igazolta. Az azonos ESBL-géntípust hordozó 10 járványtörzs közös jellemzője egyedül az volt, hogy nagyon hasonló vagy teljesen azonos plazmiddal rendelkeztek. Következésképpen a viszonylag rövid időintervallumban (21 hónap) megjelenő járványokat allodémiás R-plazmidok országos terjedése okozta. A nemzetközi irodalomban elsőként írtuk le, hogy a nagyszámú PIC-ban lezajlott SHV-típusú ESBL-termelő KP által okozott nozokomiális járvány hasonló vagy azonos epidémiás R-plazmidok gyors, hatékony és széles földrajzi elterjedésének következménye. Az ilyen típusú plazmidok elnevezésére az allodémiás R-plazmid definíciót ajánlottuk. Megállapítottuk, hogy Magyarországon ebben az időszakban a *K. pneumoniae* populációban az SHV-típusú ESBL-gének poliklonális, allodémiás R-plazmidokhoz kötött terjedést mutattak. Az azóta tartó többéves monitorozás szintén ezt a trendet igazolja.

CTX-M-15-termelő *K. pneumoniae* izolátumok jellemzése és a Nemzeti *K. pneumoniae* PFGE adatbázis

A 2003. év folyamán azonosítottuk az első CTX-M-15-típusú ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumokat hazánkban. Az összesen 17 izolátumot különböző egészségügyi intézményekben és különböző időpontokba izolálták, de ennek ellenére egyetlen genetikai klónhoz tartoztak (N/ST15). Ezt a klónt Magyar Epidémiás Klónként (HEC) írtuk le és világviszonylatban ez volt az első leírása egy igazoltan országos elterjedésű, genetikailag stabil epidémiás *K. pneumoniae* klónnak.

2005-ben a CTX-M-15-típusú ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumok száma ugrásszerűen megemelkedett, és Magyarországon akkor jelentették az első, felnőtt beteget ápoló osztályokról ESBL–KP által okozott nozokomialis járványokat. A molekuláris epidemiológiai vizsgálatok eredményei alapján többségük HEC-hez tartozott (129 izolátum, 27 egészségügyi intézmény). A CTX-M-termelő izolátumok 2005-ben megfigyelt robbanásszerű terjedésében két további multirezisztens epidémiás klón is szerepet játszott – az R/ST147 és az S/ST11. Az epidémiás klónok rezisztenciájának hátterében igen hasonló mutációkat és rezisztencia gén hordozást állapítottuk meg. A három epidémiás klón 2005-ben öt nozokomialis járványt okozott. Világviszonylatban elsőként írtunk le térben és időben stabil multirezisztens genetikai klónokat a *K. pneumoniae* populációban, és ennek bizonyítására először alkalmaztunk MLST-t. Az egyedülálló helyzet, amikor az országszerte azonosított CTX-M-termelő *K. pneumoniae* izolátumok 97%-a magas szintű ciprofloxacinnal rezisztenciával

rendelkező, összesen három epidémiás elterjedésű genetikai klónhoz tartozik, valamint az, hogy a HEC éveikig perzisztál és cirkulál hazánk egészségügyi intézményeiben a *Staphylococcus aureus* (MRSA versus MSSA) populációban lezajlott eseményekhez hasonló konvergens evolúciós folyamatokat feltételez. A közlemény megjelenése után az MLST módszert a kutatók azonnal elkezdték alkalmazni *K. pneumoniae* populáció genetikájának vizsgálatára, és az eltelt két év alatt megállapításaink beigazolódtak. Valóban léteznek olyan térben és időben stabil, a legveszélyesebb rezisztencia mechanizmusokkal rendelkező epidémiás vagy pandémiás klónok, amelyek az egész világon elterjedtek. Ezek közül a leggyakrabban azonosított típusok az általunk elsőként leírt ST11 (és annak közeli rokonai, az ST258 és ST437) és ST15.

Az epidémiás multirezisztens *K. pneumoniae* klónok folyamatos monitorozására felépítettük és működtetjük a Nemzeti *K. pneumoniae* PFGE adatbázist. 2005. és 2010. között az N/ST15 (Σ152 izolátum, 35 EüI), az R/ST147 (Σ76 izolátum, 12 EüI) és az S/ST11 (Σ53 izolátum, 10 EüI) mellett két további epidémiás klón kisselektálódását és országos terjedését figyelhettük meg: a Z/ST525 (Σ130 izolátum, 37 EüI) és az L/ST274 (Σ33 izolátum, 5 EüI). A szintén ciprofloxacinnal rezisztens CTX-M-15-termelő Z/ST525 epidémiás klón országos térhódításának öt évig tartó nyomon követése alátámasztja a CTX-M-típusú ESBL-k monoklonális terjedését hazánkban. Az L klón esetében egy eddig ismeretlen „túlélési stratégiát” írtunk le: a gyermekosztályokról származó izolátumok SHV-2a-típusú ESBL-termelést, a felnőtt osztályokról származó izolátumoknál viszont CTX-M-15 típusú ESBL-termelését igazoltuk. Ehhez az L/ST274 epidémiás

klón a különböző kórházi osztályok környezetére jellemző, évekkal korábban azonosított és ismert epidémiás R-plazmidokat vett fel. Világviszonylatban elsőként írtuk le allodémiás R-plazmidok akár tíz évig tartó stabilitását és perzisztálását az ország egészségügyi intézményeiben, valamint *K. pneumoniae* klónok ilyen típusú alkalmazkodását az eltérő környezeti feltételekhez, ami feltehetően elősegíti epidémiás terjedésüket.

Karbapenemáz-termelő *K. pneumoniae* izolátumok vizsgálata

Magyarországon elsőként azonosítottunk KPC-termelő és VIM-termelő izolátumokat. A KPC-2 termelő ST258 izolátumok, valamint a CTX-M-15 termelő ST11 hazai izolátumok azonos genotípus csoportba (S PT) tartoztak. Figyelembe véve a két szekvencia típus közeli rokonságát, a PFGE eredményeit, az azonos, kromoszómálisan kódolt *bla_{SHV-11}* gén jelenlétét a *K. pneumoniae* populációban elsőként azonosítottuk egy hiperepidémiás klonális komplexet, mely jelenleg bizonyítottan a világ minden táján elterjedt. Mivel a nemzetközi MLST adatbázisban még viszonylag kevés törzs adatai szerepelnek a klonális komplex nomenklatúrája/elnevezése változhat. Ezt figyelembe véve a CC258/340 jelölést javasoltuk.

A VIM-4-termelő izolátum jellemzése alátámasztotta a *K. pneumoniae* populációra vonatkozó megfigyeléseinket, az izolátum az azóta bizonyítottan sikeres interkontinentális elterjedésű S/ST11 klónhoz tartozott, és közel öt éves országos cirkulációja alatt feltehetően a környezetéből egy korábban leírt integront vett fel, ezáltal tovább növelve szelekciós esélyeit. A nemzetközi irodalomban elsőként írtuk le a *K. pneumoniae* populációban hiperepidémiás klón jelenlétét - az ST11-t - és annak VIM-4-típusú MBL-termelését.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertációval kapcsolatos publikációk jegyzéke

Damjanova I, Tóth Á. (2004) ESBL-termelő *Klebsiella pneumoniae* és *Klebsiella oxytoca* járvány törzsek molekuláris-epidemiológiai tipizálása. Mikrobiológiai Körlevél, 4: 3 sz.

Tóth Á, **Damjanova I**. (2005) CTX-M-típusú kiterjedt-spektrumú β -laktamáz (ESBL) termelő *Klebsiella pneumoniae* törzsek előfordulása Magyarországon. Mikrobiológiai Körlevél, 5: 2 sz.

Damjanova I, Tóth Á, Pásztai J, Bauerfeind A, Füzi M. (2006) Nationwide spread of clonally related CTX-M-15-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Hungary. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 25:75-278. **IF: 2,33**

Damjanova I, Tóth Á, Pásztai J, Jakab M, Milch H, Bauerfeind A, Füzi M. (2007) Epidemiology of SHV-type β -lactamase producing *Klebsiella* spp. strains from outbreaks in five geographically distant Hungarian Neonatal Intensive Care Units: widespread of epidemic R-plasmids. Int J Antimicrobial Agents, 29: 665-671. **IF: 2,338**

Damjanova I, Tóth Á, Pásztai J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Füzi M. (2008) Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type β -lactamase-producing

Klebsiella pneumoniae epidemic clones in Hungary in 2005—the new ‘MRSAs’? J Antimicrob Chemother., 62: 978-985. **IF: 4,328**

Hajdu Á, Böröcz K, Dandárné Csabai Cs, Bauer E, Tirczka T, Tóth Á, **Damjanova I**, Pásztai J, Hajbel-Vékony G, Németh I. (2009) ESBL-termelő Gram-negatív baktériumok okozta nozokómiális járvány kivizsgálása koraszülött osztályon epidemiológiai és mikrobiológiai módszerekkel. Infektológia és klinikai mikrobiológia, XVI évf 1-2. szám: 20-23.

Tóth Á, **Damjanova I**, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, Böröcz K, Pásztai J. (2009) KPC-2 karbapenemáz termelő *Klebsiella pneumoniae* ST258 klón megjelenése Magyarországon. Mikrobiológiai Közlevél, 9: 3. sz.

Damjanova I, Tóth Á, Hajbel-Vékony G, Tirczka T, Pásztai J, Füzi M. (2009) ESBL-termelő *Klebsiella pneumoniae* Nemzeti PFGE adatbázis. Infektológia és klinikai mikrobiológia, 16: 1-2. szám: 24-28.

Tóth Á, **Damjanova I**, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, Böröcz K, Pásztai J. (2010) Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 29: 765–767. **IF: 2,631**

Kristóf K, Tóth Á, **Damjanova I**, Jánvári L, Konkoly-Thege M, Kocsis B, Koncan R, Cornaglia G, Szegő E, Nagy K, Szabó D. (2010) Identification of a *bla*_{VIM-4} gene in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST11

clone and in a *Klebsiella oxytoca* strain in Hungary. J Antimicrob Chemother. 65:1303-1305. **IF: 4,659**

Szilágyi E, Füzi M, **Damjanova I**, Böröcz K, Szőnyi K, Tóth Á, Nagy K. (2010) Investigation of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreaks in Hungary between 2005 and 2008. Acta Microbiol Immunol Hung, 57: 43-53.

A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikációk jegyzéke

Erdősi Tímea, **Damjanova Ivelina**, Milch Hedda, Pászti Judit. (2002) Nosocomialis fertőzéseket okozó gyakoribb baktérium fajok fenotípus- és genotípusvizsgálása. Infektológia, IX évf. 2: 45-55

Barcs I, Horváth A, Pászti J., **Damjanova I**, Kerecsen G., Kecskés A., Kiss R.G., Nagy K. (2008) Molekuláris biológiai módszerekkel felderített húgyúti eredetű sepsis. Infektológia. XV évf., pp. 8-11.

Tóth I, Schmidt H, Kardos G, Lancz Z, Creuzburg K, **Damjanova I**, Pászti J, Beutin L, Nagy B. (2009) Virulence genes and molecular typing of different groups of *Escherichia coli* O157 strains in cattle. Appl Environ Microbiol. 2009 75(19):6282-91 **IF (2010): 3,801**

Schweitzer N, **Damjanova I**, Kaszanyitzky E, Ursu K, Samu P, Tóth AG, Varga J, Dán A. Molecular characterization of *Campylobacter lanienae*

strains isolated from food-producing animals. Foodborne Pathog Dis. 8:615-621. **IF (2010): 2,134**

Schweitzer N, Dán A, Kaszanyitzky E, Samu P, György Tóth A, Varga J, **Damjanova I.** (2011) Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates of poultry, swine, and cattle origin collected from slaughterhouses in Hungary. J Food Prot. 74:905-11. **IF (2010): 1,72**

Damjanova I, Jakab M, Farkas T, Mészáros J, Galántai Z, Turcsányi I, Bistyák A, Juhász A, Pászti J, Kiss I, Kardos G. (2011) From farm to fork follow-up of thermotolerant campylobacters throughout the broiler production chain and in human cases in a Hungarian county during a ten-months period. Int J Food Micro 150:(2-3) pp. 95-102. **IF (2010): 3.143**