

A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központban izolált multirezisztens *Klebsiella pneumoniae* törzsek molekuláris epidemiológiai vizsgálata

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Dr. Melegh Szilvia Zsóka

Témavezetők: Dr. Schneider György, Dr. Tigyi Zoltán

Programvezetők: Prof. Dr. Emőd Levente, Dr. Kerényi Monika

Doktori Iskola vezetők: Prof. Dr. Lénárd László, Prof. Dr. Szekeres Júlia



Pécsi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

Pécs

2015

Bevezetés

A *Klebsiella pneumoniae* egy Gram-negatív, pálcá alakú, fakultatív anaerob baktérium, mely az Enterobacteriaceae családba tartozik. Alapvetően opportunistá kórokozóként tartják számon tekintettel arra, hogy elsősorban különböző alapbetegségekben szenvedő, kórházban ápolta személyeket betegít meg. Húgyúti, légúti, sebészeti és véráram fertőzéseket okoz a leggyakrabban. Opportunistá természete ellenére léteznek olyan fokozott virulenciájú törzsei is, melyek képesek súlyos megbetegedést (primer májtályog esetenként metasztatikus komplikációkkal) okozni egyébként egészséges egyénekben is.

Mai napig számos virulencia faktort azonosítottak már *K. pneumoniae* törzsekben. A poliszacharid tok, a hipermukoviszkozus fenotípus, a sejtfal lipopoliszacharid komponense, a komplementmediált lízissel szembeni rezisztencia, az 1-es és a 3-as típusú fimbria, a biofilm képzés és a különböző vasmegkötő rendszerek (enterobactin, salmochelin, aerobactin, yersiniabactin és *Klebsiella* Ferric ion Uptake system) termelése mind hozzájárulhatnak a megbetegítő képességhez. A fokozott virulenciájú törzsek esetében a különböző virulencia determinánsok egyidejű megléte okozhatja a megnövekedett virulencia potenciált.

A β -laktám antibiotikumok (penicillinek, cefalosporinok, karbapenemek és monobaktámok) a leggyakrabban használt antibiotikumok közé tartoznak, ezért a velük szembeni rezisztencia különös figyelmet érdemel. Valamennyi *K. pneumoniae* izolátum természetes módon rezisztens aminopenicillinekre egy kromoszómáisan kódolt SHV β -laktamáznak köszönhetően. A *K. pneumoniae* izolátumok legfontosabb szerzett β -laktám rezisztencia mechanizmusai (1) a kiterjesztett spektrumú β -laktamázok (extended spectrum β -lactamase, ESBL), (2) az AmpC enzimek és/vagy (3) a karbapenemázok termelése.

Az ESBL enzimek, melyek között a leggyakoribbak a különféle SHV, TEM és CTX-M β -laktamázok, képesek inaktiválni a harmadik generációs cefalosporinokat, valamint aktivitásuk klavulánsavval gátolható. Az ESBL típusú SHV és TEM β -laktamázok olyan kromoszómáisan kódolt SHV és TEM enzimekből alakultak ki sorozatos pontmutációk révén, melyek szűkebb szubsztrát spektrummal rendelkeztek.

A plazmidon kódolt AmpC enzimek, mint ACC, ACT, CMY, DHA, FOX, LAT, MIR és MOX, szintén képesek a harmadik generációs cefalosporinokat hidrolizálni, és ezt az aktivitást cloxacillin segítségével lehet felfüggeszteni. Az AmpC termelés ritkábban

felelős a harmadik generációs cefalosporinokkal szembeni rezisztenciáért, mint az ESBL termelés.

A legszélesebb körben elterjedt karbapenemázok közé tartoznak az IPM, a KPC, az NDM, az OXA-48-szerű és a VIM enzimek. Ezek nagy hatásfokkal inaktíválják a karbapenemeket, és a specifikus gátlószerek csoportonként változnak.

Az ESBL, AmpC és/vagy karbapenemáz termelő izolátumok multirezisztensnek tekinthetők, mivel ezek a mechanizmusok egyidejűleg több antibiotikum csoporttal szembeni keresztrezisztenciát is okoznak, és emellett nagyon gyakran számos egyéb nem- β -laktám antibiotikummal szemben is csökkent az érzékenységük. A multirezisztens törzsek előfordulási gyakoriságának növekedéséhez a különféle epidémiás rezisztencia plazmidok terjedése és a sikeres klónok terjeszkedése egyaránt hozzájárulhat. Az enzimek pontos típusa és gyakorisága földrajzi régióként jelentős eltéréseket mutat.

Az elmúlt két évtizedben az ESBL termelő *K. pneumoniae* izolátumok figyelemre méltó terjedést mutattak Magyarországon. 1996-ban az első ESBL géneket *bla_{SHV-2}* and *bla_{SHV-5}*-ként azonosították. Az ezredforduló tájékán számos, *bla_{SHV-2a}*-t vagy *bla_{SHV-5}* gént hordozó epidémiás rezisztencia plazmid okozta kórházi járvány zajlott az ország különböző újszülött intenzív osztályain. 2003-ban jelent meg a ciprofloxacin rezisztens, CTX-M-15 termelő Magyar Epidémiás Klón (HEC/ST15) a felnőtt egészségügyi ellátó rendszerben. 2005-ben a HEC/ST15 mellett két további ciprofloxacin rezisztens, CTX-M-15 termelő epidémiás klón (EC II/ST147 és EC III/ST11) széleskörű elterjedését is igazolták. A negyedik epidémiás klón (EC IV/ST274) 2006-ban jelent meg, és SHV-2a vagy CTX-M-15-t termelt.

Magyarországon 2008 óta növekvő számban fordulnak elő karbapenemáz termelő *K. pneumoniae* izolátumok. Az ország távoli régióiban különböző osztályokba tartozó karbapenemázokat azonosítottak, melyek eltérő ESBL enzimek termeléséhez társultak, és különféle klónokban fordultak elő. A 2008-2009-es észak-magyarországi járványért KPC-2 karbapenemázt és SHV-12 ESBL-t egyidejűleg termelő ST258 izolátumok voltak felelősek. A *bla_{VIM-4}* karbapenemáz génnek a CTX-M-15 termelő EC III/ST11 klónban való megjelenését 2009-ben a fővárosban észlelték elsőként. Délkelet-Magyarországon 2012-ben OXA-162 karbapenemázt azonosítottak CTX-M-15 termelő ST15 klónban.

Célkitűzések

Mielőtt jelen munkát elkezdtük volna, nem történt még korábban a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjából származó multirezisztens *K. pneumoniae* izolátumokat érintő átfogó vizsgálat, ezért vizsgálatunk céljaul azt tűztük ki, hogy a szerzett β -laktám rezisztencia mechanizmusokkal rendelkező izolátumokról széleskörű ismereteket szerezzünk annak érdekében, hogy (1) felmérjük a különböző klónok tér- és időbeni elterjedtségét, (2) klonális jellegzetességeket keressünk az antibiotikum érzékenység és a virulenciával kapcsolatos faktorok tekintetében, és (3) hogy a megkezdett surveillance munka folytatását egy részletesen feldolgozott törzsgyűjteménnyel támogathassuk. A megfogalmazott kérdések alább kerülnek felsorolásra.

Változások a K. pneumoniae izolátumok β -laktám rezisztenciájában

- Hogyan változott időben a *K. pneumoniae* izolátumok β -laktám rezisztenciájának gyakorisága a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjában?
- Milyen eltéréseket mutatott a *K. pneumoniae* izolátumok β -laktám rezisztenciájának gyakorisága az országos adatokhoz képest?
- Mely ESBL gének voltak a leggyakoribbak?
- Mely ESBL termelő klónok voltak a legelterjedtebbek?
- Milyen volt az egyes ESBL termelő klónok előfordulása térben és időben?
- Mi volt a karbapenemáz termelés molekuláris háttere?
- Milyen klonális kapcsolatban álltak egymással a karbapenemáz termelő izolátumok?

A szerzett β -laktám rezisztenciával rendelkező K. pneumoniae izolátumok virulenciával kapcsolatos jellegzetességei és antibiotikum érzékenységük

- Milyen virulenciával összefüggő jellegzetességek voltak megfigyelhetőek a különböző ESBL termelő klónok esetében?
- Milyen rezisztencia mintázatok voltak jellemzőek a különböző ESBL termelő klónokra?
- Milyen antibiotikumokra voltak érzékenyek a karbapenemáz termelő izolátumok?

Anyagok és módszerek

Változások a *K. pneumoniae* izolátumok β -laktám rezisztenciájában

A szerzett β -laktám rezisztencia mechanizmusok előfordulásának felmérése

- A harmadik generációs cefalosporinokkal szemben rezisztens és/vagy ESBL ill. AmpC termelő izolátumok éves arányának kiszámolása a 2003-2014-es időszakra az összes klinikai minta vonatkozásában (*ceph_{all}*)
- A karbapenemekkel szemben rezisztens és/vagy karbapenemáz termelő izolátumok éves arányának kiszámolása a 2003-2014-es időszakra az összes klinikai minta vonatkozásában (*carb_{all}*)

Izolátumok

- 102 ESBL termelő *K. pneumoniae* izolátum a 2004-2008-as időszakból
- 102 karbapenemáz termelő *K. pneumoniae* izolátum a 2009-2011-es időszakból

Molekuláris tipizálás

- Makrorestrikciós profil meghatározás pulzáló mezejű gélelektroforézis (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) segítségével
- Multilókusz szekvencia tipizálás (multilocus sequence typing, MLST)

β -laktamázok kimutatása

- ESBL termelés megerősítése kombinált korong módszerrel
- Karbapenemáz termelés szűrése módosított Hodge-teszt segítségével
- Karbapenemáz termelés megerősítése fenotípusos gátlási próbákkal
- β -laktamáz gének (*bla_{CMY}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{DHA}*, *bla_{FOX}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{VIM}*) kimutatása PCR segítségével
- *Bla_{SHV}* gének restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus vizsgálata *NheI* enzimmel a harmadik generációs cefalosporinok bontásával kapcsolatos leggyakoribb pontmutáció kimutatására

- *Bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} gének szekvenálása és integronszekvenálás választott izolátumok esetében

A szerzett β -laktám rezisztenciával rendelkező *K. pneumoniae* izolátumok virulenciával kapcsolatos jellegzetességei és antibiotikum érzékenységük

Virulenciával kapcsolatos jellegzetességek

- Virulenciával összefüggésbe hozható gének (*magA*, *k2a*, *rmpA*, *irp2-1* and *kfuB*) kimutatása PCR segítségével
- Hipermukoviskózus fenotípus szűrése „string”-teszt segítségével
- Szérum baktericid hatással szembeni érzékenység mérése
- Enterobactin és aerobactin termelés kimutatása indikátor törzsek segítségével
- 1-es és 3-as típusú fimbria kimutatása agglutinációs próbák segítségével
- Statikus biofilm képzés mérése mikrotiter lemezen

Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok

- Korong diffúziós módszer
- Mikrodilúciós módszer
- MIC (minimális gátló koncentráció) grádiens teszt

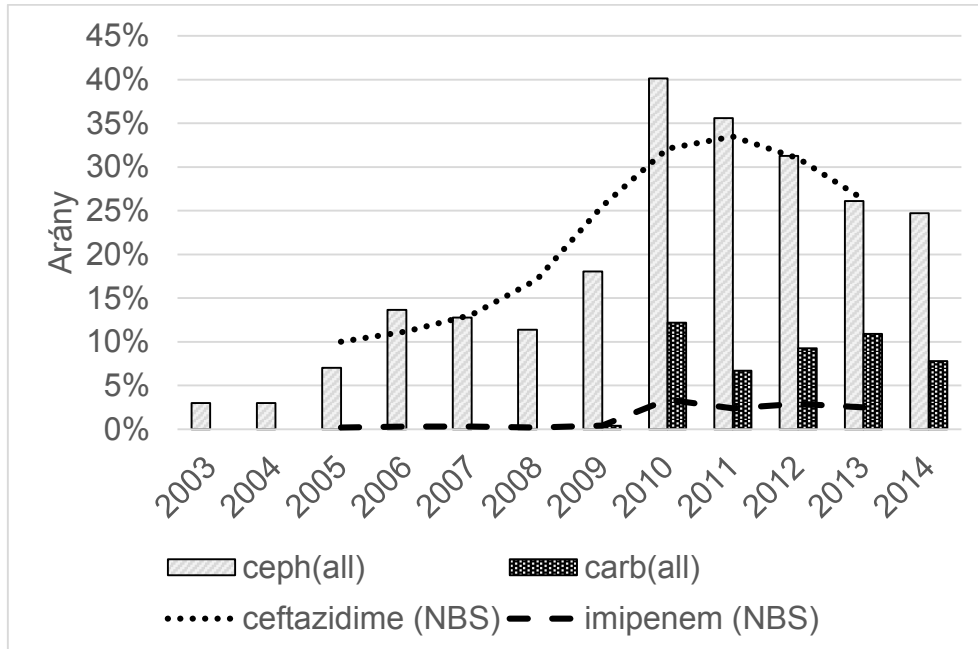
Statisztikai módszerek

- Hipotézis vizsgálat valószínűségi hányados (likelihood ratio) teszt és Kruskal-Wallis-teszt segítségével

Eredmények és megbeszélés

Változások a *K. pneumoniae* izolátumok β -laktám rezisztenciájában

Annak érdekében, hogy a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjában izolált *K. pneumoniae* törzsek szerzett β -laktám rezisztencia mechanizmusainak gyakoriságában bekövetkezett változásokat követni tudjuk az alábbi adatsorok kerültek kiszámolásra és elemzésre: (1) *ceph_{all}* a harmadik generációs cefalosporinokkal szembeni érzékenységet befolyásoló rezisztencia mechanizmusok, vagyis az ESBL és AmpC termelés nyomon kísérésére; és (2) *carb_{all}* a karbapenem érzékenységet érintő rezisztencia mechanizmusok, azaz a karbapenemáz termelés és porinmutáció melletti ESBL/AmpC túltermelés monitorizálására. Az éves előfordulási gyakoriságokat az 1. ábra szemlélteti. A könnyebb összehasonlítás érdekében a Nemzeti Bakteriológiai Surveillance (NBS) megfelelő adatai (ceftazidimmal és imipenemmel szembeni nem-érzékenység aránya) is feltüntetésre került az ábrán.



1. ábra A szerzett β -laktám rezisztencia mechanizmusokkal rendelkező *K. pneumoniae* izolátumok éves aránya a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjában az összes *K. pneumoniae* izolátum viszonylatában továbbá a Nemzeti Bakteriológiai Surveillance (NBS) megfelelő adatai

Az 1. ábra alapján két jelentős emelkedést lehet felismerni: az első 2004 és 2006 között történt (*ceph_{all}*: 3.0-13.7%), a második 2008 és 2010 között (*ceph_{all}*: 11.4%-40.1%; *carb_{all}*: 0.0-12.2%). Mindkét növekedést a rezisztencia arányok enyhe csökkenése követte.

Ha a *ceph_{all}* és *carb_{all}* arányokat a Nemzeti Bakteriológiai Surveillance adataihoz hasonlítjuk, megállapíthatjuk, hogy az általános tendenciák nagyon hasonlóak voltak. Ugyanakkor ki kell emelnünk két, a számok nagyságrendjében észrevehető, jelentős különbséget: (1) 2010-ben a *ceph_{all}* és a *carb_{all}* arányok is lényegesen meghaladták a megfelelő országos adatokat, és (2) hogy 2010 után a *carb_{all}* arány számottevően magasabb érték körül maradt (8.7% körül ingadozott szemben a 2.6%-os országos imipenem nem-érzékenységi átlaggal).

Annak érdekében, hogy a fentebb leírt megfigyelésekre magyarázatot találjunk, a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ különböző osztályairól származó *K. pneumoniae* izolátumok közül a 2004-2008-as időszakból 102 ESBL termelőt, és a 2009-2011-es időszakból 102 feltételezett karbapenemáz termelőt választottunk ki molekuláris tipizálásra és β -laktamáz kimutatásra. A választást a következő megfontolások alapján tettük: (1) a korai időszakban AmpC termelést nem mutattunk ki, és jelenleg is nagyon ritkán fordul elő a pécsi *K. pneumoniae* izolátumok körében, valamint (2) intézményünkben az első karbapenemáz termelő *K. pneumoniae* 2009-es kimutatása óta valamennyi csökkent karbapenem érzékenységű izolátum következetesen pozitív volt a módosított Hodge-teszt során, mely karbapenemáz termelésre utalt. Az eredményeket összefoglalóan az 1. táblázat tartalmazza.

ESBL termelő izolátumok (2004-2008)

A 2004-2008-as időszakból származó ESBL termelő izolátumok három major és tizenegy minor klónba voltak csoportosíthatóak a PFGE segítségével végzett makrorestrikciós profil meghatározás alapján (1. táblázat). A major klónok a következőképp kerültek azonosításra: Magyar Epidémiás Klón (HEC/ST15), Epidémiás Klón Pécs (ECP/ST101) és Epidémiás Klón II (EC II/ST147). A minor klónok között ST34, ST113 és ST323 került megállapításra egy újonnan azonosított szekvenciatípus mellett (ST1193, allél profil: 2-83-2-1-9-4-135), ami egy új, 83-as számmal megjelölt *infB* variánst hordozott.

1. táblázat A molekuláris tipizálás és a β -laktamáz gének kimutatásának eredményei

		Pulzotípus (PFGE)	Izolátumok száma	MLST	Kimutatott β-laktamáz gének
ESBL termelő izolátumok 2004-2008	Major klónok	PT-01 (HEC)	69	ST15	<i>bla</i> _{SHV} (<i>NheI</i> : negatív) <i>bla</i> _{CTX-M-15}
		PT-02 (ECP)	10	ST101	<i>bla</i> _{SHV} (<i>NheI</i> : negatív) <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{TEM-1} (6 izolátum)
		PT-03 (EC II)	9	ST147	<i>bla</i> _{SHV} (<i>NheI</i> : negatív) <i>bla</i> _{CTX-M-15}
	Minor klónok	PT-04	2	NA	<i>bla</i> _{SHV} (<i>NheI</i> : negatív) <i>bla</i> _{CTX-M}
		PT-05	1	NA	<i>bla</i> _{SHV} (<i>NheI</i> : negatív) <i>bla</i> _{CTX-M}
		PT-06	1	NA	<i>bla</i> _{SHV} (<i>NheI</i> : negatív) <i>bla</i> _{CTX-M}
		PT-07	1	NA	<i>bla</i> _{SHV} (<i>NheI</i> : negatív) <i>bla</i> _{CTX-M}
		PT-08	1	NA	<i>bla</i> _{SHV} (<i>NheI</i> : negatív) <i>bla</i> _{CTX-M}
		PT-09	1	NA	<i>bla</i> _{SHV} (<i>NheI</i> : negatív) <i>bla</i> _{CTX-M}
		PT-10	2	ST1193	<i>bla</i> _{SHV-5}
		PT-11	1	ST34	<i>bla</i> _{SHV-5}
		PT-12	1	ST113	<i>bla</i> _{SHV-5}
		PT-13	1	ST323	<i>bla</i> _{SHV-5}
		PT-14	2	NA	<i>bla</i> _{SHV} (<i>NheI</i> : pozitív) <i>bla</i> _{CTX-M}
karbapenemáz termelő izolátumok 2009-2011	PT-01 (HEC)	101	ST15	<i>bla</i> _{SHV-28} <i>bla</i> _{CTX-M-15} (99 izolátum) <i>bla</i> _{TEM-1} <i>bla</i> _{VIM-4} (100 izolátum)	
	PT-15	1	NA	<i>bla</i> _{SHV} (<i>NheI</i> : negatív) <i>bla</i> _{CTX-M} <i>bla</i> _{TEM} <i>bla</i> _{VIM}	

NA = nem vizsgált

A HEC/ST15, az ECP/ST101 és az EC II/ST147 esetében *bla*_{CTX-M-15}; hat minor klónnál *bla*_{CTX-M}, négy minor klónnál *bla*_{SHV-5} gént mutattunk ki, és egy minor klón *bla*_{CTX-M} és *bla*_{SHV} ESBL génekkel egyaránt rendelkezett.

A HEC/ST15-t és az EC II/ST147-t korábban epidémiás klónként azonosították Magyarországon. Habár az ST101 gyakori CTX-M-15 termelőnek bizonyult számos európai országban (Franciaország, Olaszország és Görögország), jelenlétét Magyarországon jelen vizsgálat igazolta először.

Figyelembe véve, hogy a vizsgált ESBL termelők 95%-a (97/102) *bla*_{CTX-M} gént hordozott, és a többségük (91%, 88/97) a három major klón egyikéhez tartozott; megállapítható, hogy a 2004-2008-as időszakban az emelkedett *ceph*_{all} arányok hátterében elsősorban a *bla*_{CTX-M-15} génnek a három major klón (HEC/ST15, ECP/ST101 és EC II/ST147) expanziójának köszönhető terjedése állhatott.

A különböző ESBL termelő klónoknak a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központon belüli tér és időbeni megoszlását (2. és 3. táblázat) tekintve megállapítható, hogy:

- az ECP/ST101 lehetett a domináns klón 2004-2005 körül, és elsősorban az I. és a II. számú Belgyógyászati Klinikához kapcsolódhatott;
- a HEC/ST15 a vizsgált periódus elején kezdetett túlsúlyra jutni, és idővel a legelterjedtebb klónná vált a Klinikai Központ valamennyi intézetében;
- az EC II/ST147 2007 körül jelenhetett meg intézményünkben, és azóta számos osztályon elterjedté vált;
- a minor klónok az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézetben és egyéb kisebb részlegeken fordultak elő a leggyakrabban.

Habár nem volt lehetőségünk az intézményünkben izolált valamennyi törzset megvizsgálni, és kilenc minor klón esetében az ESBL gén pontos típusának azonosítása is elmaradt, számos helyi sajátságot fedezhettünk fel az ESBL termelő *K. pneumoniae* törzsek molekuláris epidemiológiájában, mikor eredményeinket az országos adatokkal hasonlítottuk össze. Kettő, Magyarországon epidémiás klón (EC III/ST11 és EC IV/ST274) jelenlétét nem tudtuk kimutatni a vizsgálat során, valamint az EC II/ST147 klónt a 2005-ös széleskörű országos elterjedtsége ellenére 2007-ben azonosítottuk először intézményünkben, feltehetőleg későbbi behozatalának vagy alacsony incidenciájának köszönhetően. Vizsgálataink szerint a HEC/ST15 és a CTX-M-15 β -laktamáz volt a domináns klón és ESBL típus, illetve az SHV-5 volt az egyetlen SHV típusú ESBL intézményünkben, ami megfelel az országos adatoknak.

2. táblázat Az ESBL termelő *K. pneumoniae* klónok megoszlása a különböző intézetek között

Intézet	HEC ST15	ECP ST101	EC II ST147	minor klónok
Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet (n=11)	6	0	0	5
I. sz. Belklinika (n=40)	27	9	1	3
II. sz. Belklinika (n=5)	3	1	1	0
Neurológiai Klinika (n=3)	2	0	0	1
Sebészeti Klinika (n=3)	3	0	0	0
Urológiai Klinika (n=35)	27	0	6	2
Egyéb (n=5)	1	0	1	3

3. táblázat Az ESBL termelő *K. pneumoniae* klónok izolálások éve szerinti megoszlása

Év	HEC ST15	ECP ST101	EC II ST147	minor klónok
2004 (n=2)	0	1	0	1
2005 (n=9)	4	5	0	0
2006 (n=17)	12	3	0	2
2007 (n=47)	37	1	2	7
2008 (n=27)	16	0	7	4

Karbapenemáz termelő izolátumok (2009-2011)

Egyetlen kivétellel a 2009-2011-es időszakból származó valamennyi feltételezett karbapenemáz termelő izolátum a korábban azonosított Magyar Epidémiás Klónhoz (HEC) tartozott a PFGE segítségével végzett makrorestrikciós profil meghatározás alapján (1. táblázat). A HEC ST15-be való tartozását az MLST vizsgálat megerősítette. A PCR vizsgálat *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} és *bla*_{VIM} gének jelenlétét igazolta 99, 101, 101 és 100 HEC/ST15 izolátum esetében, melyek a szekvenálás alapján *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-28}, *bla*_{TEM-1}, és *bla*_{VIM-4} génekként kerültek azonosításra. A *bla*_{SHV-28} és *bla*_{TEM-1} géneket már korábban leírták az ST15-ben, és egy másik tanulmányban megállapították, hogy az SHV-28 nem-ESBL típusú β -laktamáz. A VIM-4 egy a metallo- β -laktamázok közé tartozó karbapenemáz. A *bla*_{VIM-4} gén egy 1-es osztályú integronon helyezkedett el, mely az Integrall (integrall.bio.ua.pt) adatbázis alapján az

In238b megjelölést kapta, és az első kazettában az *aac(6')-Ib* gént, a második kazettában pedig a *bla_{VIM-4}* gént hordozta.

Tudomásunk szerint ez volt az első alkalom, hogy VIM-4 metallo- β -laktamáz termelést mutattak ki az országosan elterjedt és helyileg domináns CTX-M-15 termelő HEC/ST15 klónban. A mai napig hat különböző karbapenemáz azonosítottak az ST15-tel összefüggésben: NDM-1-t Kanadában, Franciaországban, Marokkóban és Thaiföldön; OXA-48-at Finnországban, Franciaországban és Spanyolországban; OXA-162-t Dél-Magyarországon; VIM-1-et Spanyolországban; VIM-34-et Portugáliában és VIM-4-et jelen vizsgálat során. Ez a megoszlás két következtetésre ad lehetőséget. Először is, különböző karbapenemáz géneknek az azonos szekvenciatípusban egymástól független előfordulása azt sugallja, hogy az ST15 könnyen vesz fel különféle rezisztencia plazmidokat, és folyamatosan képes alkalmazkodni az antibiotikumok szelektív nyomásának. Másodsor, úgy tűnik, hogy az ST15 VIM-4 termelése a mi régióinkra korlátozódik, ami azt sejteti, hogy ez helyileg alakulhatott ki az országunkban cirkuláló In238b felvétele révén. Az In238b-t korábban *Pseudomonas aeruginosa* (2002), *Aeromonas hydrophila* (2005), *K. pneumoniae* ST11 (2009) és *Klebsiella oxytoca* (2009) törzsekben azonosították Magyarországon, és a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központban való jelenlétét is igazolták *P. aeruginosa* törzsekben 2004-ben. Amikor ez az integron megjelent az intézményünk domináns ESBL termelő *K. pneumoniae* klónjában, a VIM-4 termelés jelentős elterjedését figyelhettük meg. A vizsgálati időszak alatt az 1654 beteg közül, akiknek mintáiból *K. pneumoniae*-t izoláltunk, 101-nél (6.1%) jelen tanulmány során VIM termelést igazoltunk. Az igazoltan VIM termelő törzsek 12 különböző intézetből származtak, ami rámutat a Klinikai Központon belüli széleskörű elterjedésre.

Az egyetlen feltételezetten karbapenemáz termelő, ugyanakkor VIM negatív HEC/ST15 izolátum negatív volt a fenotípusos gátlási próbák során, érzékeny volt valamennyi karbapenem származékkal szemben, és csupán az ertapenem MIC értéke volt az epidemiológiai cut off érték felett. Ezek alapján feltételezhető, hogy a karbapenemáz termelés szűrésére használt módosított Hodge-teszt álpozitív eredményt adott ezen izolátum esetében. A PT-15 pulzotípusba tartozó egyetlen izolátum *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* és *bla_{VIM}* β -laktamáz géneket hordozott.

Ha a molekuláris tipizálás és β -laktamáz gén kimutatás eredményeit összevetjük a *ceph_{all}* és *carb_{all}* adatsorokkal, a szerzett β -laktám rezisztencia mechanizmusok gyakoriságában észlelt változásokkal kapcsolatban a következőket állapíthatjuk meg:

- A *carb_{all}* 2009-2011-es emelkedését a bla_{VIM-4} génnek az országosan elterjedt és regionálisan domináns CTX-M-15 termelő HEC/ST15 *K. pneumoniae* klónban való megjelenésével és klonális elterjedésével magyarázhatjuk.
- A 2010-ben észlelt, országos átlagot meghaladó *ceph_{all}* elsősorban a karbapenemáz termelőknek a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központban való megjelenése által generált többlettel magyarázható tekintve, hogy a karbapenemáz termelők többsége CTX-M-15 enzimet is termelt egyidejűleg.
- A 2010-től megfigyelt, az országos átlagnál magasabb *carb_{all}* jórészt a VIM-4 termelő HEC/ST-15 helyi elterjedésének köszönhető. Ezenfelül az arányok számítási módszerei közötti különbségek is hozzájárulhattak a helyileg magasabb értékekhez, mivel a *carb_{all}* nemcsak a karbapenem nem-érzékeny izolátumok arányát mutatja (mint a Nemzeti Bakteriológiai Surveillance adatai), hanem azokat az izolátumokat is, melyek a karbapenemáz termelés ellenére karbapenem érzékenyek.

A szerzett β -laktám rezisztenciával rendelkező *K. pneumoniae* izolátumok virulenciával kapcsolatos jellegzetességei és antibiotikum érzékenységek

A szerzett β -laktám rezisztenciával rendelkező *K. pneumoniae* klónokat virulencia faktorok és antibiotikum érzékenység szempontjából is megvizsgáltuk annak érdekében, hogy azonosítsuk az esetleges klonális jellegzetességeket. A vizsgálatok és a statisztikai elemzések eredményeit a 4-8. táblázatok tartalmazzák.

Az ESBL termelő klónok virulenciával kapcsolatos jellegzetességei

Virulencia asszociált faktorok tekintetében (4. táblázat) a major klónok esetében néhány általános tulajdonságot figyelhettünk meg: mindháromra nagyfokú biofilm képző képesség és gyakori 1-es típusú fimbria termelés volt jellemző. Ugyanakkor a hipermukoviszkózus fenotípus, K1 (*magA*) vagy K2 (*k2a*) szerotípus és az aerobactin termelés hiányzott vagy rendkívül ritka volt. A közös tulajdonságok mellett számos klonális jellegzetességet is felismerhettünk: a HEC/ST15 izolátumok körében fordult elő leggyakrabban enterobactin és 3-as típusú fimbria termelés; egyedül az ECP/ST101 hordozott *irp2-1* gént (yersiniabactin); és az EC III/ ST147 izolátumok voltak a legkevésbé érzékenyek a szérum baktericid hatásra, illetve Klebsiella Ferric ion Uptake System (*kfuB*) nem volt esetükben kimutatható.

4. táblázat Az ESBL termelő *K. pneumoniae* klónok virulencia asszociált faktor tartalma

	HEC ST15 n=69	ECP ST101 n=10	EC II ST147 n=9	minor klónok n=14	p
„string”-teszt	2 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (14%)	0.245
<i>rmpA</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
<i>magA</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
<i>k2a</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	-
enterobactin	67 (97%)	5 (50%)	6 (67%)	14 (100%)	<0.001
aerobactin	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (7%)	0.566
<i>kfuB</i>	69 (100%)	10 (100%)	0 (0%)	3 (21%)	<0.001
<i>irp2-1</i>	0 (0%)	10 (100%)	0 (0%)	2 (14%)	<0.001
1-es típusú fimbria	67 (99%)*	10 (100%)	9 (100%)	13 (93%)	0.833
3-as típusú fimbria	65 (96%)*	4 (40%)	6 (67%)	6 (46%)	<0.001
biofilm (medián)	3.526	2.112	2.463	1.262	<0.001
szérum rezisztencia, 60 perc (medián)	15.20%	5.40%	62.11%	1.46%	0.005
szérum rezisztencia, 180 perc (medián)	4.41%	4.09%	8.86%	0.09%	0.087

* n=68. Egy izolátumnál autoaggregáció volt megfigyelhető.

Míg egyes tanulmányok azt jelezték, hogy az ESBL termelő *K. pneumoniae* izolátumok (1) gyakrabban fejeznek ki egyidejűleg 1-es és 3-as típusú fimbriát, (2) rezisztensebbek a szérum baktericid hatással szemben vagy (3) nagyobb mértékben adherálnak humán epithel sejtekhez, és ilyen sejtekkel szemben fokozottabb invázióra képesek, mint az ESBL-t nem termelők; ugyanakkor más vizsgálatok arra utaltak, hogy a különböző virulencia faktorok bizonyos klónokhoz vagy rezisztencia plazmidokhoz kapcsolódhatnak. Eredményeink szintén azt sejtetik, hogy a különféle virulencia asszociált faktorok előfordulása klónonként eltérő lehet.

A major klónokban kimutatott virulencia faktorok bizonyítottan fontos szerepet játszanak a következő infekciók kialakításában: az 1-es típusú fimbria húgyúti fertőzésekben, a 3-as típusú fimbria katéterrel összefüggő húgyúti fertőzésekben és a yersiniabactin légúti infekciókban. Ezen virulencia faktorok jelenléte, a multirezisztens fenotípus mellett, hozzájárulhatott ahhoz, hogy ezek az ESBL termelő klónok sikeres nozokomiális kórokozókká váljanak.

Az ESBL termelő klónok antibiotikum érzékenysége

Habár a gentamicin és a tobramycin rezisztencia a major és a minor ESBL termelő klónokban hasonló gyakoriságú volt, az amikacin és a trimethoprim/sulfamethoxazole rezisztencia előfordulása klónonként eltérő volt (5. táblázat).

Míg a major EBSL termelő klónokban a ciprofloxacin rezisztencia általánosan elterjedt volt, addig a minor klónokba tartozó izolátumok többsége (57.1%) az epidemiológiai cut off értékek alapján a vad típusba tartozott. Felvetődött, hogy a ciprofloxacin rezisztencia mértékében való különbségeket a fluorokinolon rezisztencia megszerzésével járó költségek („fitness cost”) befolyásolják, továbbá, hogy a magas szintű rezisztencia kialakulása során az SHV ESBL plazmidok elveszhetnek. Vizsgálataink során az SHV-5 termelő izolátumokban magas szintű ciprofloxacin rezisztenciát nem tapasztaltunk. Az egyetlen rezisztens izolátum alacsony szintű rezisztenciát mutatott (MIC = 2 mg/L), és az ST113-ba tartozott.

A major klónok izolátumainak többsége aminoglikozidokkal és fluorokinolonokkal szemben kombinált rezisztenciát mutatott (ST15: 94%; ST101: 100%; ST147: 100%). A rezisztencia mechanizmusok ilyen fajta kombinációja sokkal ritkábban (36%) fordult elő a minor klónok izolátumai között. A nem- β -laktám antibiotikumokkal szembeni gyakori rezisztencia hozzájárulhatott a karbapenemek túlhasználatához.

5. táblázat Az ESBL termelő *K. pneumoniae* klónok különböző antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája

	HEC ST15 n=69	ECP ST101 n=10	EC II ST147 n=9	minor klónok n=14	p
amikacin	51 (74%)	3 (30%)	8 (89%)	8 (57%)	0.018
gentamicin	11 (16%)	0 (0%)	1 (11%)	0 (0%)	0.070
tobramycin	4 (6%)	0 (0%)	0 (%)	0 (0%)	0.361
trimethoprim/ sulfamethoxazole	38 (55%)	1 (10%)	0 (0%)	9 (64%)	<0.001
ciprofloxacin	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (64%)	<0.001
ciprofloxacin MIC tartomány	≥32 mg/L	≥32 mg/L	4-32 mg/L	0.06-32 mg/L	

A karbapenemáz termelő izolátumok antibiotikum érzékenysége

Vizsgálatunk során a VIM metallo- β -laktamáz okozta karbapenem rezisztencia alacsony szintű volt (6. táblázat). Az izolátumok többségénél az imipenem és a meropenem MIC értékek az érzékeny klinikai breakpoint közelében voltak. Az alacsony szintű rezisztencia megnehezítette a fenotípusos gátlási próbákkal való kimutatást, amit az alacsonyabb MIC értékek mellett tapasztalt meropenem és meropenem + dipikolinsav (metallo- β -laktamáz gátló szer) zóna átmérő közötti kisebb különbségek is jeleznek (7. táblázat). Ez megmagyarázza, hogy az izolátumok egy jelentős része (51,0%) miért volt negatív metallo- β -laktamázokra a fenotípusos gátlási próba során, annak ellenére, hogy a VIM enzim termelődése a módosított Hodge-teszttel kimutatható volt. Tekintettel a VIM enzim által biztosított alacsony szintű karbapenem rezisztenciára, az EUCAST által karbapenemáz szűrésre javasolt meropenem epidemiológiai cut off értékek használata, a módosított Hodge-teszt alkalmazása és a három karbapenem származékkal szembeni érzékenység egyidejű vizsgálata előnyös lehet a VIM termelés kimutatása szempontjából.

6. táblázat VIM termelő *K. pneumoniae* izolátumok karbapenem érzékenysége (n=101)

	Ertapenem	Imipenem	Meropenem
tartomány (mg/L)	0.5-32	0.25-32	0.12-32
MIC ₅₀ (mg/L)	4	2	1
MIC ₉₀ (mg/L)	32	32	2
érzékeny	7 (6.9%)	57 (56.4%)	91 (90.1%)
mérsékelten érzékeny	10 (9.9%)	18 (17.8%)	8 (7.9%)
rezisztens	84 (83.2%)	26 (25.7%)	2 (2.0%)
ECOFF felett	101 (100%)	61 (60.4%)	95 (94.1%)

ECOFF = epidemiológiai cut off érték

Karbapenemáz termelő *K. pneumoniae* izolátumok által okozott súlyos, életveszélyes fertőzésekben antibiotikum kombináció adása javasolt. Ha az izolátum karbapenem MIC értéke ≤ 4 mg/L, megfontolandó egy karbapenem alapú terápia. Ez a feltétel 100/101 (99.0%) VIM pozitív izolátum esetében teljesült, ezáltal más szerekkel (mint például colistin, tigecycline, fosfomicin, chloramphenicol, fluorokinolonok vagy aminoglikozidok) kombinálva terápia alternatívát jelenthetnek.

7. táblázat A fenotípusos gátlási próba során tapasztalt metallo- β -laktamáz (MBL) pozitivitas aránya és meropenem ill. meropenem + dipikolinsav zónaátmérők közötti átlagos különbségek a meropenem MIC érték függvényében

Meropenem MIC (mg/L)	n	Boronsav		Dipikolinsav		Cloxacillin		MBL pozitív (%)
		átlag (mm)	SD	átlag (mm)	SD	átlag (mm)	SD	
0.12	6	-0.8	1.169	2.2	0.983	0.0	0.693	0.0
0.25	21	0	1.284	2.8	1.209	0.6	1.284	14.3
0.5	21	0.4	1.284	4.6	1.028	1.1	0.944	52.4
1	30	0.6	1.382	4.8	1.315	1.5	1.042	63.3
2	13	0.4	0.870	4.9	1.256	1.2	1.235	69.2
4	8	0.3	1.753	4.9	0.991	1.0	1.512	75.0
32	2	0.5	0.707	6.0	1.414	0.0	0.0	100.0
összesen	101	0.3	1.300	4.2	1.567	1.0	1.177	49.0

SD = szórás

Vizsgálatunk során a colistin rezisztencia ritka volt (1/82), és nem volt olyan izolátum, mely tigecyclinre rezisztens lett volna (8. táblázat). A jó in vitro aktivitásuk ellenére mind a colistin, mind a tigecyclin számos hátránnyal rendelkezik. A colistin nefro- és neurotoxikus, azonban az újabb adagolási ajánlások valamelyest mérséklék ezt a problémát. A tigecyclin csupán három kórkép (komplikált hasúri infekciók, komplikált bőr és légysz rész infekciók és közösségben szerzett pneumonia) kezelésére lett jóváhagyva, és nincs indikációja szepszisben, lélegeztetéssel összefüggő pneumoniában vagy húgyúti infekcióban.

Az izolátumok közel két harmada (65,9%) érzékeny volt fosfomicinre, és ezáltal egy lehetséges alternatívát kínál húgyúti fertőzések kezelésére, azonban csak per os készítmény formájában, rövid idejű kezelések céljából adható. A per os kezelést az EUCAST csak nem komplikált húgyúti infekciók kezelésére javasolja.

A magas arányú rezisztencia (48,8%) és súlyos toxicitás szűkíti a chloramphenicolnak a karbapenemáz termelő *K. pneumoniae* izolátumok által okozott fertőzések kezelésében való felhasználhatóságát.

Minden izolátum rezisztens volt ciprofloxacinra, ami valamennyi fluorokinolon származékkal szembeni keresztrezisztenciát jelent. A HEC/ST15 esetében a fluorokinolon rezisztencia hátterében a *gyrA* és a *parC* gének mutációit mutatták ki korábban.

8. táblázat A VIM termelő *K. pneumoniae* izolátumok nem- β -laktám antibiotikumokkal szembeni érzékenysége, n=82 (S = érzékeny, I = mérsékelten érzékeny, R = rezisztens)

	tartomány	MIC ₅₀	MIC ₉₀	S	I	R
ciprofloxacin	-	-	-	0 (0%)	0 (0%)	82 (100%)
gentamicin	-	-	-	6 (7.3%)	0 (0%)	76 (92.7%)
tobramycin	-	-	-	0 (0%)	0 (0%)	82 (100%)
amikacin	4-16 mg/L	8 mg/L	16 mg/L	66 (80.5%)	16* (19.5%)	0 (0%)
chloramphenicol	2-256 mg/L	8 mg/L	64 mg/L	42 (51.2%)	-	40 (48.8%)
colistin	0.5-4 mg/L	1 mg/L	1 mg/L	81 (98.8%)	-	1 (1.2%)
tigecycline	0.03-2 mg/L	0.5 mg/L	2 mg/L	66 (89.5%)	16 (19.5%)	0 (0%)
fosfomicin	4-256 mg/L	16 mg/L	256 mg/L	54 (65.9%)	-	28 (34.1%)

* Hat izolátum esetében az amikacin érzékenységi eredményeket érzékenyről mérsékelten érzékenyre módosítottuk az EUCAST 12.7-es szakmai szabálya alapján.

Az aminoglikozidok használhatóságát megkérdőjelezi az *aac(6')-Ib* génnek az In238b integronon való jelenléte. Az AAC(6')-I enzim képes módosítani az amikacint és a tobramycint. Valamennyi izolátum rezisztens volt tobramycinre, de csak tíznek volt az amikacin MIC értéke a nem-érzékeny tartományban. Az EUCAST 12.7-es szakmai szabálya azt ajánlja, hogy az amikacin érzékenységi eredményeket érzékenyről mérsékelten érzékenyre módosítsuk, ha az izolátum tobramycin rezisztens és gentamicin érzékeny annak érdekében, hogy jelezzük az amikacin AAC(6')-I enzim általi modifikáció lehetőségét. Ezt a szabályt hat izolátum esetében tudtuk alkalmazni, azonban 66 esetben nem teljesült a leírt fenotípus, mivel azt valószínűleg egy gentamicin módosító enzim elfedte.

A molekuláris tipizálás és az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok alapján megállapíthatjuk, hogy ha az intézményünkben egy karbapenemáz termelő *K. pneumoniae* izolátum által okozott súlyos infekció gyanúja merül fel, egy imipenem vagy meropenem és colistin vagy tigecycline kombináció adható első vonalbeli empirikus terápiaként.

Új eredmények

- A CTX-M-15 termelő, nemzetközileg elterjedt ST101 *K. pneumoniae* klón első leírása Magyarországon.
- A VIM-4 metallo- β -laktamáz termelés első kimutatása ST15 *K. pneumoniae* klónban.
- Egy új *infB* allél (sorszám: 83) és szekvenciatípus (ST1193, allél profil: 2-83-2-1-9-4-135) azonosítása *K. pneumoniae*-ban.
- A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjában izolált *K. pneumoniae* törzsek szerzett β -laktám rezisztencia mechanizmusainak gyakoriságában bekövetkezett változások első átfogó vizsgálata.
- A különböző multirezisztens *K. pneumoniae* klónok Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központján belüli elterjedtségének első felmérése.
- A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központban izolált multirezisztens *K. pneumoniae* klónok virulencia asszociált jellegzetességeinek első leírása.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként *Mestyán Gyulának* szeretném kifejezni a legmélyebb hálámot a klinikai mikrobiológiában való képzésemért és a folyamatos szakmai támogatásáért.

Szeretném megköszönni *Kerényi Monikának* és *Emődy Leventének* a fokozat szerzési eljárás során adott útmutatásaikat. Ezenfelül hálás vagyok *Emődy Leventének*, hogy munkánkat anyagilag támogatta, és hogy kézirataimat és absztraktjaimat mindig nagyon alaposan átnézte.

Köszönöm témavezetőimnek *Schneider Györgynek* és *Tigyi Zoltánnak*, hogy megismertettek a tudományos munka alapjaival; *Almási Istvánnak*, hogy bepillantást engedett számomra az infékciónak mindennapi gyakorlatába; *Denke Ildikónak*, *Lajkó Rózsának*, *Veláncsics Mariannának* és *Oldal Miklósnak* a technikai segítségüket; kollégáimnak *Nyul Adriennek*, *Kovács Krisztinának*, *Patkó Brigittának* és *Gám Tamásnak*, hogy mentesítettek a feladataim alól, amíg az értekezésemet készítettem; és PhD hallgató társaimnak, *Szűjártó Valériának*, *Kovács Beátának*, *Kovács Juditnak*, *Dorn Ágnesnek*, *Felső Péternek*, *Kindl Máriának* és *Horváth Mariannának*, hogy folyamatosan inspiráltak a PhD tanulmányaim során.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni szerető páromnak, *Novák Péternek*, és gondoskodó családomnak, hogy a mindennapok nehézségei során önzetlenül segítettek és támogatták munkámat.

Közlemények jegyzéke

Melegh S, Schneider G, Horváth M, Jakab F, Emődy L, Tigyi Z. "Identification and characterization of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* clone ST101 in a Hungarian university teaching hospital." *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2015 Sep; 62(3):pp233-245.

Melegh S, Kovács K, Gám T, Nyul A, Patkó B, Tóth A, Damjanova I, Mestyán G. "Emergence of VIM-4 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 clone in the Clinical Centre University of Pécs, Hungary." *Clinical Microbiology and Infection* 2014 Jan; 20(1):O27-9.

Konferencia absztraktok jegyzéke

Melegh S, Kovács K, Gám T, Nyul A, Patkó B, Tóth A, Damjanova I, Mestyán G. "Emergence of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in the Clinical Centre University of Pécs, Hungary." *8th International Healthcare Infection Society Conference and Federation of Infection Societies Annual Conference*, 2012 november, Liverpool

Melegh S, Kovács K, Gám T, Nyul A, Patkó B, Damjanova I, Mestyán G. "A PTE klinikáin izolált karbapenem rezisztens *Klebsiella pneumoniae* törzsek karakterizálása: detektálási nehézségek és terápiás alternatívák." *Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 40. Kongresszusa*, 2012 szeptember, Budapest

Melegh S, Kovács K, Schneider G, Emődy L, Tigyi Z. "A *Klebsiella pneumoniae* törzsek rezisztenciájának változása a PTE klinikáin 2002-2010 között." *Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 39. Kongresszusa*, 2011 szeptember, Pécs

Melegh S, Schneider G, Veláncsics M, Damjanova I, Emődy L, Tigyi Z. "Dominancy of the N/ST15 pulsotype of extended spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the University Hospital of Pécs between 2004-2009." *Magyar Mikrobiológiai Társaság XVI. Nemzetközi Kongresszusa*, 2011 július, Budapest

Melegh S, Schneider G, Emődy L, Tigyi Z. "Evaluation of clonal diversity, biofilm formation and type 3 fimbria production by Extended Spectrum β -Lactamase positive *Klebsiella pneumoniae* isolates." *Magyar Mikrobiológiai Társaság 2010. Évi Nagygyűlése*, 2010 október, Keszthely

Melegh S, Tigyi Z, Schneider G, Emődy L. "Biofilm formation and type 3 fimbria production by Extended Spectrum β -Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* strains." *Pathogenomics – From basic research to practical applications*, 2010 április, Pécs

Melegh S, Tigyi Z, Emődy L, Schneider G. "Characterisation of extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Klebsiella pneumoniae* strains." *2nd Central European Forum for Microbiology*, 2009 október, Keszthely