

**Egészségügyi ellátással kapcsolatos fertőzések
gyógyszer-rezisztens bakteriális kórokozóinak
antibiotikum érzékenysége és molekuláris
epidemiológiája**

Doktori tézisek

Dr. Glatz Katalin

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szabó Dóra D.Sc.

Hivatalos bírálók:

Dr. Damjanova Ivelina Ph.D.

Dr. Ostorházi Eszter Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Cseh Károly D.Sc.

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sipeki Szabolcs Ph.D.

Dr. Urbán Edit Ph.D., Med. Habil.

Budapest

2012

BEVEZETÉS

Az egészségügyi ellátással kapcsolatos fertőzések napjainkban egyre nagyobb problémát okoznak.

A multirezisztens kórokozók által okozott egészségügyi ellátással kapcsolatos fertőzések megjelenése is egyre nagyobb jelentőséggel bír.

A szerző kezdeményezett/irányított, lefolytatott vizsgálatokat, illetve részt vett vizsgálatokban, amelyek az egészségügyi ellátással kapcsolatos fertőzések magyarországi drog-rezisztens kórokozói antibiotikum érzékenységének, illetve molekuláris epidemiológiájának megismerésére irányultak.

A tézis füzet az alábbi, a szerző Ph.D. dolgozatában részletesen ismertetett, a szerző által (vagy részben a szerző által) végzett vizsgálatok célkitűzéseit, módszereit, eredményeit, valamint a vizsgálatokból levonható következtetéseket foglalja össze:

1. Extrém magas szintű penicillin és cefotaxim rezisztencia, valamint magas szintű levofloxacin rezisztencia megjelenése *Streptococcus pneumoniae* klinikai izolátumokban Magyarországon,
2. Magyarországon és Szerbiában, klinikai mintákból izolált vancomycin-rezisztens *Enterococcus spp.* törzsek molekuláris vizsgálata,
3. egy kórházi járvány kivizsgálása: multirezisztens *Acinetobacter baumannii* izolátumok antibiotikum érzékenységi és molekuláris epidemiológiai vizsgálata,
4. SHV-2a termelő *Enterobacter cloacae* felbukkanása Magyarországon,
5. a nemzeti ESBL surveillance *Enterobacter* fajokra vonatkozó eredményei (2002-2004), az első bejelentett ESBL termelő *E. cloacae* járvány járványtörzsének vizsgálata,
6. multirezisztens *Enterobacter cloacae* klinikai izolátumok cyclohexán toleranciája, Phe-Arg- β -naphtylamid érzékenysége, egyetlen PFGE klón dominanciája harmadik-generációs cephalosporin- és fluorokinolon-rezisztens izolátumok körében, egy országos vizsgálat eredményei.

CÉLKITŰZÉSEK

1. A vizsgálat célja Magyarországon 2000-ben gyűjtött *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) klinikai izolátumok antibiotikum érzékenységének vizsgálata volt, illetve a vizsgálat egy további célja volt a penicillin, a cefotaxim, és a levofloxacin MIC értékek együttlváltozásának vizsgálata.
2. A vizsgálat célja Magyarországon és Szerbiában, klinikai mintákból izolált vancomycin-rezisztens *Enterococcus spp.* (VRE) törzsek molekuláris epidemiológiai vizsgálata volt, hogy meghatározzuk egyrészt egymáshoz való genetikai viszonyukat kórházi epidemiológiai célból, másrészt a korábban a kórházi járványok hátterében világszerte azonosított genetikai vonalhoz (CC-17) való genetikai viszonyukat, ami globális epidemiológiai szempontból jelentős.
3. Az *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) az egészségügyi ellátással kapcsolatos fertőzések egy fontos kórokozója, főleg az intenzív osztályokon, ahol a betegek gyakran kolonizálódnak, majd fertőződnek. Mivel ubiquiter baktérium, általában jelen van a kórházi környezetben, ezért nem meglepő, hogy megfelelő járványügyi tipizáló módszer hiányában a fertőzések forrása ismeretlen maradt a molekuláris technikák kora előtt. Vizsgálatunk célja egy

hazai kórházban zajló járvány multirezisztens törzseinek molekuláris epidemiológiai vizsgálata volt, hogy segítsük a kórházi epidemiológiai kivizsgálást és a járvány megfékezését.

4. A vizsgálat célja egy multirezisztens *E. cloacae* törzsekből álló törzsgyűjtemény vizsgálata volt, melynek törzsei egyetlen hazai perinatális intenzív centrumból származtak, egyetlen évből: 1998-ból.
5. A nemzeti ESBL surveillance-t az OEK kezdeményezte 2001-ben. A következő három évben a surveillance-ban résztvevő 25 hazai mikrobiológiai laboratórium 85 *Enterobacter sp.* törzset küldött ESBL termelés konfirmálására. A jelen vizsgálat célja a konfirmált ESBL törzsek molekuláris epidemiológiájának vizsgálata volt. Vizsgálatunk egy további célja volt az első ESBL termelő *E. cloacae* járványtörzs által hordozott ESBL plazmid rezisztencia determinánsainak vizsgálata.
6. A vizsgálat célja egy országos vizsgálat során egészségügyi intézményekből gyűjtött harmadik-generációs cephalosporin- és fluorokinolon-rezisztens, multirezisztens *E. cloacae* izolátumok cyclohexán toleranciájának, Phe-Arg- β -naphtylamid (PA β N) érzékenységeinek vizsgálata volt.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. 327, klinikai mintákból 2000-ben izolált *S. pneumoniae* törzs penicillin érzékenységét vizsgáltuk 1 µg-os oxacillin koronggal. 207 törzset (63.3%) találtunk penicillin érzékenynek (PS). A maradék 120 törzs (36.7%) penicillin MIC értékeit E-teszttel vizsgáltuk. Az utóbbi módszerrel további 19 törzset találtunk penicillin érzékenynek, míg 71 törzset (22.3%) penicillin mérsékelten-érzékenynek (IPS), 30 törzset (8.9%) pedig penicillin rezisztensnek (PR). Az IPS és a PR törzseket vizsgáltuk tovább cefotaxim and levofloxacin E-teszttel.
2. A törzsek fajszerű azonosítása és a *van* gének kimutatása PCR vizsgálattal történt az összes izolátum esetében (n=65). A VRE izolátumok (n=36) molekuláris epidemiológiai vizsgálata első lépésben PFGE módszerrel, majd a PFGE vizsgálat által azonosított típusokat (A, B, C, D, E) reprezentáló izolátumok MLVA (multiple locus variable-number tandem repeat analysis) és MLST vizsgálatával történt.
3. Vizsgálatunk során összesen 18 (13 fertőzött, 2 kolonizált betegtől, és 3, a kórház higiéniai vizsgálat során a környezetben izolált) törzset vizsgáltunk molekuláris epidemiológiai módszerekkel. Az osztályon 2003-ban egy kis járvány zajlott, ennek kapcsán történt a kórház-

higiéniai kivizsgálás. Mivel nem állt rendelkezésünkre elegendő adat a különböző molekuláris tipizáló módszerek diszkrimináló képességéről hazai izolátumok esetében, ezért az összes törzset megvizsgáltuk nem csak az arany standard módszerrel (PFGE), hanem gyakran használt PCR alapú tipizálási módszerekkel is (AP-PCR ERIC-2 primerekkel és RAPD DAF-4 primerrel). A törzsek class-1 integron mintázatát is megvizsgáltuk PCR technikával, mivel a törzsek kórházi járványt okoztak és egyes class-1 integronok jelenléte mások korábbi vizsgálatait szerint a törzsek epidémiás potenciálját jelezheti.

4. Vizsgáltuk az összes izolátum antibiotikum érzékenységét és ERIC mintázatát (korongdiffúziós módszerrel és ERIC-2 primerekkel). A reprezentatív törzseket (n=54) tovább vizsgáltuk PFGE módszerrel. A hét ESBL termelő izolátumot (6 beteg izolátumai) továbbvizsgáltuk plazmid elektroforézis, class-1 integron PCR és PCR-szekvenálás módszerekkel.
5. Az ESBL termelés confirmálása kettős korong diffúziós módszerrel, ESBL E-teszttel és PCR alapú vizsgálatokkal történt. A confirmált ESBL törzsek molekuláris epidemiológiai vizsgálata pedig ERIC-PCR vizsgálattal, ERIC-2 primerekkel. Az első járvány izolátumait PFGE, plazmid elektroforézis, IEF, és PCR-szekvenálás módszerekkel is megvizsgáltuk, valamint *in vitro*

konjugációs kísérletekbe is bevontuk. A transzkonjugánsokat ugyanezekkel a technikákkal vizsgáltuk, továbbá plazmid restrikciós analízisnek is alávetettük. MIC meghatározást és specifikus PCR vizsgálatokat végeztünk párhuzamosan a donor törzseken és a transzkonjugánsokon, hogy a konjugációval átvihető rezisztencia determinánsokat meghatározzuk.

6. 113 multirezisztens (1997 és 2005 között izolált) törzset vizsgáltunk korongdiffúziós teszttel, ERIC-PCR, és *Xba*I PFGE módszerrel. A reprezentatív izolátumokat (n=67) vizsgáltuk tovább cyclohexánnal és PA β N-nel, szubsztrátként ciprofloxacint alkalmazva. 39 izolátum esetében chloramphenicol és tetracyclin MIC-et is vizsgáltunk.

EREDMÉNYEK

1. A 68 vizsgált IPS törzs közül (a további 3 IPS törzs a vizsgálat során kipusztult) 45, 21, illetve 2 volt cefotaximra érzékeny, mérsékelten érzékeny, illetve rezisztens. A 28 túlélő PR törzs közül 2, 8, és 18 volt cefotaximra érzékeny, mérsékelten-érzékeny, illetve rezisztens. A 28 PR illetve 68 IPS törzs közül, amelyek a légúti mintákból lettek izolálva 85-öt találtunk érzékenynek, 7-et (7.2%) mérsékelten érzékenynek és 4-et (4.1%) rezisztensnek levofloxacinra. Az utóbbi 4 törzs egy olyan klinika fekvő betegeinek mintáiból lett izolálva, ahol a levofloxacint 1999 ősze óta használták. A penicillin és cefotaxim MIC értékek között szoros pozitív, a levofloxacin és a β -lactam antibiotikumok MIC értékei között gyenge pozitív korrelációt találtunk.
2. A Budapesten, egy hematológiai osztályon 2003 Augusztus és 2004 December között vérből, vizeletből és székletből izolált VanB VRE törzsek makrorestrikciós profilját vizsgálva ≥ 87.5 % hasonlóságot találtunk, ami a törzsek monoklonális eredete mellett szól (PFGE típus A). A PFGE B típusúhoz tartozó törzsek egy kis járvány során lettek izolálva, a kistarcsai kórházban; a PFGE C típusúhoz tartozó törzs egy sporadikus esetből származott, amit egy másik budapesti kórházban észleltek. A belgrádi kórházból származó *vanA* pozitív izolátumok vizsgálatával egy olyan, 6 kórházi részleget érintő járványra derült fény, amelyet két

PFGE klón (D és E típusok) okozott. A két *vanA* pozitív *E. gallinarum* hemokultúra izolátum, amiket szintén a belgrádi kórházban izoláltak, szintén szoros genetikai rokonságot mutatott PFGE vizsgálattal. A magyarországi VanB *E. faecium* járványtörzs MLVA és MLST vizsgálata igazolta, hogy ez a CC-17 genetikai vonalhoz tartozik.

3. Míg a PCR alapú tipizálási eljárásokkal 3 teljesen egybevágó csoportot lehetett megkülönböztetni, PFGE vizsgálattal az egyik PCR típuson belül, ami a 2002-es és 2003-as izolátumok között is előfordult, két típust lehetett megkülönböztetni az izolálás éve szerint.
4. A 7 ESBL termelő izolátum a PFGE vizsgálatot kivéve minden vizsgálati módszerrel ugyanolyan eredményt adott, de a PFGE vizsgálattal is egy klónhoz tartozónak bizonyult. Az ESBL termelő törzsek egy ~62 Md súlyú plazmidot és két class-1 integront (0.9 kb, 1.875 kb) tartalmaztak. A PCR-szekvenálás a járványtörzsben *bla_{SHV-2a}* gént azonosított. A többi reprezentatív izolátum, egy kivétellel, egyetlen további PFGE típushoz tartozott.
5. A 85 beküldött *Enterobacter sp.* izolátum közül 41 (48 %) bizonyult ESBL termelőnek a megerősítő vizsgálatok során, az ESBL termelő törzsek száma a vizsgálati periódus 3 évében évről évre nőtt. A törzsek között ESBL termelő *E. cloacae* izolátumok sokkal gyakrabban fordultak elő (n=36), mint *E. aerogenes* izolátumok (n=5). Mind a 4 kis járványt

(ezek mindegyike 2 vagy 3 beteget érintett), amelyre az ERIC-PCR vizsgálatok fényt derítettek, *E. cloacae* törzs okozta. A további 23 eset sporadikusnak bizonyult. Az első járványtörzsön végzett vizsgálatok eredményei egybehangzóan SHV-2a termelésre utaltak. A konjugatív ESBL plazmid aminoglikozid és tetracyclin rezisztencia gént is hordozott.

6. Az izolátumok 44%, 19%, 17%, illetve 15%-a származott a húgy-utakból, vérből, a légutakból, illetve sebfertőzésekéből. 81 eset nozokomiálisnak bizonyult. Négy ERIC-típust (A, B, C, D) lehetett megkülönböztetni, de 109 izolátum az epidémiás A típushoz tartozott. A PFGE vizsgálatok eredményei igazolták ezek monoklonális eredetét. 42 beteg mintái származtak abból a 4 járványból, amit az A típus okozott. A ciprofloxacinnal szembeni MIC értékek legalább 4-szeres csökkenése volt megfigyelhető PA β N jelenlétében a reprezentatív izolátumok 79%-ában (ezek az A, C, és D típusokhoz tartoztak); a ciprofloxacinnal szembeni MIC értékek legalább 8-szoros csökkenése (PA β N+) volt megfigyelhető PA β N jelenlétében a reprezentatív izolátumok 37%-ában (ezek az A, és a C típusokhoz tartoztak) A reprezentatív izolátumok 85%-a volt cyclohexán toleráns.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. A légúti *S. pneumoniae* izolátumok penicillin érzékenységét MIC meghatározással javasolt vizsgálni. Vizsgálatunk során elsőként a világon, pozitív korrelációt találtunk *S. pneumoniae* törzsek levofloxacin és β -lactam antibiotikumokkal szembeni MIC értékei között. Vizsgálatunk során extrém magas szintű penicillin és cefotaxim rezisztenciájú valamint magas szintű levofloxacin rezisztenciájú törzsek megjelenését észleltük, először Magyarországon.
2. Vizsgálatunk a hazai és szerbiai esethalmozódások háttérben járványokat talált, igazolta továbbá, hogy az első hazai kórházi VRE járványt is a pándémiás CC-17 genetikai vonal okozta és ezzel egy újabb régióval növelte a világ azon részét, ahol a CC-17 előfordulását már leírták.
3. Összehasonlítva a molekuláris epidemiológiai módszerek eredményeit a klinikai epidemiológiai adatokkal, az alkalmazott módszerek közül kórházi epidemiológia célokra a PFGE vizsgálat bizonyult a legjobbnak. Vizsgálataink eredményei igazolták, hogy 2003-ban ugyanaz a törzs kolonizált további két beteget, ami két beteget megfertőzött. Vizsgálataink eredményei igazolták továbbá, hogy a multirezisztens törzs, ami kórházi fertőzéseket okozott az osztályon 2002-ben, hónapokon át perzisztált a

környezetben, ugyanis még a 2003-as kórház-higiénés vizsgálat alkalmával is kimutatható volt a környezetben. A 2002-ben és 2003-ban izolált, azonos PCR típushoz tartozó törzsek nemcsak különböző PFGE típusokhoz tartoztak, hanem class-1 integron mintázatuk is különbözőnek bizonyult. Összehasonlítva a járványtörzs class-1 integron szekvencia adatait a nemzetközi adatbázis adataival, egy más országban már korábban leírt epidémiás típus megjelenése feltételezhető Magyarországon. Ez megmagyarázhatja a PCR alapú technikák alacsonyabb diszkriminációs képességét vizsgálatunk során.

4. A molekuláris epidemiológiai vizsgálatok igazolták, hogy a perinatális intenzív centrumban egy nagy járvány zajlott, amely 94 koraszülöttet érintett. Tekintettel a klinikai epidemiológiai adatokra, valamint eredményeinkre valószínűsíthető, hogy egy 6 beteget érintő ESBL járvány is zajlott ugyanabban az időszakban az osztályon. Ez az első leírás Magyarországon izolált SHV-2a termelő *E. cloacae* törzsről.
5. Az esetek több mint 2/3-a sporadikus volt. Csak kis járványok fordultak elő. Epidémiás típust (amely legalább két alkalommal legalább két összefüggő esetet okozott) nem találtunk, a járványtörzsek kérészetűek voltak. Az első járványtörzs ESBL plazmidja *bla_{SHV-2a}*, *aac-III/2*, és *tetA* géneket hordozott. Ugyan a *tetA* az *Enterobacteriaceae*

család tagjai körében gyakran előfordul, előfordulása *E. cloacae* törzsekben szokatlan. Eredményeink ezért az ESBL plazmid *E. cloacae* és más fajok közötti *in vivo* terjedésére utalnak.

6. Vizsgálatunkban, a világon először, széles körben elterjedt cyclohexán-toleráns vagy PA β N+ *E. cloacae* törzseket írtunk le. Ezek a tulajdonságok olyan mechanizmusok indikátorai, amelyek segíthettek a baktériumok túlélésében, kórházi környezetben, és így hozzájárulhattak az A-típusú törzsek elterjedéséhez ország szerte.

Saját publikációk jegyzéke
(a Ph. D. értekezés témájához kapcsolódó
közlemények)

Glatz K, Szabó D, Szabó G, Boriszova D, Rozgonyi F. (2001) Emergence of extremely high penicillin and cefotaxime resistance and high-level levofloxacin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *J Antimicrob Chemother*, 48(5): 731-734.

Glatz K, Tóth A, Pászti J. (2007) Emergence of SHV-2a producing enterobacter cloacae in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 54(2): 151-158.

Glatz K, Tóth A, Pászti J. (2011) The cyclohexane tolerance and Phe-Arg- β -naphthylamide susceptibility of multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* clinical isolates, and the predominance of one PFGE clone in Hungary. *Clin Microbiol Infect*, 7(8): 1254-1261.

Saját publikációk jegyzéke (egyéb publikációk)

Jeney C, Banizs B, Dobay O, Glatz K, Huszár T, Adám E, Nász I. (2002) The endosomal epsilon-coatomer protein is involved in human adenovirus type 5 internalisation. *Acta Vet Hung*, 50(4):481-489.

Glatz K, Danka J, Kucsera I, Pozio E. (2010) Human trichinellosis in Hungary from 1965 to 2009. *Parasite*, 17(3): 193-198.

Glatz K, Danka J, Tombác Zs, Bányai T, Szilágyi A, Kucsera I. (2012) An outbreak of trichinellosis in Hungary. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 59(2): 225-238.