

Colistin-rezisztencia vizsgálata Gram-negatív baktériumokban

Doktori tézisek

Dr. Kádár Béla

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szabó Dóra, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kónya József, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Sipeki Szabolcs, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Cseh Károly, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pálos Gábor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Sinkó János, Ph.D., főorvos

Budapest
2017

BEVEZETÉS

Az antibiotikum-rezisztens kórokozók világszerte egyre nagyobb egészségügyi problémát jelentenek. A WHO előrejelzése szerint 2050-re az antibiotikum-rezisztens mikrobák évente tízmillió fő halálát fogják okozni, amelyből 390,000 fő Európára jut. A multidrug-rezisztens és extenzíven drug-rezisztens Gram-negatív kórokozók által okozott infekciók jellemzően nozokomiális fertőzések – katéter-asszociált húgyúti infekciók, intravénás eszközök használatával összefüggő véráramfertőzések, a tartós fekvés illetve gépi lélegeztetés következtében kialakuló alsó légúti infekciók. A főbb kórokozók a nem-fermentáló Gram-negatív baktériumok (*Acinetobacter* fajok, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*) és az *Enterobacteriaceae* család tagjai (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, valamint *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter* fajok), a Gram-pozitívok közül pedig a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) és a vancomycin-rezisztens *Enterococcus* törzsek. Ezen baktériumok az évtizedek során egyre nagyobb mértékben váltak rezisztenssé a különböző antibiotikum-családokkal szemben.

A multirezisztens Gram-negatív baktériumtörzsek okozta infekciók kezelésére a lehetőségek korlátozottak. A régebb óta létező antibiotikumok közül reneszánszukat élik a polymyxinek (polymyxin B és colistin), a nitrofurantoin és a fosfomicin, de ezen hatóanyagok mellett újabb antimikrobiális szerek is rendelkezésre állnak, pl. a tigecyclin, a ceftazidim/avibactam és a ceftolozan/tazobactam.

A polymyxinek az utóbbi években intenzív kutatás tárgyát képezték szelektív Gram-negatív ellenes hatásuk miatt, mint a multirezisztens baktériumok elleni „végső mentés” antibiotikumok. Gyér használatuk miatt a múltban kevésbé volt jellemző a velük szembeni szerzett rezisztencia, azonban gyakoribb alkalmazásuk hozzájárult a rezisztens törzsek megjelenéséhez (mivel a klinikai gyakorlatban a colistint szélesebb körben használják, mint a polymyxin B-t, a „colistin-rezisztencia” kifejezés terjedt el). E törzsek egyúttal megnövekedett toleranciát mutattak antimikrobiális peptidokkal szemben. A rezisztencia molekuláris alapja a Gram-negatív baktériumok külső membránját alkotó lipopoliszacharid enzimatisz módosítása, mely által a külső membrán elektrosztatikusan taszítja a polymyxin-molekulákat. A módosítás a szabad foszfátcsoportok foszfoetanolamin- illetve 4-amino-4-dezoxi-L-arabinóz-addíciója

révén valósul meg. A katalizáló enzimek expresszióját többszintű szabályozórendszer befolyásolja: (i) a közvetlen regulációt a PmrA-PmrB rendszer végzi – aktiválja a foszfoetanolamin-addícióért felelős enzimek génjeinek (*pmrC*, *cptA*) és a 4-amino-4-dezoxi-L-arabinóz szintéziséért és addíciójáért felelős *arn* operon expresszióját, (ii) a PhoP-PhoQ rendszer a PmrD kapcsolófehérjén keresztül a PmrA-PmrB aktivitását fokozza, (iii) az MgrB membránfehérje a PhoP-PhoQ rendszer működését stimulálja. A felsorolt fehérjék mind kromoszomális gének termékei, azonban 2015-ben azonosították az első plazmidon kódolt, azaz mobilis colistin-rezisztencia gént, a foszfoetanolamin-transzferáz aktivitású enzimeket kódoló *mcr*-géncsalád első képviselőjét.

A colistin-rezisztens törzsek okozta fertőzések kezelésének egyik lehetséges módja az antibiotikum-kombinációk alkalmazása. A polymyxinek és a rifampicin kettősének *in vitro* szinergizmusát számos kísérletben igazolták colistin-rezisztens Gram-negatív baktériumokkal szemben, a colistin–imipenem és colistin–meropenem kombinációk pedig carbapenemáz-termelő *K. pneumoniae* törzsekkel szemben bizonyultak hatékonyak. A colistin és tetracyclin kombinációját *in vivo* sikerrel alkalmazták pánrezisztens *K. pneumoniae* által okozott véráramfertőzés kezelésére.

Kutatásaink során vizsgáltuk a Magyarországon izolált, szerzetten colistin-rezisztens baktériumtörzsek érzékenységet antibiotikum-kombinációkkal szemben, a rezisztenciájuk háttérében álló genetikai tényezőket, toleranciájukat kationos antimikrobiális peptidokkal szemben, valamint külső membrán fehérjék összetételének megváltozását.

CÉLKITŰZÉS

- Meghatározni a rendelkezésünkre álló törzsek érzékenységét különböző antibiotikumokkal szemben.
- A colistin-rezisztens törzsek ellen *in vitro* hatékony, szinergista kölcsönhatású antibiotikum-kombinációk keresése.
- Megvizsgálni a colistin-rezisztens törzsek érzékenységét laktoferrinnel, lizozimmal és protaminnal szemben.
- PCR-ral azonosítani a colistin-rezisztencia kialakulásában szerepet játszó gének (*phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrD*, *mgrB*, *mcr-1*) jelenlétét, majd reverz transzkripcióss PCR-ral meghatározni a jelenlévő gének expresszióját.
- A colistin-érzékeny és -rezisztens törzsek külső membrán fehérjéinek összetételének elemzése.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Baktériumtörzsek

Vizsgálataink során klinikai mintákból izolált *K. pneumoniae* és *Enterobacter asburiae* törzsekkel dolgoztunk, valamint az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok során kontrollként a *K. pneumoniae* ATCC 700603-as törzset használtuk.

A nyolc vizsgált *K. pneumoniae* törzs az ST258 klónba tartozó, multirezisztens, KPC-2 enzimtermelő törzs volt, amelyeket 2008–2009-ben, az első magyarországi colistin-rezisztens *K. pneumoniae* járvány során azonosítottak. A két *E. asburiae* törzs sporadikus esetekből származott.

Antibiotikum-érzékenység meghatározás

A törzsek antibiotikum-érzékenységét mikrodilúciós módszerrel és E-teszttel határoztuk meg. A mikrodilúció során az alábbi antibiotikumokat vizsgáltuk: ceftazidim, cefotaxim, ceftriaxon, imipenem, ertapenem, amikacin, tobramycin, ciprofloxacín, levofloxacín, moxifloxacín, rifampicin, polymyxin B és colistin. E-teszttel a colistin-érzékeny törzseken belüli heterorezisztens szubpopulációkat akartuk elkülöníteni. Egy napos inkubálás után a minimális gátló koncentrációk (minimal inhibitory concentration, MIC) interpretációjánál a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) akkor hatályos ajánlásait tekintettük irányadónak.

Checkerboard analízis

Az antibiotikumok kombinációinak hatékonyságát checkerboard módszerrel vizsgáltuk. Az egyes antimikrobiális szerek legalacsonyabb MIC-értékeit felhasználva FIC-indexeket (frakcionális gátló koncentráció index) számoltunk az alábbi képlet alapján: $\Sigma FICI = FICI_A + FICI_B$, ahol $FICI_A = MIC_A(c) / MIC_A(a)$, illetve $FICI_B = MIC_B(c) / MIC_B(a)$. A $\Sigma FICI$ -értékek alapján szinergista ($\Sigma FICI \leq 0,5$), részleges szinergista ($0,5 < \Sigma FICI < 1$), additív ($\Sigma FICI = 1$), indifferens ($1 < \Sigma FICI \leq 4$) és antagonisták ($\Sigma FICI > 4$) viszonyokat különítettünk el.

Laktoferrinnel, protaminnal és lizozimmal szembeni érzékenység

A baktériumokat Luria-Bertani (LB) táplevesben tenyésztettük, majd az exponenciális fázisban lecentrifugáltuk az oldatot. Ezután $2,1 \times 10^5$ CFU/ml (CFU = colony-forming unit, telepképző egység) baktériumszuszpenziót készítettünk, amelyből 10–10 µl-hez 50–50 mg/ml protamint, lizozimet illetve laktoferrint adtunk, 200–200 µl össztérfogatban. Inkubáció után 100–100 µl szuszpenziót oltottunk ki LB agar lemezre, majd 18 órás inkubálás után szabad szemmel olvastuk le a telepszámot (egy telepet egy telepképző egységnek számítva), majd kiszámoltuk a százalékos csíraszámváltozást.

Colistin-rezisztencia gének vizsgálata PCR-ral

A baktériumtörzsek Mueller–Hinton (MH) agarról vett 2-3 telepét desztillált vízben szuszpendáltuk, majd a szuszpenziókat 100°C-os vízfürdő után centrifugáltuk. A *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB* és *pmrD* gének amplifikációjához az oligonukleotidokat az MWG Eurofins Primer Design programjával terveztük, az *mcr-1* és *mgrB* gének primereit korábbi publikációk alapján gyárttattuk. A PCR amplikonokat 1,5% agaróz gélben futtattuk, majd gélfestést követően UV-fény mellett detektáltuk. A *pmrB* és *mgrB* amplikonok nukleotidszekvenciájának meghatározását a BIOMI Kft. (Gödöllő, Magyarország) végezte. A kapott eredményeket az NCBI GenBank adatbázis alapján elemeztük.

Génexpresszió vizsgálata RT-qPCR-ral

A baktériumsejtek teljes RNS-tartalmát RNeasy Mini Kittel (QIAGEN, Hilden, Németország) kivontuk, majd RNáz-mentes DNázssal (QIAGEN) kezeltük. Az RT-PCR-t LightCycler RNA Master SYBR Green I. kittel (Roche Applied Science, Penzberg, Németország) végeztük. A *phoP*, *pmrD* és *arn* amplifikációjához az oligonukleotidokat az MWG Eurofins Primer Design programjával terveztük, az *rpoB* és *rrsE* housekeeping gének primereit korábbi publikációk alapján gyárttattuk.

Külső membrán fehérjék izolálása

A törzseket 500 ml MH táplevesben tenyésztettük, majd lecentrifugáltuk és az üledéket fiziológias sóoldatban reszuszpendáltuk. Az üledék Tris-HCl-ben való

feloldását követően jeges hűtést alkalmaztunk, 2x2 percig 500 W-os ultrahangos feltárást végeztünk (MSE Soniprep 150 Ultrasonic Disintegrator, MSE Ltd., London, Egyesült Királyság). Centrifugálás után a felülúszót ultracentrifugáltuk, s az így keletkezett üledéket nátrium-laurilszarkozin oldatban (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) feloldottuk, majd inkubáltuk. Ismételt ultracentrifugálást követően az üledékből izoláltuk a szarkozinban oldhatatlan külső membrán fehérjéket (outer membrane protein, OMP).

Külső membrán fehérjék egydimenziós gélelektroforézise (1-DE)

A külső membrán fehérje mintához Lämmli-oldatot adtunk [1 M-os Tris (pH 6,8), 50%-os glicerín, 10%-os nátrium-dodecyl-szulfát (sodium dodecyl sulfate, SDS), β -merkaptotanol, brómfenolkék, desztillált víz (Bio-Rad Magyarország Kft., Budapest, Magyarország)], majd a keveréket felmelegítettük. Hűtés után Bio-Rad Mini Protean 3 rendszerben végeztük az elektroforézist. A géleket festőoldatban inkubáltuk, majd differenciálóoldatba áztattuk.

Külső membrán fehérjék analízise Microchippel

A külső membrán fehérjéket extraháltuk, fluoreszcens festékkel megjelöltük, centrifugáltuk, majd Agilent 2100 Bioanalyzer System Microchipben (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) elektroforetikusan szeparáltuk.

Külső membrán fehérjék kétdimenziós gélelektroforézise (2-DE)

A külső membrán fehérjéket 2-DE mintapufferben [8 M-os urea, 2%-os CHAPS (3-[(3-kolamidopropil)-dimetilammónium]-1-propánszulfonát), 50 mM-os ditiotreitól, 0,2%-os Bio-Lyte® 3/10 Ampholyte, brómfenolkék (Bio-Rad)] feloldottuk, immobilizált pH gradiens (IPG) stripekre felvittük, majd izoelektromos fókuszálással töltés alapján szeparáltuk. Ezt követően a stripeket ekvibrációs pufferben mostuk, majd a fehérjéket tömeg alapján szeparáltuk poliakrilamid-gélelektroforézissel. A proteinsávokat festékoldattal tettük láthatóvá, majd az érintett gélterületet további vizsgálat céljából kimetszettük.

Gélen belüli emésztés

A fehérjesávokat tartalmazó gélrészleteket kimetsztük, majd kisebb darabokra vágtuk. A festék eltávolítása, a géldarabok dehidrációja, a diszulfidhidak redukálása és a szulfhidrilcsoportok alkilálása után side-chain-protected tripszinnel (Promega, Madison, WI, USA) a gélben végeztünk proteolízist. Az emésztett peptideket hangyasavoldattal (Sigma-Aldrich) kivontuk a gélből.

MALDI-TOF/MS tömegspektrometria

A tömegspektrometriás vizsgálatot Autoflex II MALDI-TOF/MS módszerrel (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) végeztük. Az emésztett peptideket α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav (Bruker Daltonics), acetonitril és trifluoecetsav (Scharlau Chemie, Barcelona, Spanyolország) elegyében oldottuk. A peptideket 1000 lövés alapján határoztuk meg, az adatok feldolgozásához a flexAnalysis szoftvercsomag 3.1-es verzióját használtuk (Bruker Daltonics), az analízist Sequence Editor szoftverrel (Bruker Daltonics) végeztük. A fehérjék azonosítása a MASCOT algoritmus (<http://www.matrixscience.com>) és a Swiss-Prot adatbázis (Swiss Institute of Bioinformatics, Genf, Svájc) alapján történt.

EREDMÉNYEK

Antibiotikum-érzékenység

Az ST258-as klónba tartozó *K. pneumoniae* törzsek mind rezisztensek voltak 3. generációs cephalosporinokkal, ertapenemmel, tobramycinnel, fluorokinolonokkal és rifampicinnel szemben. A 11-es számú törzs kivételével mind rezisztensek voltak a polymyxinekre is (1. táblázat).

A sporadikus esetekből izolált *E. asburiae* törzsek érzékenyek voltak 3. generációs cephalosporinokra, carbapenemekre, fluorokinolonokra és amikacinra. E-tesztel a colistin-érzékeny 0821-es törzsön belül egy heterorezisztens szubpopulációt különítettünk el (2. táblázat).

1. Táblázat: A vizsgált *K. pneumoniae* törzsek MIC-értékei

Antibiotikumok	MIC (µg/ml)										
	EUCAST breakpoints	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>K. pneumoniae</i> 11	<i>K. pneumoniae</i> 12	<i>K. pneumoniae</i> 97	<i>K. pneumoniae</i> 105	<i>K. pneumoniae</i> 132	<i>K. pneumoniae</i> 153	<i>K. pneumoniae</i> 160	<i>K. pneumoniae</i> 167	<i>K. pneumoniae</i> 168
ampicillin	8	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
ceftazidim	4	64	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
cefotaxim	2	16	128	128	32	32-64	32	64	32	32	128
ceftriaxon	2	8	256	256	128	128	128	128-256	64-128	128	256
ertapenem	1	<0,125	32	64	8-16	16	8-16	16	16-32	16	32
imipenem	8	<0,125	256	256	4	4-8	2-4	4	4	4	16
amikacin	16	2	32	32	2	2	2	2	16	16	2
tobramycin	4	4	32	16	16	16	8-16	16	16	16	16
ciprofloxacin	1	0.5	128	128	128	128	128	128	128	128	128
levofloxacin	2	1	64	64	64	64	64	64	64	64	64
moxifloxacin	1	2	64	64	64	64	64	64	64	64	64
polymyxin B	-	2	<0,125	128	32	16	16-32	8-16	16	32	64-128
colistin	2	1	<0,125	256	32	32	32-64	32	32-64	32-64	256
rifampicin	-	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256

2. Táblázat: A vizsgált *E. asburiae* törzsek MIC-értékei

Antibiotikumok	MIC (µg/ml)				
	EUCAST breakpoints	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>E. asburiae</i> 0821	<i>E. asburiae</i> 0821/H	<i>E. asburiae</i> 148
ampicillin	8	>256	256	256	32
ceftazidim	4	64	0,25	1	<0,125
cefotaxim	2	16	0,5	1	<0,125
ceftriaxon	2	8	0,5	1	<0,125
ertapenem	1	<0,125	<0,125	<0,125	<0,125
imipenem	8	<0,125	0,5	0,5-1	0,25-0,5
amikacin	16	2	0,5	0,5	0,5-1
tobramycin	4	4	0,25	<0,125	0,5
ciprofloxacin	1	0,5	<0,125	<0,125	<0,125
levofloxacin	2	1	<0,125	<0,125	<0,125
moxifloxacin	1	2	<0,125	<0,125	<0,125
polymyxin B	-	2	0,125	>256	64-128
colistin	2	1	0,125	>256	256
rifampicin	-	>256	>256	>256	>256

A checkerboard analízis eredményei

A 11-es és 12-es *K. pneumoniae* törzseknél megfigyelt antibiotikum-kölcsönhatások sok szempontból különböztek (3–4. táblázat). A 11-es törzsnél tiszta szinergizmust csak az imipenem–tobramycin kombinációnál észleltünk, részleges szinergizmust a rifampicin, ciprofloxacin, imipenem és ceftazidim különböző kombinációinál figyeltünk meg. A 12-es, colistin-rezisztens törzsnél szinergizmust az imipenem rifampicinnel, tobramycinnel illetve ciprofloxacinnal alkotott kombinációinál detektáltunk, valamint a rifampicin colistinnel illetve polymyxin B-vel alkotott párosainál.

3. Táblázat: A 11-es *K. pneumoniae* törzs ellen tesztelt antibiotikumok önálló és kombinációban mért MIC-értékei, valamint FIC-indexei

<i>K. pneumoniae</i> 11					
Antibiotikum-kombinációk	MIC (µg/ml)				FICI
	1. AB _{magában}	2. AB _{magában}	1. AB _{kombinációban}	2. AB _{kombinációban}	
colistin - ceftazidim	0,125	256	0,25	1	2,004
colistin - ciprofloxacin	0,125	128	0,25	1	2,008
colistin - imipenem	0,125	8	0,25	1	2,125
colistin - rifampicin	0,125	256	0,25	1	2,004
polymyxin B - ceftazidim	0,125	256	0,25	1	2,004
polymyxin B - ciprofloxacin	0,125	128	0,25	1	2,008
polymyxin B - imipenem	0,125	8	0,25	1	2,125
polymyxin B - rifampicin	0,125	256	0,25	1	2,004
rifampicin - ciprofloxacin	256	128	0,25	64	0,501
rifampicin - imipenem	256	8	4	4	0,516
imipenem - ciprofloxacin	8	128	4	1	0,508
imipenem - tobramycin	8	32	1	4	0,250
ceftazidim - ciprofloxacin	256	128	0,25	64	0,501
ceftazidim - tobramycin	256	32	1	16	0,504
tobramycin - ciprofloxacin	32	128	32	1	1,008

4. Táblázat: A 12-es *K. pneumoniae* törzs ellen tesztelt antibiotikumok önálló és kombinációban mért MIC-értékei, valamint FIC-indexei

<i>K. pneumoniae</i> 12					
Antibiotikum-kombinációk	MIC (µg/ml)				FICI
	1. AB _{magában}	2. AB _{magában}	1. AB _{kombinációban}	2. AB _{kombinációban}	
colistin - ceftazidim	256	256	64	2	0,258
colistin - ciprofloxacín	256	128	2	16	0,133
colistin - imipenem	256	8	32	8	1,125
colistin - rifampicin	256	256	0,25	1	0,005
polymyxin B - ceftazidim	128	256	64	1	0,504
polymyxin B - ciprofloxacín	128	128	1	16	0,133
polymyxin B - imipenem	128	8	2	4	0,516
polymyxin B - rifampicin	128	256	0,25	1	0,006
rifampicin - ciprofloxacín	256	128	64	64	0,750
rifampicin - imipenem	256	8	1	4	0,504
imipenem - ciprofloxacín	8	128	1	2	0,141
imipenem - tobramycin	8	32	1	2	0,188
ceftazidim - ciprofloxacín	256	128	256	64	1,500
ceftazidim - tobramycin	256	32	0,25	16	0,501
tobramycin - ciprofloxacín	32	128	16	1	0,508

Laktoferrinnel, protaminnal és lizozimmal szembeni érzékenység

A *K. pneumoniae* törzsek rezisztensnek bizonyultak laktoferrinnel szemben – a kezelés után nem tapasztaltunk csökkenést a telepkepző egységek számában. A protamin 97%-os csökkenést okozott a colistin-érzékeny *K. pneumoniae* törzs telepkepző egységeinek számában, a colistin-rezisztens törzsé azonban csak 40%-kal csökkent. A lizozim 100%-os baktericid hatást mutatott a colistin-érzékeny törzssel szemben, és a colistin-rezisztens esetében is számmottevő, bár kisebb mértékű hatást detektáltunk (5. táblázat).

Az *E. asburiae* törzseknél a protamin nem okozott szignifikáns változást a telepkepző egységek számában. A colistin-rezisztens törzseknél viszont magas szintű toleranciát észleltünk laktoferrinnel és lizozimmal szemben (6. táblázat).

5. Táblázat: CFU-változás *K. pneumoniae* törzseknél
szérum, liquor, laktoferrin, lizozim és protamin hatására

		<i>K. pneumoniae</i> Col É	<i>K. pneumoniae</i> Col R
Kezdő csíraszám (CFU/ml)		2,1x10 ⁵ (100%)	2,1x10 ⁵ (100%)
Csíraszámváltozás	Szérum (patkány)	2,52x10 ⁴ (-88%)	2,1x10 ⁴ (-90%)
	Liquor (patkány)	6,3x10 ³ (-97%)	3,15x10 ⁴ (-85%)
	Protamin (50 mg/ml)	6,3x10 ³ (-97%)	1,26x10 ⁵ (-40%)
	Laktoferrin (50 mg/ml)	2,1x10 ⁵ (0%)	2,1x10 ⁵ (0%)
	Lizozim (50 mg/ml)	0 (-100%)	2,73x10 ⁴ (-87%)

6. Táblázat: CFU-változás *E. asburiae* törzseknél
laktoferrin, lizozim és protamin hatására

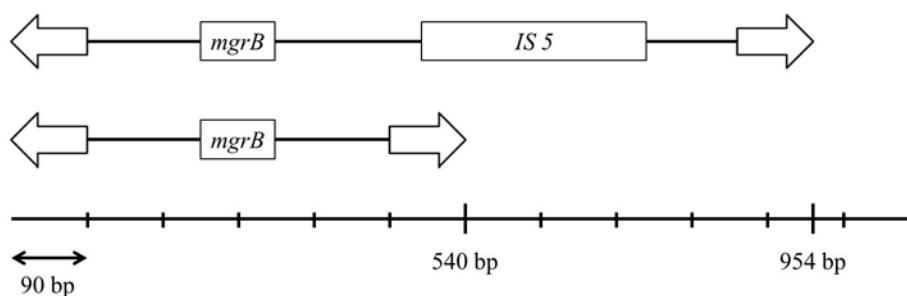
		<i>E. asb 0821</i> Col É	<i>E. asb 0821/H</i> Col R	<i>E. asb 148</i> Col R
Kezdő csíraszám (CFU/ml)		2,1x10 ⁵ (100%)	2,1x10 ⁵ (100%)	2,1x10 ⁵ (100%)
Csíraszámváltozás	Protamin (50 mg/ml)	1,995x10 ⁵ (-5%)	2,1x10 ⁵ (0%)	2,1x10 ⁵ (0%)
	Laktoferrin (50 mg/ml)	2,1x10 ⁵ (0%)	2,919x10 ⁵ (+39%)	2,373x10 ⁵ (+13%)
	Lizozim (50 mg/ml)	2,184x10 ⁵ (+4%)	2,646x10 ⁵ (+26%)	2,163x10 ⁵ (+3%)

Colistin-rezisztencia gének vizsgálata PCR-ral

A *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB* és *pmrD* jelenlétét igazoltuk a colistin-érzékeny és colistin-rezisztens *K. pneumoniae* törzsekben is, azonban az *mcr-1*-et egyik vizsgált *E. asburiae* és *K. pneumoniae* törzsből sem sikerült kimutatnunk.

Az összes *K. pneumoniae* törzsből kimutattuk az *mgrB* gént. A colistin-érzékeny törzsből egy 954 bázispár hosszúságú amplikont detektáltunk, amelynek szekvenálása során egy új, eddig le nem írt MgrB variánst kódoló génszakaszt, valamint egy 5-ös típusú inzerációs szekvenciát (insertion sequence 5, *IS5*) azonosítottunk. A colistin-rezisztens törzsekben egységesen 540 bázispár hosszúságú amplikonokat mutattunk ki, amelyekből hiányzott az *IS5*, az *MgrB*-t kódoló génszakasz pedig egy, az összes törzsből azonos szekvenciájú variánst kódolt (1. ábra).

Sem a colistin-érzékeny, sem a colistin-rezisztens törzsekben nem találtunk módosulást a PmrB fehérje szekvenciájában.



1. Ábra:

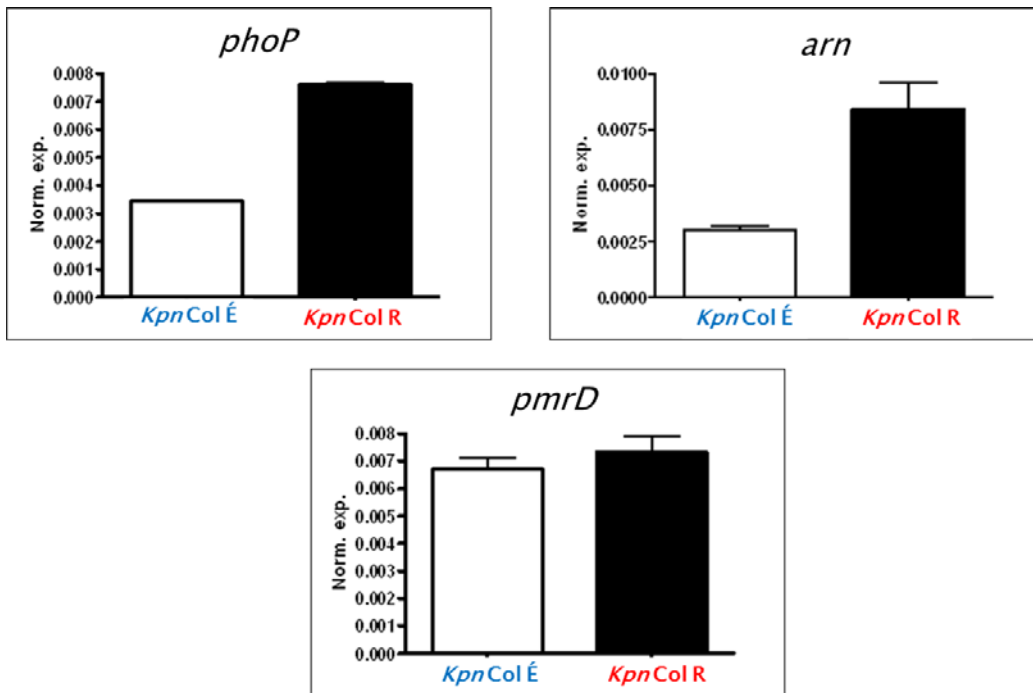
A *K. pneumoniae* törzsekben izolált *mcrB* gének hossza (felső amplikon: colistin-érzékeny *K. pneumoniae* törzs; alsó amplikon: colistin-rezisztens *K. pneumoniae* törzs)

Génexpresszió vizsgálata RT-qPCR-ral

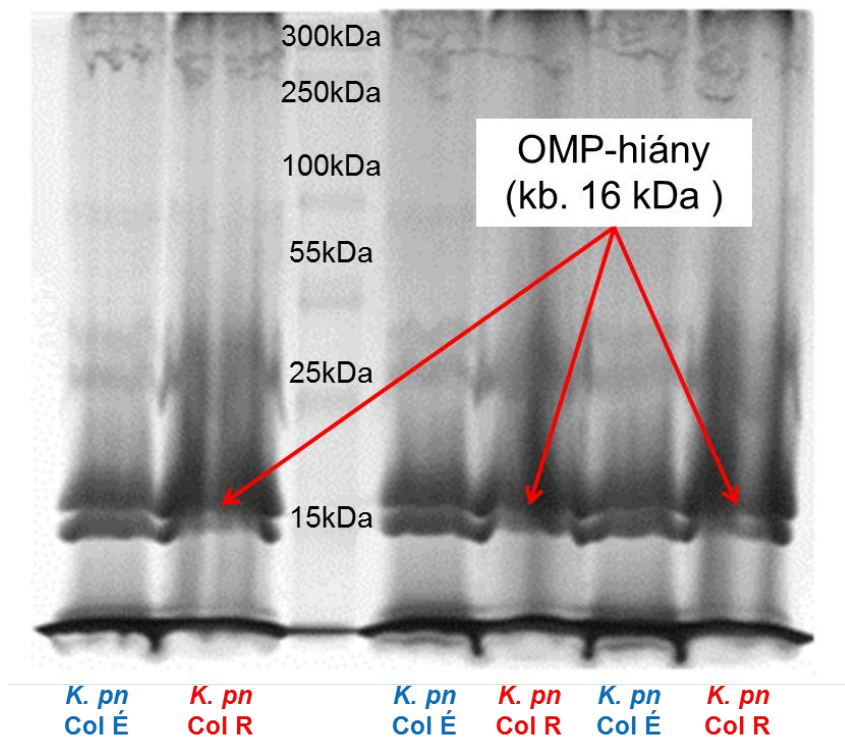
A PhoP-PmrD-*arn* szabályozórendszer colistin-rezisztenciában játszott szerepét igazoltuk a colistin-rezisztens *K. pneumoniae* törzsekben: a *phoP* gén és az egyik *arn* gén fokozott expresszióját azonosítottuk (2. ábra).

Külső membrán fehérjék egydimenziós gélelektroforézise

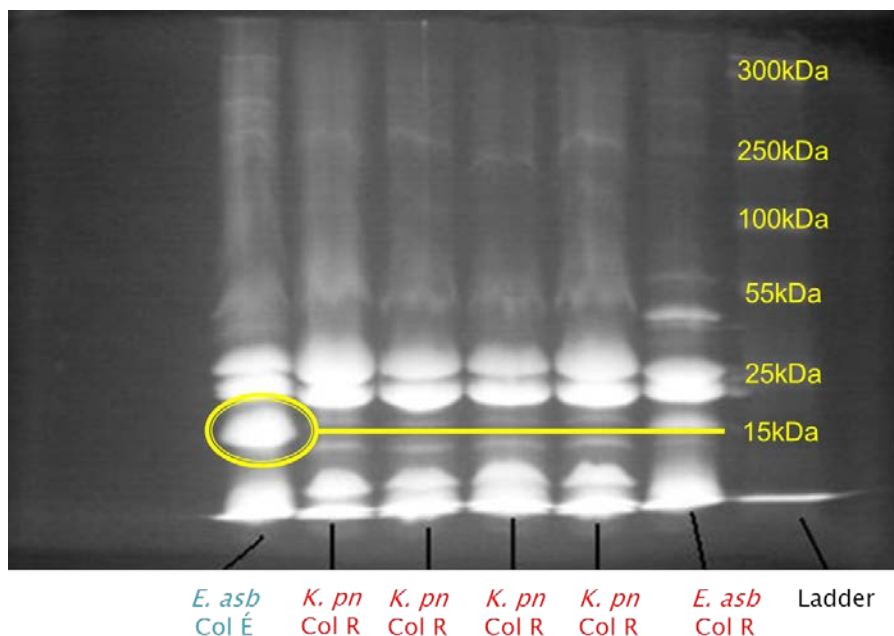
Mind a *K. pneumoniae*, mind az *E. asburiae* törzseknél egy kb. 15–16 kDa nagyságú proteinfракció hiányát detektáltuk (3–4. ábra).



2. Ábra: *K. pneumoniae* colistin-rezisztencia gének relatív génexpressziója
(*Kpn Col É* = colistin-érzékeny *K. pneumoniae*; *Kpn Col R* = colistin-rezisztens *K. pneumoniae*)



3. Ábra: *K. pneumoniae* külső membrán fehérjék egydimenziós gélelektroforézise
(*K. pn Col É* = colistin-érzékeny *K. pneumoniae*; *K. pn Col R* = colistin-rezisztens *K. pneumoniae*)



4. Ábra: *E. asburiae* külső membrán fehérjék egydimenziós gélelektroforézise

(*K. pn* Col R = colistin-rezisztens *K. pneumoniae*;

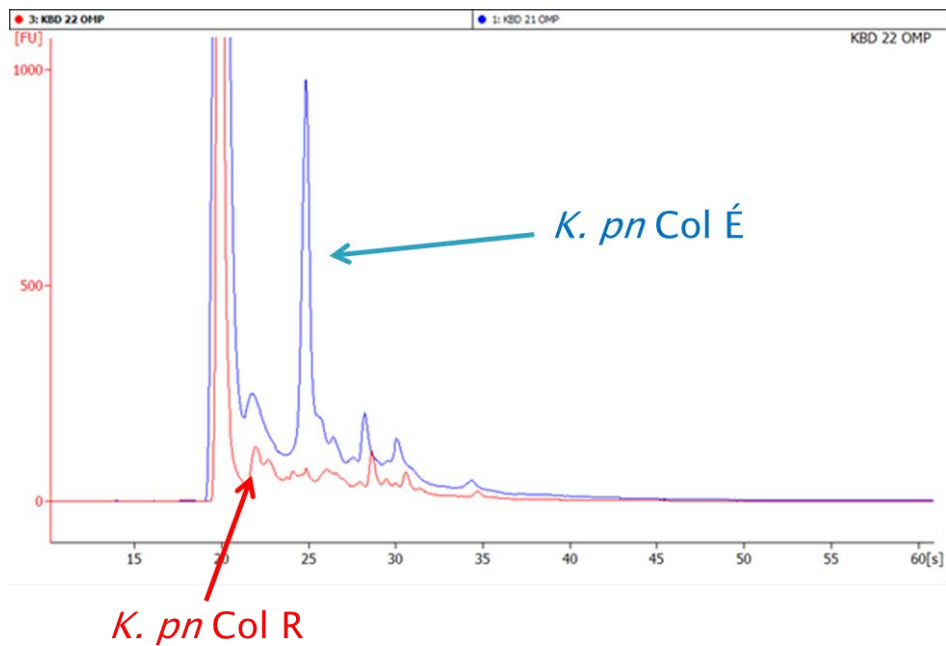
E. asb Col É = colistin-érzékeny *E. asburiae*; *E. asb* Col R = colistin-rezisztens *E. asburiae*)

Külső membrán fehérjék analízise Microchippel

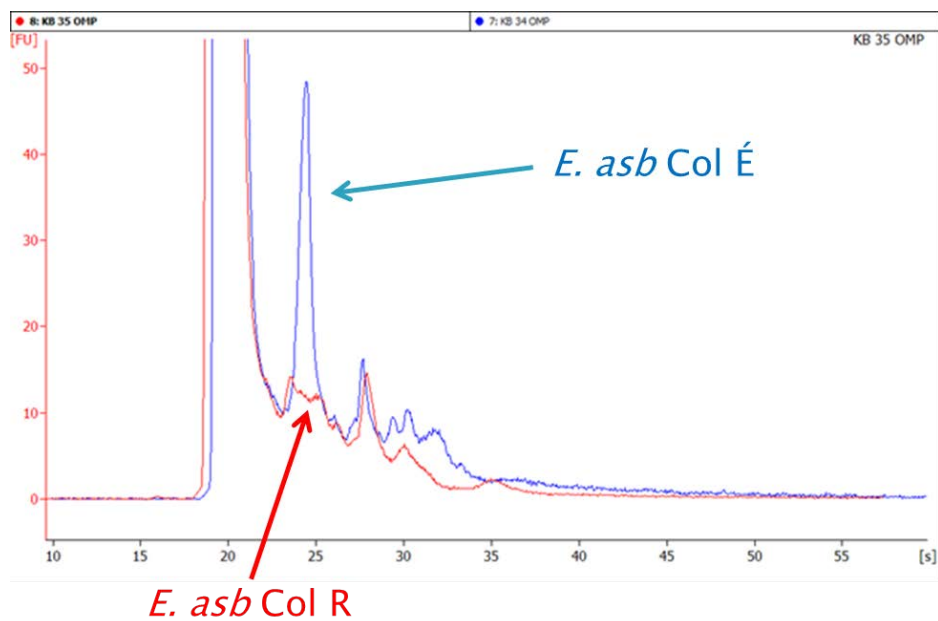
A fluoreszcensen megjelölt külső membrán fehérjéket Agilent 2100 Bioanalyzer System microchipben futtatva a colistin-rezisztens *K. pneumoniae* és *E. asburiae* törzseknél egy-egy fehérjefrakció hiányát detektáltuk a futás 20–25. másodpercében (5–6. ábra).

A külső membrán fehérjék analízise MALDI-TOF tömegspektrometriával

A colistin-érzékeny *K. pneumoniae* törzsben nagy mennyiségben találtunk DNA starvation/stationary phase protection proteinek (Dps) és a LysM domain/BON családba tartozó fehérjéket, míg ezek a fehérjék a colistin-rezisztens törzsnél hiányoztak. A colistin-érzékeny *E. asburiae* törzsben az OmpC és OmpW külső membrán fehérjék jelen voltak, de a colistin-rezisztensekből hiányoztak, ugyanakkor helyettük OmpA-t és OmpX-et azonosítottunk.



5. Ábra: *K. pneumoniae* külső membrán fehérjék Microchipben történő analízise
 (*K. pn Col É* = colistin-érzékeny *K. pneumoniae*; *K. pn Col R* = colistin-rezisztens *K. pneumoniae*)



6. Ábra: *E. asburiae* külső membrán fehérjék Microchipben történő analízise
 (*E. asb Col É* = colistin-érzékeny *E. asburiae*; *E. asb Col R* = colistin-rezisztens *E. asburiae*)

MEGBESZÉLÉS

A colistin-rezisztens, KPC-2 termelő *K. pneumoniae* törzseken végzett kísérleteink megerősítik a korábbi leírásokat a kombinációs antibiotikum-terápia jelentőségéről a monoterápiához képest. Az általunk vizsgált antibiotikum-kombinációk közül szinergista kölcsönhatású volt a rifampicin–colistin, rifampicin–polymyxin B, imipenem–rifampicin, imipenem–tobramycin és imipenem–ciprofloxacin.

A colistin-érzékeny *E. asburiae* törzsön belül jelenlévő heterorezisztens szubpopuláció detektálása korrelál az elmúlt évek nemzetközi tapasztalataival. Lizozim-toleranciával összefüggő colistin-heterorezisztenciát írtak már le *Enterobacter cloacae*-nál. A kationos antimikrobiális peptidok a polymyxinekhez hasonlóan kötődnek a Gram-negatív baktériumok külső membránjához kapcsolódó PhoP-PhoQ fehérjepárhoz, melynek fontos szerepe van a colistin-rezisztencia kialakulásában. A *K. pneumoniae* és *E. asburiae* törzsek a colistin-rezisztenciát korábbi polymyxin-expozíció nélkül alakították ki, amely felveti kereszttolerancia/-rezisztencia lehetőségét. Az emberi antimikrobiális peptidokkal (pl. laktoferrin, lizozim) szembeni tolerancia közrejátszhat a colistin-rezisztencia kialakulásában. Ez a jelenség valószínűleg visszafelé is érvényes – a colistin-rezisztencia következtében a baktériumok toleránssá válhatnak a gazdaszervezet antimikrobiális peptidjeivel szemben.

A colistin-rezisztenciáért felelős kromoszomális gének közül PCR-ral sikerült igazolni a *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB*, *pmrD* és *mgrB* gének jelenlétét a *K. pneumoniae* törzsekben, azonban a 2015 novemberében leírt *mcr-1* plazmidon kódolt rezisztenciagén egyik vizsgált törzsben sem volt kimutatható.

A PmrB aminosav-szekvenciájának megváltozása tudottan közrejátszik a colistin-rezisztencia kialakulásában, a mi colistin-rezisztens *K. pneumoniae* törzseink PmrB fehérjéje viszont vad típusú volt. A colistin-érzékeny és -rezisztens *K. pneumoniae* törzseink MgrB fehérjéje egyaránt eltért a vad típustól, a rezisztens törzsek *mgrB* génje mellől azonban hiányzott egy, az érzékenyben jelenlévő IS5 nukleotidszakasz. Ez azért figyelemre méltó, mivel az inzerációs szekvenciák általában az *mgrB* génbe épülve, annak inaktiválása révén váltanak ki colistin-rezisztenciát.

A PhoPQ és *arn* rendszerek colistin-rezisztenciát kialakító szerepét RT-qPCR-ral sikerült igazolni a baktériumtörzseinkben. Bár a *pmrD* gén expressziójában nem volt szignifikáns különbség a colistin-érzékeny és -rezisztens *K. pneumoniae* törzsek között,

a colistin-rezisztens törzsekben az *arn* és *phoP* gének jelentős overexpresszióját detektáltuk.

A colistin-rezisztens *K. pneumoniae* és *E. asburiae* törzsek külső membrán fehérjéinek gélelektroforézise során egyaránt egy kb. 15-16 kDa-os fehérjefrakció hiányát észleltük. A *K. pneumoniae* esetében a hiányzó proteinek a DNA starvation/stationary phase protection proteinek (Dps) és a LysM domain/BON családba tartozó fehérjék voltak. A colistin-rezisztens *E. asburiae* törzsből hiányzott az OmpC és OmpW fehérje, jelen volt viszont az OmpA és OmpX.

A Dps-ek és homológjaik fő funkciója a baktériumsejtek védelme az osztódás stationer fázisában. Nem-specifikus módon kötődnek a bakteriális kromozómához, stabil, védett Dps-DNS komplexet hozva létre. Megkötik és oxidálják az intracelluláris Fe^{2+} ionokat, ezáltal csökkentik a reaktív oxigén szabadgyökök mennyiségét.

A LysM és BON domének evolúciósan konzervált fehérjeszakaszok. E proteinek elsősorban a sejtmembrán-integritás fenntartásáért felelős struktúrfehérjék és enzimek. Mivel a colistin-rezisztencia a sejtfa molekuláris szerkezetváltozásain alapul, érthető az integritásért felelős fehérjék expressziójában tapasztalt változás, bár háttere még nem tisztázott.

Az OmpC és homológjai a bélbaktériumok külső membránjában található, porin típusú transzportfehérjék. Többféle molekula, pl. antibiotikumok sejtbe irányuló transzportját végzik. Elvesztésük vagy csökkent expressziójuk *E. coliban* és *Enterobacter* fajokban antibiotikum-rezisztenciához és a szérum antimikrobiális aktivitásával szembeni csökkent érzékenységhez vezet.

Az OmpA egy többfunkciós külső membrán fehérje – a membrán integritásának fenntartásán kívül *E. coliban* a szérumrezisztenciáért, *K. pneumoniae*-ben pedig az antimikrobiális peptidek elleni rezisztenciáért felelős.

Az OmpX szerkezetileg az OmpA-ra hasonlító fehérje. Multirezisztens *Enterobacter aerogenes* törzsekben túltermelődését tapasztalták az OmpF és Omp36 porinfehérjék szintézisének egyidejű csökkenése, valamint az LPS szerkezetváltozása mellett. Az *ompX* up- és az *omp36* down-regulációja együtt a külső membrán áteresztőképességének csökkenése irányába hat.

KÖVETKEZTETÉSEK

Kísérleteink során az alábbi új eredményekre, megállapításokra jutottunk:

- *Klebsiella pneumoniae* törzsek
 - az ST258 klón hajlamos colistin-rezisztenciát kialakítani
 - a polymyxinek és a rifampicin, valamint az imipenem rifampicinnel, tobramycinnel és ciprofloxacinnal alkotott kombinációi *in vitro* antibakteriális hatásúak a colistin-rezisztens törzsekkel szemben
 - a colistin-rezisztens törzsekben tolerancia alakul ki antimikrobiális peptidekkel szemben
 - a colistin-rezisztens törzsek overexpresszálják a *phoP*, *pmrD* és *arn* géneket
 - az ST258 klónban MgrB variánsokat azonosítottunk
 - a colistin-rezisztens törzsekben megváltozik a külső membrán fehérjék összetétele (LysM/BON család fehérjéi és DNA starvation proteinek elvesztése)
- *Enterobacter asburiae* törzsek
 - egyes *E. asburiae* törzsek colistin-rezisztenssé képesek válni β -laktám-, aminoglikozid- és fluorokinolon-érzékenységük megőrzése mellett
 - a colistin-rezisztens törzsekben tolerancia alakul ki antimikrobiális peptidekkel szemben
 - a colistin-rezisztens törzsekben megváltozik a külső membrán fehérjék összetétele (OmpC és OmpW hiánya, valamint OmpA és OmpX jelenléte)

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Az értekezés témájában megjelent közlemények

Kádár B., Kocsis B, Tóth Á, Damjanova I, Szász M, Kristóf K, Nagy K, Szabó D. (2013) Synergistic antibiotic combinations for colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Acta Microbiol Immunol Hung, 60(2): 201-209., **IF: 0,780**

Kádár B., Kocsis B, Kristóf K, Tóth Á, Szabó D. (2015) Effect of antimicrobial peptides on colistin-susceptible and colistin-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter asburiae*. Acta Microbiol Immunol Hung, 62(4): 501-508., **IF: 0,568**

Kocsis B, Kádár B., Tóth Á, Fullár A, Szabó D. (2017) MgrB variants in colistin-susceptible and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258. J Microbiol Immunol Infect, 50(5): 735-736., **IF: 2,973**

Kádár B., Kocsis B, Tóth Á, Kristóf K, Felső P, Kocsis B, Böddi K, Szabó D. (2017) Colistin resistance associated with outer membrane protein change in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter asburiae*. Acta Microbiol Immunol Hung, 64(2): 217-227., **IF: 0,921***

Az értekezéstől eltérő témában megjelent közlemények

Kádár B, Szász M, Kristóf K, Pesti N, Krizsán G, Szentandrassy J, Rókus L, Nagy K, Szabó D: *In vitro* activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* strains. *ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA* 57:(3) pp. 235-245. (2010), **IF: 0,625** (Kádár B és Szász M megosztott első szerzők)

Kádár B, Kocsis B, Nagy K, Szabó D: The renaissance of polymyxins. *CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY* 20:(30) pp. 3759-3773. (2013), **IF: 3,715**

Szabó Bálint Gergely, Lénárt Katalin Szidónia, Kádár Béla, Gombos Andrea, Dezsényi Balázs, Szanka Judit, Bobek Ilona, Prinz Gyula: A *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) -infekciók ezer arca. *ORVOSI HETILAP* 156:(44) pp. 1769-1777. (2015), **IF: 0,291**

Szabó BG, Kádár B, Lénárt KS, Dezsényi B, Kunovszki P, Fried K, Kamotsay K, Nikolova R, Prinz G: Use of intravenous tigecycline in patients with severe *Clostridium difficile* infection: a retrospective observational cohort study. *CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION* 22:(12) pp. 990-995. (2016), **IF: 5,292**