

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

Doktori (Ph.D.) értekezés

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 Ph.D.

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. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	2
2. Rövidítések jegyzéke, fogalom magyarázat	5
3. Irodalmi áttekintés	8
3.1. A <i>Klebsiella</i> nemzetség rendszertana	8
3.2. Morfológia, előfordulás, tenyésztés és biokémiai tulajdonságok	9
3.3. Patogenitási faktorok	11
3.3.1. Tokantigének	11
3.3.2. Pilusok, fimbriák	15
3.3.3. Szérum rezisztencia és lipopoliszacharidok	16
3.3.4. Szideroforok	17
3.4. A <i>K. pneumoniae</i> tipizálása	19
3.4.1. Fenotipizálási módszerek	19
3.4.1.1. Biotipizálás	19
3.4.1.2. Szerotipizálás	19
3.4.1.3. Fágtypizálás	20
3.4.1.4. Bacteriocin tipizálás	21
3.4.2. <i>K. pneumoniae</i> tipizálására alkalmazott főbb molekuláris tipizálási módszerek	22
3.4.2.1. Random PCR módszerek	23
3.4.2.2. Makrorestrikciós profil vizsgálat pulzáztatott-mezejű gélelektroforézissel (PFGE)	24
3.4.2.3. Plazmid profil vizsgálat és restrikciós fragmens hossz polimorfizmus (RFLP)	28
3.4.2.4. Ribotipizálás	29
3.5. A <i>K. pneumoniae</i> epidemiológiája	30
3.6. A <i>K. pneumoniae</i> antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája	31
3.6.1. Aminoglikozidokkal szembeni rezisztencia	32
3.6.2. Fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia	33
3.6.3. β -laktámokkal szembeni rezisztencia	35
3.6.3.1. Kiterjedt-spektrumú β -laktamázok	35

3.6.3.1.1. SHV-típusú ESBL-k	36
3.6.3.1.2. TEM-típusú ESBL-k	37
3.6.3.1.3. CTX-M-típusú ESBL-k	38
3.6.3.2. <i>K. pneumoniae</i> törzsekben azonosított egyéb jelentősebb β -laktamázok	41
3.6.3.2.1. KPC-típusú β -laktamázok	41
3.6.3.2.2. AmpC-típusú β -laktamázok.....	42
3.6.3.2.3. Metallo- β -laktamázok.....	43
3.6.3.2.4. OXA β -laktamázok.....	45
3.7. Az első hazai ESBL-termelő <i>K. pneumoniae</i> törzsek vizsgálatai	46
4. Célkitűzések	48
5. Anyagok és módszerek.....	50
5.1. Baktérium törzsek.....	50
5.2. Baktériumtörzsek fenotípusos vizsgálata	53
5.2.1. Törzsek identifikálása.....	53
5.2.2. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok	53
5.2.2.1. Korongdiffúziós vizsgálatok.....	53
5.2.2.2. Minimális inhibitor koncentráció (MIC) meghatározása	54
5.3. Molekuláris vizsgálatok.....	55
5.3.1. Polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction – PCR)	55
5.3.2. CTX-M-termelő <i>K. pneumoniae</i> törzsek kinolon rezisztenciát meghatározó régióinak (QRDR) vizsgálata	60
5.3.3. <i>K. pneumoniae</i> törzsek makrorestrikciós profil meghatározása PFGE módszerrel	60
5.3.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> izolátumok szekvencia típus meghatározása MLST módszerrel	63
5.3.5. Plazmid profil analízis, konjugációs és elektroporációs kísérletek	64
6. Eredmények	66
6.1. Perinatális intenzív centrumokban járványokat okozó SHV-típusú ESBL-termelő <i>Klebsiella spp.</i> izolátumok vizsgálata	66
6.2. CTX-M-termelő <i>K. pneumoniae</i> izolátumok vizsgálata 2003-2005 között	71

6.3. ESBL-termelő <i>Klebsiella pneumoniae</i> molekuláris epidemiológiája 2006-2010 között	80
6.3.1. ESBL-termelő <i>Klebsiella pneumoniae</i> Nemzeti PFGE adatbázisa	80
6.3.2. ESBL-termelő <i>Klebsiella pneumoniae</i> L epidémiás klón megjelenése és terjedése több kórház felnőtt és csecsemő osztályán.....	83
6.3.3. KPC -termelő <i>Klebsiella pneumoniae</i> megjelenése Magyarországon	87
6.3.4. Metallo- β -laktamáz termelő <i>K. pneumoniae</i> izolátum vizsgálata	91
6.3.5. DHA-1 AmpC-típusú β -laktamázok magyarországi megjelenése és terjedése <i>K pneumoniae</i> törzsekben.....	92
7. Megbeszélés	93
7.1. SHV-típusú ESBL-termelő <i>Klebsiella</i> spp. által okozott járványok vizsgálata ..	99
7.2. CTX-M-termelő <i>K. pneumoniae</i> törzsek vizsgálata	101
7.3. <i>Klebsiella</i> spp. nemzeti PFGE tipizáló adatbázis	105
7.4. CTX-M-15 vagy SHV-2a termelő <i>K. pneumoniae</i> L/ST274 epidémiás klón vizsgálata	109
7.5. KPC-2-termelő <i>K. pneumoniae</i> S/ST258 klón vizsgálata	111
7.6. VIM-4-termelő <i>K. pneumoniae</i> S/ST11 izolátum vizsgálata	113
7.7. DHA-1-termelő <i>K. pneumoniae</i> izolátumok vizsgálata	114
8. Zárókövetkeztések, új eredmények	116
9. Összefoglalás	120
10. Summary.....	122
11. Irodalomjegyzék	124
12. Saját publikációk jegyzéke	161
12.1. A disszertációval kapcsolatos publikációk jegyzéke.....	161
12.2. A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikációk jegyzéke.....	162
13. Köszönetnyilvánítás	164

2. Rövidítések jegyzéke, fogalom magyarázat

AAC	Aminoglikozid-acil-transzferáz
ANT	Aminoglikozid nukleotidil-transzferáz
APH	Aminoglikozid foszfo-transzferáz
AP-PCR	Arbitrary primed PCR (Tetszőleges primerrel végzett PCR)
ATCC	American Type Culture Collection (Amerikai Típusörzs Gyűjtemény)
bp	Bázispár
BSA	bovin albumin szérum
CDM	Combined disk method (Kombinált korong módszer)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Betegségmegelőző és Járványügyi Központ)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CFU	kolóniaképző egység
DDST	Double disk synergy test (Kétkorong szinergizmus teszt)
DPS	Dipikolinsav
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System (Európai Antibiotikum Rezisztencia Surveillance Rendszer)
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
ESBL	Extended-spectrum β -lactamase (Kiterjedt-spektrumú β -laktamáz)
ESBL-NRL	ESBL-termelő Gram-negatív kórokozók Nemzeti Referencia Laboratóriuma
EP	Elektroporáns törzs
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Antimikrobiális szerekkel szembeni Érzékenységi Vizsgálatok Európai Bizottsága)
FMEO	Fágtipizáló és molekuláris epidemiológiai osztály
HEC	Hungarian Epidemic Clone (Magyar epidémiás klón)
IS	insertion sequence (inszerciósszekvencia)
ITO	Intenzív Terápiás Osztály
MBL	Metallo- β -laktamáz

Mda	Megadalton
MIC	Minimális gátló koncentráció
MLST	Multi-lókuszos szekvencia tipizálás
MRP	Makrorestrikciós profil
NBS	Nemzeti Bakteriológiai Surveillance
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NTA	Nemzeti Tipitáló Adatbázis
OEK	Országos Epidemiológiai Központ
ORF	Open Reading Frame (nyitott leolvasási keret)
PCR	Polimerase chain reaction (Polimeráz láncreakció)
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis (pulzáltatott mezejű gélelektroforézis)
PIC	Perinatális Intenzív Centrum
PT	Pulzotípus
QRDR	Quinolone resistance determining region (kinolon rezisztenciát meghatározó régió)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (restrikciós fragmenthossz polimorfizmus)
SSCP	Single strand conformation polymorphism (egyszálú konformációs polimorfizmus)
ST	Szekvencia típus
TAE	TRIS Acetate-EDTA koncentrált puffer agaróz gélelektroforézishez
TBE	TRIS-borát-EDTA koncentrált puffer agaróz gélelektroforézishez
tnpA	Transzpozáz gén
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic averages

β -laktamázok:

CTX-M	Cefotaximáz-München (első izolálás)
GIM	német imipenemáz
IMI	imipenemet hidrolizáló β -laktamáz
IMP	imipenemmel szemben hatékony β -laktamáz

KLUA	<i>Kluyvera ascorbata</i> β -laktamáz
KLUC	<i>Kluyvera cryocrescens</i> β -laktamáz
KLUG	<i>Kluyvera georgiana</i> β -laktamáz
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemáz
LAT	Beteg neve után
MIR	Miriam kórházban írták le
NDM	Új-Delhi metallo- β -laktamáz
OXA	Oxacillinnel szemben aktív
SHV	Sulphydryl Reagent Variable
SIM	Szöul imipenemáz
SPM	Sao Paolo metallo- β -laktamáz
TEM	Temoniera beteg neve után
VIM	Veronai integronon kódolt metallo- β - laktamáz

Epidemiás (melléknév): Fertőzések vagy kolonizációk gyors és széleskörű elterjedése, melyek számos egyedet érintenek egy adott területen vagy populációban azonos időkereten belül. (ESCMID)

Filogeográfia: Modern kutatási irány, amely molekuláris genetikai jellegek alapján összekapcsolt módon rekonstruálja a filogenezist és az elterjedési terület történeti kialakulását.

Klón: Baktérium izolátumok, amelyek annak ellenére, hogy különböző időpontban, különböző forrásokból és különböző helyeken független módon izolálták, még rendelkeznek annyi közös fenotípusos tulajdonsággal, hogy a hasonlóság legvalószínűbb magyarázata a közös eredet egy releváns időkereten belül.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A *Klebsiella* nemzetség rendszertana

A *Klebsiella pneumoniae* az *Enterobacteriaceae* család *Klebsiella* nemzetségébe sorolható. Eredetileg a nemzetség tagjait az általuk okozott megbetegedések alapján csoportosították: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* és *K. rhinoscleromatis*. Az 1980-as évek elején a környezetből izolált *Klebsiella spp.* törzseket ideiglenes taxonokba sorolták. Ez a csoport még négy új fajt foglalt magában: *K. terrigena*, *K. ornithinolytica*, *K. planticola* és *K. trevisanii*. 1986-ban az utolsó két fajt a *K. planticola* fajba egyesítették a nagymértékű DNS homológia alapján (Podshun és Ullmann, 1998) (1. táblázat).

1. táblázat. A *Klebsiella* nemzetség species besorolása különböző taxonomiai besorolás szerint (Forrás: Podschun és Ullmann, 1998)

Rendszertani besorolás		
Cowan	Bascomb	Ørskov
<i>K. aerogenes</i>	<i>K. aerogenes/oxytoca/</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>K. edwardsii</i>	<i>edwardsii</i>	subsp. <i>pneumoniae</i>
subsp. <i>edwardsii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	subsp. <i>ozaenae</i>
subsp. <i>atlantae</i>	sensu stricto	subsp. <i>rhinoscleromatis</i>
<i>K. pneumoniae</i>	sensu lato	<i>K. oxytoca</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. terrigena</i>
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. planticola</i> (syn.
	<i>K. "unnamed group"</i>	<i>K. trevisanii</i>)
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>K. ornithinolytica</i>

Drancourt és munkatársai a *Klebsiella* spesieshez tartozó 9 típusörzs és az *Enterobacteriaceae* család 11 nemzetségéhez tartozó 20 species filogenetikai rokonságát vizsgálta a 16S rRNS és a *rpoB* gének komparatív szekvencia analízissel (Drancourt és mtsai, 2001). A szekvencia analízis igazolta a *Klebsiella* genus jelentős heterogenitását, így az eredmények alapján három klaszterre (csoportra) osztották. Az 1-es klaszter a *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp.

rhinoscleromatis és *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* típustörzseit tartalmazza. A 2-es klaszter *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella trevisanii* és *Klebsiella terrigena* fajokhoz tartozó törzseket foglalja magába, míg a 3-as klaszter kizárólag *K. oxytoca* törzsekből áll. A szerzők a 2-es klasztert *Raoultella* génusznak nevezték el.

3.2. Morfológia, előfordulás, tenyésztés és biokémiai tulajdonságok

A *K. pneumoniae* pálca alakú, tokot képző Gram-negatív baktérium. Hossza 1-2 μ m, szélessége 0,5-0,8 μ m között változhat. Csillóval nem rendelkezik, így aktív mozgásra nem képes. A tok szénhidrátdús közegben nyálkás burokként körülveszi az egyes baktériumtelepeket. Differenciáló táptalajokon laktózt fermentál, kifejezetten nyákos jellegű telepeket képez. Antigénszerkezeti felosztása a szomatikus (O) és a tokantigének (K) alapul. A tokantigének alapján 82 típust különböztetnek meg. (Czirok 1999; Podchun és Ullmann 1998)

A *Klebsiella spp.* ubikviter szervezetek, számos helyen előfordulnak. Egyik jellegzetes élőhelyük a környezet; szaprofitákként megtalálhatók a talajban, felszíni és szennyvizekben, növényeken. *K. pneumoniae* törzsek jelenlétét bizonyították fagyasztott narancslé sűrítvényben (Fuentes és mtsai, 1985), cukornád melléktermékeken (Nunez és Colmer 1968), fákon, lágyszárú növényeken, növény eredetű élelmiszereken (Brown és Seidler 1973, Knittel és mtsai 1977, Caplenas és mtsai 1981). *K. pneumoniae* törzseket gyakran lehet izolálni különböző növények gyökérfelületéről (Pedersen és mtsai 1978). Bizonyos diazotróf *K. pneumoniae* törzsek a növények nitrogén fixációjában segédkeznek, füves területek talajából (Line és Loutit 1971), a rizoszférából (Rennie 1982), sőt a kukoricaszár szöveteiből (Palus és mtsai, 1996) is lehet izolálni. Chelius és Triplett (2000) két *K. pneumoniae* törzs endofita életmódját bizonyította fluorescens festékkel jelölt fehérjék segítségével.

Számos emlőszállatot (Gordon és FitzGibbon 1999) és ízeltlábút (Dillon és mtsai 2002) kolonizálhatják *K. pneumoniae* törzsek. Érdekes megemlíteni, hogy a vándorsáskák hatalmas rajokba való szerveződését a rovarok bélflórájában található és a széklettel ürülő *K. pneumoniae* anyagcseretermékei is segíthetik (Dillon és mtsai 2002). A kancák

epidemiás méhgyulladását K1 és K2 tok-szerotípusú (ld. később) törzsek okozták Angliában (Platt és mtsai 1976). *K. pneumoniae* a szarvasmarha emlőmirigygyulladásának leggyakoribb kórokozója (Braman és mtsai, 1973), de más állatoknál is – pl. kutyák, Rhesusz majmok, tengeri malacok, patkányok, madarak - súlyos fertőzéseket okoz (Wyand és Hayden 1973; Fox és Rohovsky 1975, Kinkler és mtsai 1976, Wilson 1994, Roberts és mtsai 2000).

Az emberben szaprofitaként jelen lehet a béltraktusban és az orrgaratban. Egyes tanulmányok szerint a székletminták 5-38%-ban tartalmazzák a baktériumot. (Podchun és Ullmann, 1998). Opportunista fertőzéseket okozhat, döntően kórházban ápolott betegeknél, de bizonyos földrajzi régiókban jelentős területen szerzett infekciók kórokozója is lehet. (Erről bővebben ld. a „*K. pneumoniae* epidemiológiája” c. fejezetben)

A *K. pneumoniae* tenyésztési hőmérséklete 37 °C. Szürkés-fehéres-sárgás, gyakran összefolyó telepeket képez agar táptalajon. Véres agaron nem hemolizáló, sima telepeket, míg eozin-metilénkék agaron általában rózsaszín, nagy, domború telepeket képez. Jól tűri a kiszáradást, szobahőmérsékleten akár hónapokig életképes. Általában érzékeny hőre és fertőtlenítőszerekre. (Czirok 1999)

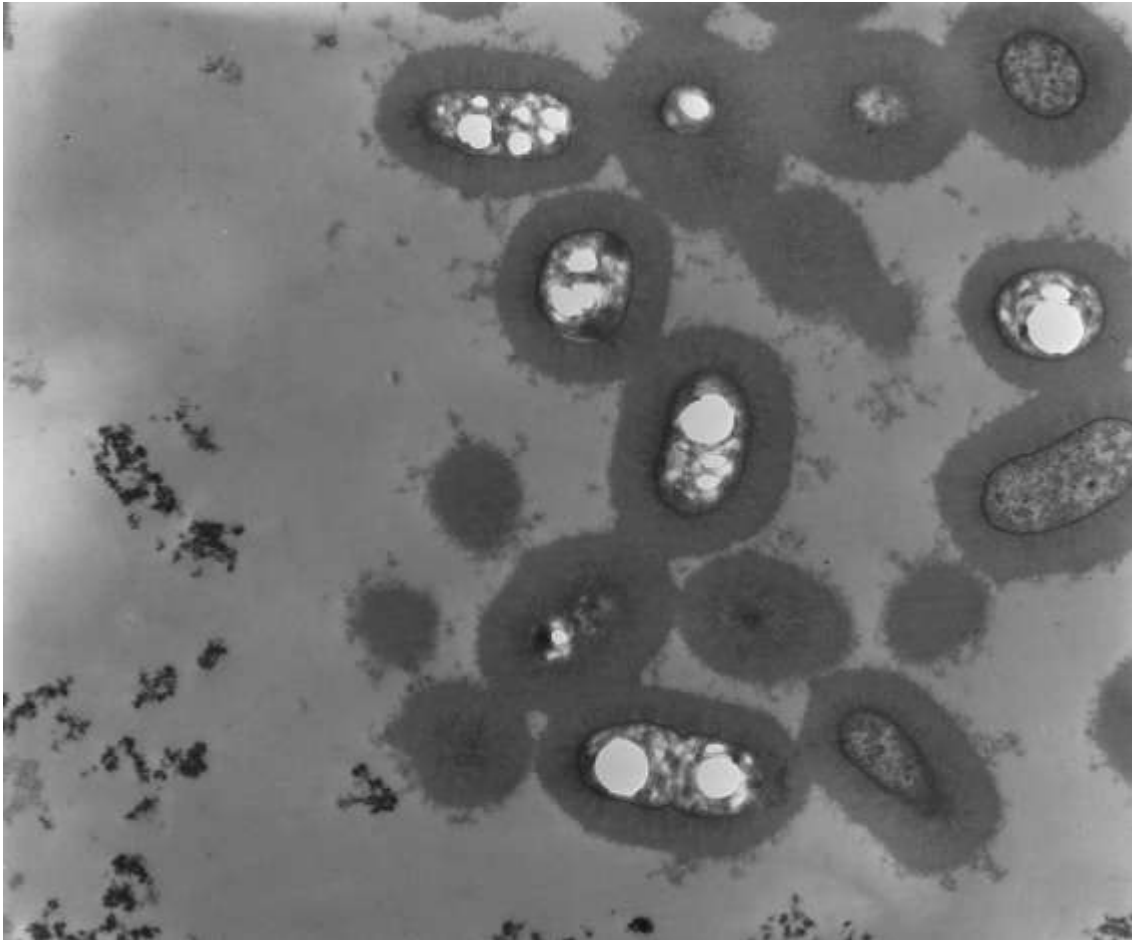
A *K. pneumoniae* speciesbe nem mozgó, ureázt termelő, oxidáz és indol negatív, kataláz pozitív törzsek tartoznak. Késői laktóz bontók, lizin-dekarboxilázt termelnek, de a zselatint nem folyósítják, ornitin-dekarboxilázt és arginin-dihidrolázt nem képeznek. A *K. pneumoniae* savat és gázt képez a legtöbb cukorból. (Czirok 1999, Podchun és Ullman 1998)

3.3. Patogenitási faktorok

Jelenlegi ismereteink szerint a *K. pneumoniae* patogenitását négy fő patogenitási faktor jelenléte határozza meg: adhezinek, lipopoliszacharidok, tok poliszacharidok és vas felvevő rendszerek (szideroforok) (Podchun és Ullman 1998).

3.3.1. Tokantigének

A *K. pneumoniae* törzsek általában hidrofil poliszacharidokból álló tokkal rendelkeznek, amely a baktérium telepek jellegzetes nyákos küllemét adja. A tok sűrű fibrillumos képletekből áll, melyek a baktérium felszínén masszív réteggént jelennek meg (1. ábra). Feladatai közé tartozik a kórokozó védelme a polimorfonukleáris granulociták fagocitózisától és a szérum rezisztencia biztosítása (Podschun és Ullmann 1992).



1. ábra. Tokkal körülvett *K. pneumoniae* sejtek (pásztázó elektron mikroszkóppal készült felvétel) (forrás: Ofek és mtsai 1994)

Jelenleg 82 különböző antigénszerkezetű exopoliszacharidot ismerünk, ezek közül 77-et a nemzetközi K-szerotipizálási séma szerint lehet meghatározni (Orskov és Fife-Asbury 1977). Jelenleg még nagyon kevés információ áll rendelkezésre a tok poliszacharidok immunkémiai specifikusáról.

A tok volt az első virulencia faktor, amelyet *K. pneumoniae* törzseknél írták le (Baerthlein 1918, Kauffmann 1949). Már 1928-ban Edwards kimutatta, hogy a kancák metritisének kialakulásához a *K. pneumoniae* törzseknek tokkal kell rendelkezniük (Edwards 1928). Különböző kísérleti modellekben összefüggést találtak a tok mérete (1-es és 2-es szerotípusoknál) és a patogenitás között kísérlet (Domenico és mtsai 1982, Cryz és mtsai 1984). A K-antigén kulcsszerepet tölt be a baktérium opszono-fagocitózis elleni védelmében azzal, hogy a komplement rendszer aktiválását blokkolja (Williams és Thomas 1990).

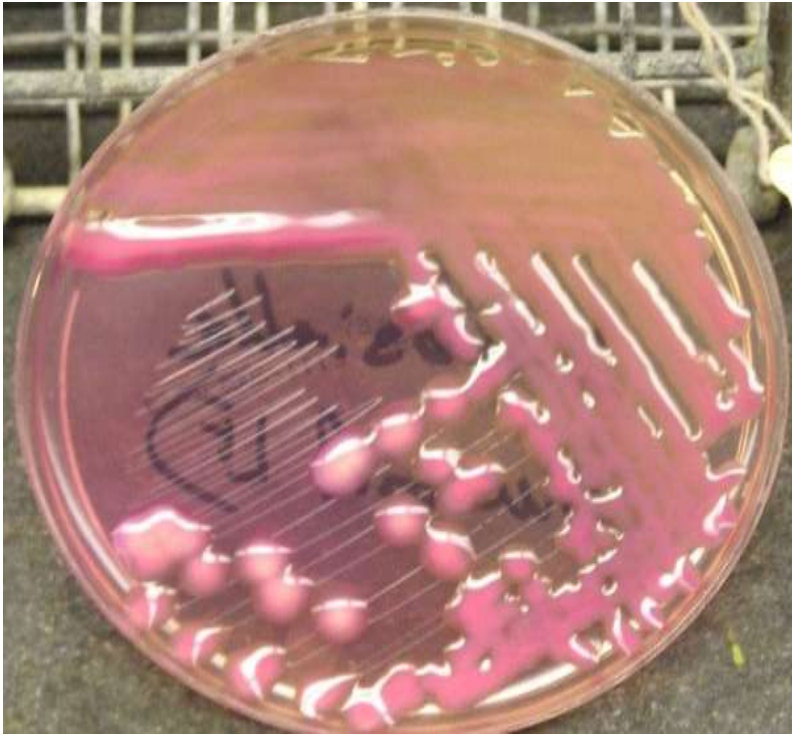
A törzsek által expresszált tok-típusok között a K1 és K2 szerotípusúakat tartják a legvirulensebbeknek. Egerekkel végzett kísérletek során Mizuta és mtsai megállapították, hogy intraperitoneális beadás után a K1 és K2 szerotípusoknál fordult elő a legmagasabb letalitás (Mizuta és mtsai, 1983). Simoons-Smit és mtsai szintén eger kísérletekkel igazolták a K1, K2, K4 és K5 tok antigének nagyobb virulenciáját a K6, ill. ennél nagyobb számmal jelölt tok antigénekkel szemben (Simoons-Smit és mtsai 1984).

A tok poliszacharidok mannóz tartalma feltehetően meghatározza az adott K szerotípus virulencia fokát. Így például az alacsonyabb virulenciájú K7 vagy K21 a tok-szerotípusok ismétlődő mannóz- α -2/3-mannóz, vagy L-ramnóz- α -2/3-L-ramnóz egységeket tartalmaznak, amelyeket a makrofágok felszínén levő lektinek felismernek és létrejön a lektinofagocitózis (Athamna és mtsai 1991). Ezzel szemben a K2 szerotípusú törzseket, amelyek más elrendezésben tartalmaznak mannóz egységeket, a makrofágok nem ismernek fel (Ofek és mtsai 1993).

Néhány tanulmány kimutatta, hogy a K szerotípusok elterjedése különböző földrajzi régiókhoz köthető (Cryz és mtsai 1986, Fung és mtsai 2000). A K1 szerotípust főleg Taiwan, Kína és Japán területén izolálják, viszont Európában és az USA-ban végzett vizsgálatokban nem azonosították. A legtöbb szerző egyetért abban, hogy a K2 szerotípus a leggyakrabban izolált típus húgyúti infekciókból, pneumoniából és bakterémiából. Ezek alapján feltételezhető, hogy világszerte a K2 a domináns szerotípus a humán klinikai mintákban, viszont a környezeti mintákban elvétve fordul elő. (Brown és Seidler 1973, Matsen és mtsai 1974, Edmondson és mtsai 1980, Podschun 1990). Ez a megfigyelés konzisztens a lektinofagocitózis koncepciójával, miszerint a K2 szerotípus megváltozott elrendezésű mannóz egységeit a lektinek nem ismerik fel és így a komplement rendszer lektinfüggő aktivációja elmarad, ami a K2 szerotípusú törzsek kiszelektálódásához vezet (Podschun és Ullmann 1998).

A mukoid fenotípus (2. ábra) elvesztése a virulencia csökkenéséhez vezethet (Takahashi és mtsai 1977). Korábban azt gondolták, hogy a mukoid fenotípus a tok poliszacharidok túltermelésének eredménye (Takahashi és mtsai 1977). Nassif és mtsai azonban bebizonyították, hogy a mukoid fenotípust az *rmpA* gén (regulator of mucoid phenotype) határozza meg, amelyet egy 180 kb méretű plazmid hordoz aerobaktint

kódoló génekkel együtt (Nassif és mtsai 1989). Az *rpmA* génben történt mutáció 1000 szeresére növelte a kísérleti egerek letalitását és a törzs megtartotta mukoid fenotípusát.



2. ábra *Klebsiella pneumoniae* mukoid, laktóz-fermentáló telepek (Rebecca Buxton, University of Utah felvétele)

3.3.2. Pilusok, fimbriák

A kolonizáció vagy fertőzés első lépéseként a baktérium a gazdaszervezet nyálkahártyájának epithel sejt felszíneire kerül. Ott biztosítania kell a szoros kapcsolatot a gazdaszervezettel – az adhéziót. Az adhezinek gyakran hemagglutininek (a vörösvértesteket agglutinálják), amelyeket a sejt felszínen található fimbriák hordozzák. A pilusok vagy fimbiák, a baktérium sejt nem ostoros, fonalszerű képződményei. Ezek a struktúrák akár 10 µm hosszúságot is elérhetik, átmérőjük 1-11 nm között változik. 15-26 kDa méretű, globuláris protein alegységeket tartalmaznak. Az adhéziós fimbriák leggyakoribb típusa az I-es típusú (közönséges) fimbria, melyeket nagyon sok baktérium fajnál azonosították, a klinikai mintákból izolált *K. pneumoniae* törzsek több, mint 80%-a hordozza (Przondo-Hessek és Pulverer 1983, Podschun és Sahly 1991). Az I-es típusú fimbriák mannóztartalmú receptorhoz kötődnek és mivel mannózzal kompetitív gátolhatók, mannózérzékenyek is nevezik. A tengeri malac vörösvértestjeit agglutinálják (hemagglutináció). A *K. pneumoniae* I-es típusú fimbriái antigenitásukban különböznek a közeli rokon *Enterobacter sp.* fimbriáitól (Adegbola és Old 1985). Bizonyítottan részt vesznek a *K. pneumoniae* törzsek uroepithel sejtekhez való megtapadásában és patkányok húgyhólyag fertőzéseinek kialakulásában (Fader és mtsai 1988, Williams és Thomas 1990). A fertőzés későbbi stádiumában a baktérium leállíthatja az I-es típusú fimbriák képzését, így a leukociták nem ismerik fel, és a lektinofagocitózis elmarad (Ofek és mtsai 1995).

A *K. pneumoniae* törzsek ún. III-as típusú mannózrezisztens fimbriákat is termelhetnek, amelyek csak a tanninnal kezelt vörösvérsejteket agglutinálják. Przondo-Hessek és Pulverer (1983) az általuk vizsgált klinikai mintákból izolált *K. pneumoniae* törzsek 85%-ánál kimutatták ezt a fimbria típust (Przondo-Hessek és Pulverer 1983). Ez a fimbria típus segíti a baktérium megtapadását különböző típusú humán sejtekhez: az endotheliumhoz, a légzőtraktus epithel sejtjeihez, az uroepithel sejtekhez (Tarkkanen és mtsai 1990, Würker és mtsai 1990, Hornick és mtsai 1992, Tarkkanen és mtsai 1997).

A III-as típusú fimbriát az *mrk* géncsoport kódolja, egyes gének plazmidon, mások a kromozómán találhatóak. A fimbria nyáláb egy nagyobb MrkA és egy kisebb, MrkD-adhezin egységekből áll (Hornick és mtsai 1995). Az újabb kutatások szerint ezek a fimbriák feltehetően a biofilmképzésben vesznek részt, mivel segítik a baktérium

megtapadását különböző szerves felületekhez (Langstraat és mtsai 2001, Di Martino és mtsai 2003). A biofilm képzésben az MrkA vesz részt, az MrkD adhezin azonban nem (Langstraat és mtsai 2001)

3.3.3. Szérum rezisztencia és lipopoliszacharidok

A gazdaszervezet mikroorganizmusok elleni védekezésének első vonalát a polimorfonukleáris granulociták fagocitózisa mellett, a szérum baktericid hatása alkotja. A szérum baktericid hatását a komplement rendszer adja, mely egyrészt a komplementmediált lízist okozza, másrészt szerepe van az opszonizáció és fagocitózis fokozásában, a gyulladási folyamatok szabályozásában, illetve az immunkomplexek keringésből való eltávolításában. A komplement kaszkád aktiváció során a komplementrendszer fehérjei a baktériumok membránján akkumulálódnak, és létrehozzák az ún. membrán károsító komplexet (Membrane Attack Complex- MAC). Ez a C5b-C9 komplex (C5b, C6, C7, C8 és C9 fehérjékből áll) a Gram-negatív baktériumok külső membránján pórusokat hoz létre, és így a baktérium lízisét okozza.

A szérum baktériumölő hatása ellen a mikróbák különböző mechanizmusokat fejlesztettek ki. A legtöbb Gram-negatív baktérium szérum-érzékeny, viszont a klinikai izolátumoknál gyakori a szérum-rezisztencia.

A Gram-negatív baktériumok külső membránját komplex molekulák, ún. lipopoliszacharidok (LPS) alkotják. A lipopoliszacharid molekula több egységből áll: lipid A, R mag (core) és O-specifikus (a Gram-negatív baktériumok fő felszíni antigénje) oldalláncok. *K. pneumoniae* törzseknél eddig kilenc O-antigén típust azonosítottak, ezek közül az O1 a leggyakoribb (Hansen és mtsai 1999). Az O-antigén legfontosabb szerepe a baktérium védelme a komplement rendszer által mediált bakteriolízistől. Több kísérlet is bizonyította, hogy O1-antigén hiányos törzsek (a tok jelenlététől függetlenül) érzékenyek a komplement klasszikus és alternatív úton aktivált baktericid hatására (Williams és Thomas 1990). A C3b opszonizáló fragmentumok nagyon gyorsan kötődnek a $K^{-}O^{+}$ sejtek felszínéhez, de a C5b-C9 komponensek képtelenek a membrán károsítására (Williams és Thomas 1990). Merino és mtsai (2000) az O5-antigén esszenciális szerepét bizonyították a szérum-rezisztencia kialakulásához és az uroepithel sejtek adhéziójához (Merino és mtsai 2000). Az O1 LPS-t kapcsolatba

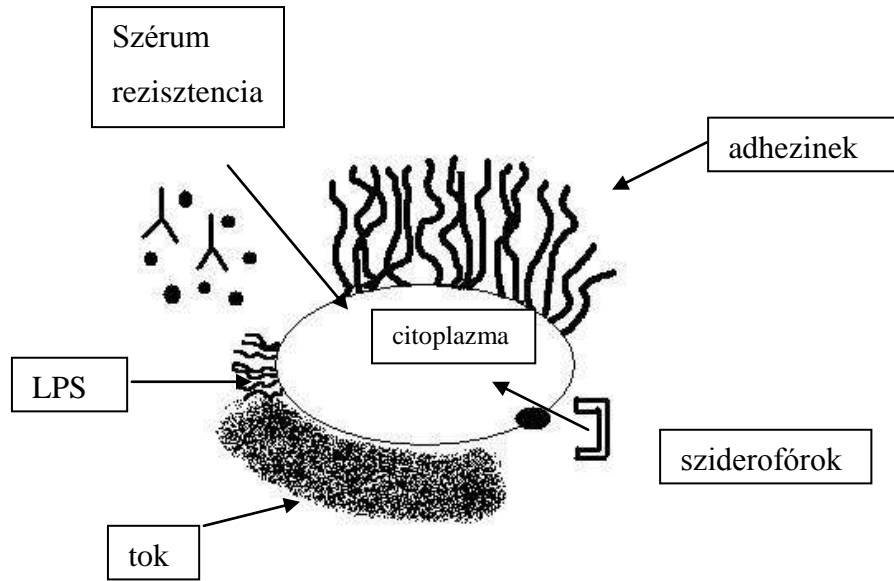
hozzák kiterjedt szövet nekrozisok kialakulásával, ami tovább súlyosbítja a *K. pneumoniae* fertőzéseket (Straus és mtsai 1985)

3.3.4. Szideroforok

A baktériumok szaporodását a gazdaszervezet szöveteiben annak különböző védekező mechanizmusai mellett a megfelelő vas ellátás is limitálja. Míg a külső környezetben elegendő szabad ferri-vas (Fe^{3+}) van jelen, addig a gazdaszervezet szöveteiben, a vérben és nyirokban a vas laktoferrinekhez és transferrinekhez kötődik és a baktérium számára hozzáférhető szabad vas koncentrációja általában nagyon alacsony (10^{-18}M) (Bullen és mtsai 1978). Kísérletek bizonyítják a gazdaszervezetben a hozzáadott vas hatását a *K. pneumoniae* patogenitására. Tengeri malacoknál a parenterálisan beadott vas hatására nagymértékben megnőtt a gazdaszervezet érzékenysége *K. pneumoniae* által okozott fertőzés kialakulására (Khimji és mtsai 1978)

Az *Enterobacteriaceae* által szintetizált szideroforok kis molekulású, magas affinitású vaskötő fehérjék. A gazdaszervezet vaskötő fehérjeitől "leemelik" a ferri-vasat, speciális receptorok segítségével megkötik és a baktérium sejtbe szállítják. Két típusuk ismert: a fenolát-típusú szideroforok (pl. enterobaktin) és a hidroxamát-típusúak (aerobaktin). (Podschun és Ullmann 1998). Williams és mtsai (1987) szerint a *K. pneumoniae* törzsek többsége termel enterobaktint, viszont csak néhány termel aerobaktint (Williams és mtsai 1987). Krone és mtsai (1985) kimutatták, hogy K2 szerotípusú *K. pneumoniae* törzsek olyan konjugatív plazmidot hordoznak, amely aerobaktin termelését kódolja (Krone és mtsai 1985). Más kutatók a K1 és K2 szerotípusú *K. pneumoniae* törzsek virulenciáját egy 180 kb. méretű plazmid jelenlétével hozzák összefüggésbe, amely aerobaktint és mukoid fenotípust (ld. korábban) kódoló géneket hordoz (Nassif és Sansonetti, 1986).

Újabb kutatások szerint egy harmadik típusú sziderofor is szintetizálódik *K. pneumoniae* törzsekben – a yersiniabaktin -, amelyet a *Yersinia* spp. patogenitási szigete kódol (Bach és mtsai 2000, Koczura és Kaznowski 2002). Egyelőre sem a prevalenciája, sem a patogenezisben betöltött szerepe nem tisztázott. A *K. pneumoniae* legfontosabb patogenitási faktorait a 3. ábra összesíti.



3. ábra *K. pneumoniae* legfontosabb patogenitási faktorainak sematikus rajza.

(Forrás: Podschun és Ullmann 1998)

3.4. A *K. pneumoniae* tipizálása

Epidemiológiai szempontból nagyon fontos a *K.pneumoniae* törzsek közötti rokonsági fok megállapítása, különösen nozokomiális járványok felderítése szempontjából. Számos módszert alkalmaznak a klonalitás megállapítására kisebb-nagyobb sikerrel. Két nagy csoportot különböztethetünk meg – a fenotipizálási és a genotipizálási módszereket.

3.4.1. Fenotipizálási módszerek

A fenotípus meghatározására irányuló módszerek - biotipizálás, szerotipizálás, fágtípus meghatározás, bakteriocin tipizálás, antibiogram meghatározás és multilókus enzimelektroforézis – alkalmazhatósága alapvetően a környezet szelekciós nyomásának függvényében alakul. Előfordulhatnak instabil antigén tulajdonságok vagy változások más tulajdonságok kifejeződésében, továbbá ezek a módszerek gyakran lassúak, nem praktikusak, és alacsony diszkriminatívitásúak.

3.4.1.1. Biotipizálás

A biotipizálás, amely a baktériumok biokémiai és tenyésztési tulajdonságainak vizsgálatán alapul, ma is a legpraktikusabb tipizálási módszer kisebb, kevésbé jól felszerelt laboratóriumok számára. A biotipizálás klasszikus próbák beállításával is elvégezhető, de kombinálható a kereskedelmi forgalomba kapható identifikáló rendszerekkel (pl. API 20E, vagy Micronaut (Podschun és mtsai 1996, Simoons-Smit és mtsai 1985). A *K. pneumoniae* biotipizálása önálló módszerként nem, de például K-antigén meghatározással együtt alkalmas epidemiológiai vizsgálatokra.

3.4.1.2. Szerotipizálás

A 1990-es évek végéig a szerotipizálás volt a leggyakrabban alkalmazott módszer a *K. pneumoniae* törzsek tipizálására. A szerotipizálás a tokantigének alapján csoportosítja a

vizsgált izolátumokat (Orskov és Orskov 1984). A *K. pneumoniae* izolátumok gyakran rendelkeznek jól fejlett poliszacharid tokkal, amely a telepek jellegzetes mukoid megjelenését adja. Az eddig leírt 82 tokantigén közül, 77 típus szerepel a nemzetközileg elfogadott szerotipizálási rendszerben (Orskov és Fife-Asbury 1977). A tokantigének alapján végzett szerotipizálás jól reprodukálható és a klinikai izolátumok többségét elkülöníti (Ayling-Smith és Pitt 1990). Hátrányai közé sorolható a nagyszámú keresztreakció, a módszer időigényessége, a savók beszerzése és fenntartásuk költségei és az eredmények interpretációjának szubjektivitása gyengébb reakciók esetén. Csak fenotípusos módszerek alkalmazása esetén a szerotipizálás biotipizálással, bakteriocin tipizálással és/vagy fágtypizálással kombinálva ad kielégítő eredményt epidemiológiai célokra. (Rennie és Duncan 1974).

3.4.1.3. Fágtypizálás

A *Klebsiella spp.* fágtypizálását először az 1960-as évekbe dolgozta ki Slopek és Milch (Przondo-Hessek 1966, Slopek és mtsai 1967). Annak ellenére, hogy az eredmények könnyen leolvashatók és a módszer reprodukálhatósága kiváló, nem terjedt el széles körben. Ennek fő oka a nem tipizálható törzsek aránya. Az Országos Epidemiológiai Központban végzett vizsgálatok alapján az 1990-ben kórházi járványokból izolált *K. pneumoniae* törzsek 82%-a volt fággal tipizálható, míg 2003-ban már csak 70%-a. (OKI éves jelentés 1990, OEK éves jelentés 2003) Hasonló tipizálhatósági arányokról – 19-67% között - számol be több nemzetközi közlemény is (Rubin 1985, Slopek 1978). Ki kell emelni azonban, hogy a molekuláris módszerek bevezetéseig a fágtypizálás a biotipizálással és az antibiogram meghatározással kiegészítve volt az egyetlen módszer, amely a nozokomiális *K. pneumoniae* izolátumokat képes volt differenciálni, és kórházi járványokat igazolni.

Magyarországon az 1960-as években két koraszülött osztályon előforduló súlyos enteritisszel, pneumóniával és szepszissel járó járványosan fellépő fertőzések kórokozójának diagnosztizálásának és azonosításának igénye vezetett a betegekből és környezetükből izolált *Klebsiella spp.* törzsek fágtypus meghatározási módszerének kidolgozásához. A betegek *Klebsiella* törzseiből izolált fágoknak a különböző törzsekhez való adaptálásával az OEK Fágtypizálási osztályán Milch és munkatársai

járványügyi célra alkalmas fág sorozatot, illetve típus sémát dolgoztak ki, mellyel 5 fág csoportba és 13 típusba tudták besorolni a *Klebsiella* spp. törzseket. A lezajlott járványból származó törzseket azonosítottuk a fertőzés forrásaként feltételezett, infúziós oldatból származó *Klebsiella* spp. törzssel. A fág típus- meghatározás módszerével sikerült igazolni az infúziós oldat szerepét a fertőzésekben, ill. a járvány kialakulásában. (Milch és Deák 1964-1965, 1966, 1968). A fág típus meghatározási módszert később lengyel kutatókkal együttműködésben továbbfejlesztették és nemzetközi módszerként elfogadtatták (Slopek és mtsai 1967).

3.4.1.4. Bacteriocin tipizálás

Annak ellenére, hogy az XX sz. végére a tokantigének alapján végzett szerotipizálás volt a legkedveltebb *K. pneumoniae* tipizálási módszer, egyértelműen szükség volt további tipizálási módszerek kidolgozására és alkalmazására. Számos szerző ajánlotta és alkalmazta a bakteriocin tipizálást. (Bauernfeind 1984, Buffenmeyer és mtsai 1976, Edmondson és Cooke 1979, Hall 1971, Slopek és mtsai 1967.). A bakteriocinek olyan baktériumok által termelt – többnyire fehérjék – anyagok, amelyek más baktériumok (általában ugyanazon species tagjai) növekedését gátolják. Adott törzs jellemezhető indikátor törzsek növekedésének gátlásával vagy indikátor törzsek által szintetizált bakteriocinek iránti érzékenységgel. A *Klebsiella* spp. által termelt bakteriocinek első részletes leírása Hamon és Peróntól származik (1963), akik pneumocineknek nevezték el. A szakirodalomban további elnevezésekkel is találkozhatunk, mint klebocinek (Buffenmeyer és mtsai 1976, Walia és mtsai 1988), klebecinek (Edmonston és Cooke, 1979), vagy egyszerűen bakteriocinek (Hall 1971). Mivel a bakteriocinek termelése a *K. pneumoniae* törzsekben nem túl gyakori, a módszert a 90-es években gyakran alkalmazták epidemiológiai célokra. A bakteriocin termelés instabilitása, valamint az alacsony reprodukálhatóság és tipizálhatóság miatt ez a módszer mára már kiszorult a rutinszerűen használt tipizálási eszköztárból. (Buffenmeyer és mtsai 1976, Edmondson és Cooke 1979, Hall 1971).

3.4.2. *K. pneumoniae* tipizálására alkalmazott főbb molekuláris tipizálási módszerek

A molekuláris tipizálási módszerek – a *K. pneumoniae* izolátumokra alkalmazva - a XX. század végén még gyerek cipőben jártak. Néhány közleményben leírták a plazmidprofil meghatározás (Bauernfeind és mtsai 1993, Bingen és mtsai 1993, Cowan és mtsai 1960, Hartstein és mtsai 1993, Montgomerie és mtsai 1993, Podschun és mtsai 1986, Walia és mtsai 1988), ribotipizálás (Arlet és mtsai 1994, Bingen és mtsai 1994, Bingen és mtsai 1993), multilókusz enzim elektroforézis (Combe és mtsai 1994, Nouvellon és mtsai 1994) és pulzáltatott mezejű gélelektroforézis (PFGE) alkalmazását (Arlet és mtsai 1994, Gouby és mtsai 1994, Poh és mtsai 1993).

Mivel a módszerek kivitelezése nagyban eltért az egyes laboratóriumok között és hiányoztak a standardizált körülmények, az eredmények összehasonlítása gyakorlatilag lehetetlen volt. Az utóbbi tíz évben több próbálkozás történt a molekuláris tipizálás harmonizálására, és a legalkalmasabb módszerek kiválasztására.

A molekuláris tipizálás olyan epidemiológiai szempontból fontos folyamat, ahol járványok igazolása és kivizsgálása, a patogén törzsek terjedési útvonalának magállapítása, a fertőző forrás felkutatása, valamint különösen virulens törzsek azonosítása a cél. Ehhez számos módszert fejlesztettek ki, amelyeknek legalább három kritériumnak kell együttesen megfelelni a széleskörű alkalmazhatóság érdekében (Olive és Bean, 1999). Elsődleges a tipizálhatóság, vagyis egy speciesen belül az egyedek megkülönböztethetők legyenek. Ezenkívül meghatározó a módszer diszkriminatívítása. Ez magában foglalja egyfelől a nem rokon törzsek egyértelmű elkülönítését, másfelől pedig az azonos forrásból származó izolátumok rokonságának bizonyítását. További fontos kritérium a reprodukálhatóság, azaz ismételt vizsgálattal azonos eredmény elérése azonos egyed (minta) esetén. A magas szintű reprodukálhatóság főleg olyan módszereknél várható el, ahol a törzsek mintázataival adatbázisokat építenek és több száz eredmény együttes összehasonlítását végzik (pl. nemzeti és nemzetközi PFGE adatbázisok).

A jelenleg alkalmazott molekuláris tipizáló módszerek többsége különböző hosszúságú DNS fragmensek elektroforetikus elválasztásán alapul. Ezek eredménye általában gélben megjelenő sávokból kialakított mintázatok összessége. Mivel a mintázatok

különlegesen bonyolultak is lehetnek, az adott módszer használhatóságát az eredmények interpretációjának könnyedsége is jellemezheti. Annak ellenére, hogy bizonyos molekuláris tipizáló módszer magas diszkriminatívással és megfelelő reprodukálhatósággal rendelkezik, a módszer komplexitása, az eredmények interpretációjának nehézségei, továbbá a módszer alkalmazásának költségei fontos szerepet játszanak a kiválasztásnál. A PCR-alapú tipizáló módszerek többségének hasonló a módszertana, könnyen kivitelezhetőek és viszonylag olcsók. A makrorestrikciós profil vizsgálat (PFGE), bár kicsit drágább és időigényesebb, szintén viszonylag könnyen kivitelezhető. Ezzel szemben olyan módszerek, mint a szekvencia alapú tipizálás (DNS szakaszok nukleotidsorrendjének meghatározása), jelentős eszköz és módszer ismeretet igényelnek, továbbá komoly szakmai felkészültséget az eredmények értékelésében. Vitathatatlanul legnagyobb előnyük az adatok pontossága és egyértelműsége, valamint az eredmények laboratóriumok közötti összehasonlíthatósága.

3.4.2.1. Random PCR módszerek

Ismeretlen DNS frágmensek PCR amplifikációjának több módszere létezik. Ilyenek a random amplifikált DNS (RAPD), az ismétlés-alapú PCR (rep-PCR), vagy az enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence (ERIC-PCR) módszerek, melyek legnagyobb előnye az egyszerűség és az, hogy nem kell előzőleg ismerni a genom szekvenciákat. Ezek a módszerek nagyon hasznosak gyors helyi epidemiológiai vizsgálatokra, a források és a járvány törzsek terjedési útjának megállapítására. Számos közleményben alkalmazták *Klebsiella pneumoniae* törzsek tipizálására, járványok igazolására (Wong és mtsai 1994, Gori és mtsai 1996, Lhopital és mtsai 1997, Shannon és mtsai 1998, Ben-Hamouda és mtsai 2003). A módszerek hátrányai közé tartozik alacsony reprodukálhatóságuk, közepes diszkriminatívásuk és a standardizáció hiánya, ami az eredmények kommunikációját különböző laboratóriumok között lehetetlenné teszi.

3.4.2.2. Makrorestrikciós profil vizsgálat pulzáltatott-mezejű gélelektroforézissel (PFGE)

1983-as első leírása után (Schwarz és mtsai 1983) a pulzáltatott-mezejű gélelektroforézisen (PFGE) alapuló makrorestrikciós profil vizsgálat a patogén baktériumok molekuláris epidemiológiai jellemzésének egyik leggyakrabban alkalmazott módszerévé (un. „gold standard”) fejlődött. Alapja a restrikciós enzimekkel feldarabolt bakteriális kromoszóma vizsgálata gélelektroforézis alkalmazásával. Ez a makrorestrikciós ujjlenyomat (fingerprinting) módszer két technika kombinációját jelenti: egyrészt a kromoszóma ritkán vágó (kevesebb, mint 30 felismerő hely/genom), ún. II típusú restrikciós endonukleázokkal történő feldarabolását, másrészt az így kapott fragmensek mintázatainak PFGE-vel való vizsgálatát. A PFGE olyan gélelektroforézis, ahol az elektromos mező iránya és/vagy intenzitása meghatározott időközönként változik. Ezáltal az 50 kb-nál nagyobb DNS fragmensek képesek szétválni és vándorolni a gélben, jellegzetes mintázatot kialakítva.

Ezek közül a legsikeresebbnek a CHEF (Contour-clamped homogenous electric field) technika bizonyult. Itt hexagonálisan elhelyezett elektródák meghatározott időközönként 120°-os szögben váltogatják az állandó feszültségű (általában 6V/cm) elektromos erőtér irányát.

Számos fizikai és kémiai tényező befolyásolja a DNS molekulák szétválasztását a PFGE során. A legfontosabb a pulzációs idő (az elektromos erőtér váltakozásának időintervalluma). Minél hosszabb a pulzációs idő, annál nagyobb méretű DNS fragmentumokat tudunk szétválasztani, viszont rosszabb felbontással. A tapasztalatok azt mutatják, hogy adott időkereten belül a pulzációs idő exponenciális növelésével érhető el a DNS fragmentumok legjobb lineáris szétválasztása. Gyakran használt az 5-40 s pulzációs idő keret, amely az 50-600 kb közötti DNS fragmentumok optimális szétválasztását biztosítja.

A hőmérséklet szintén befolyásolja a migrációs sebességet és a felbontást. Magas hőmérséklet esetén a DNS gyorsabban mozog, de a felbontás csökken. Ezért speciális hűtő rendszerek alkalmazásával a futtató puffert állandó (14°C) hőmérsékleten tartják. Az agaróz típusa és a puffer ionerőssége ugyancsak hatással vannak a fragmentumok mozgására. A PFGE-hez speciális agarózt ajánlanak, amely magas viszkozitással és

alacsony elektro-endoozmóztatással rendelkeznek. Általában az 1%-os gél optimális az 50 kb és 1Mb közötti DNS fragmentumok szétválasztására, ennél magasabb koncentráció (1,2-1,6%) elmosódott, diffúz sávokat és gyenge felbontást eredményez. A futtatás során keletkező hő csökkentése, valamint rövidebb futtatási idő elérése érdekében praktikus alacsony ionerősségű pufferek (0,25-0,5x TAE vagy TBE) alkalmazása.

A makrorestrikciós profil, vagy ujjlenyomat a PFGE-vel szeparált korlátozott számú (<30) nagyméretű (>50kb) DNS fragmens mintázata. Mivel a bakteriális kromoszóma igen nagy méretű molekula, fontos, hogy a restrikciós enzimnek csak kevés felismerő helye legyen („ritkán vágó”). Ellenkező esetben nagyszámú, kisméretű DNS darabok sokasága keletkezik, ami az értékelést lehetetlenné teszi. Az ismert, több mint 500 restrikciós enzim közül csak alig 20 azoknak a száma, amelyek erre a célra használhatók. A makrorestrikciós analízishez leggyakrabban az *XbaI* (Gram-negatív baktériumok többsége) és a *SmaI* (Gram-pozitívok nagy része) restrikciós enzimeket alkalmazzák. *K. pneumoniae* törzsek vizsgálatához az *XbaI* mellett *HaeIII* és *SpeI* enzimeket is használják (Gouby és mtsai 1994, Monnet és mtsai 1997, Chang és mtsai 2000, Sechi és mtsai 2001, Lebessi és mtsai 2002)

A hagyományos izolálási módszerekkel nyert DNS alkalmatlan makrorestrikciós profil vizsgálatra, mivel a nagyszámú mechanikai művelet során a DNS molekula széttöredezik. Ennek kivédésére a pufferben szuszpendált baktérium sejteket beágyazzák ultra tiszta, nukleázmentes, alacsony olvadási ponttal rendelkező agarózból készült blokkokba („plug”, vagy „dugó”), így mesterséges támasztékot kapnak a sérülékeny DNS molekulák. Igen fontos az agaróz blokkokba beágyazott baktérium koncentrációja. Ez többnyire species függő és ma már standardizált, általában $1-5 \times 10^9$ CFU/ml baktérium sejt/blokk.

Az elkészült agaróz blokkokat legalább 2 órára lízis oldatba helyezzük, ahol detergensok és proteolitikus enzimek a baktérium sejtfal alkotórészeit lebontják és blokkolják a nukleázok működését. A Gram-negatív baktériumokra használt lízis oldat általában 1% nátrium lauroyl sarcosint, 1% proteináz K-t és 0,5 M EDTA-t tartalmaz. A Gram-pozitív baktériumok megfelelő előkészítésére további sejtfalbontó enzimek hozzáadása szükséges, pl. lysostaphin, mutanolysin, lyozime. A lízist az agaróz blokkok többszöri mosása követi (4-5 x 30 perc TE pufferben), ezután a beágyazódott DNS-t tartalmazó agaróz blokk 4°C-on több hónapig tárolható.

A restriktációs enzim hozzáadása előtt az agaróz blokkokból kisebb darabokat vágunk, amelyeket később be lehet illeszteni az agarózgél zsebeibe. A plug darabokat az ajánlott puffert tartalmazó csövekbe helyezik és hozzáadnak 20-40 U restriktációs enzimet. Az enzimátikus emésztés a gyártó által meghatározott, megfelelő hőmérsékleten általában 4 órán keresztül folyik.

Az optimális futtatási paraméterek a baktériumfajtól, az alkalmazott restriktációs enzimtől, valamint a PFGE készülék típusától függően változhatnak. Az utóbbi években a pulzáltatott mezejű gélelektroforézis alapvető futtatási paramétereit standardizálták, így 0,8-1% agaróz gél, 0,5 TRIS-borát-EDTA futtató puffer, 120° reorientációs szög, 5-50 s közötti pulzációs időkeret, 6V/cm állandó feszültség, 13°C-on, 24 órán keresztül az ajánlott protokoll (Struelens 2001).

A gélben levő DNS mintázatok láthatóvá válnak ethidium-bromidos festés és mosás után, amit speciális kamerával UV fény alatt lefényképeznek.

Az elektroforézisen alapuló tipizáló rendszerek, így a PFGE esetében is, az egyik legfontosabb elvárt tulajdonság a reprodukálhatóság. A legmondosabb kivitelezés mellett is előfordulnak eltérések azonos minták különböző futtatásai között. Ennek kiküszöbölése molekulásúly markerek alkalmazásával történik. Általánosan használják a λ -létrát (48,5-1212,5 kb monomer), de alkalmazhatók olyan referencia törzsek is, amelyek legalább 16, 20 kb és 800 kb közötti méretű restriktációs terméket adnak. A marker segítségével a mintázatok összehasonlíthatók.

A makrorestriktációs profil analízis a baktérium törzsek restriktációs termékeinek (DNS fragmensek) mérete és száma alapján végzett összehasonlítás. Az azonos baktériumfajhoz tartozó egyedek azonos méretű genommal rendelkeznek, így általában közel azonos számú restriktációs terméket adnak. Az egyedek közötti rokonsági fok megállapítása – ami a molekuláris epidemiológia célja – a restriktációs fragmensek méret- és számbeli összehasonlításán alapul. Amennyiben két, adott baktérium fajhoz tartozó egyed mintázata teljesen azonos méretű és számú restriktációs termékéből áll (100%-os egyezés), a törzseket azonos genetikai klónhoz tartozónak tekintjük. Minél kisebb a rokonsági fok, annál kevésbé valószínű a közös ő (pl. az adott járványban való részvételük). Az általánosan elfogadott ajánlások szerint 1 és 4 sáv (restriktációs termék) közötti különbség esetén a törzsek egyazon pulzotípus különböző szubtípusaihoz tartoznak (Tenover és mtsai 1995, ECDC ajánlás 2007), vagyis epidemiológiailag

összefügghetnek. Azokat a törzseket, amelyek makrorestrikciós profiljai öt, vagy annál több termékben eltérnek, különböző pulstípusokhoz kell besorolni és ennél fogva nem valószínű az azonos járványügyi eseményben való részvételük. Ennek megítélése azonban sok tapasztalatot igénylő folyamat, annak ellenére, hogy ma már speciális összehasonlító szoftverek (BioNumerix, Fingerprinting) segítik a szakembereket. A szoftveres analízishez TIFF file-ként rögzített gélfényképeket használnak, amelyekkel közös adatbázist építenek. A mintázatok összehasonlítása különböző algoritmusok alkalmazásával történhet, ma már döntően a Dice-koefficiens (az azonos méretű fragmensek számát veszi figyelembe) és az UPGMA (unweighted pair group method, számtani átlagokat képez) segítségével generált családfa (dendrogram) a makrorestrikciós profilvizsgálat alapja. (Struelens 2001)

Jelenleg a makrorestrikciós profil vizsgálat a molekuláris epidemiológia leggyakrabban alkalmazott módszerévé vált, diszkriminativitása általában a 95-100%-ot is eléri. Ma negyvenöt nemzetséghez tartozó, több mint 120 baktérium faj tipizálására használják. Ez annak köszönhető, hogy a makrorestrikciós mintázatok gyakorlatilag a teljes bakteriális genomot magukba foglalják, így a mutációs események nagy része nyomon követhető. A módszert alkalmassá teszi nem csak helyi járványok igazolására, de standardizált protokollok és számítógépes adatbázisok segítségével különböző epidémiás klónok földrajzi elterjedésének, a klónokon belül végbement molekuláris evolúció vizsgálatára is.

A módszer hátrányai közé sorolhatók a viszonylag drága készülékek és szoftverek beszerzése, a vizsgálat akár több napig tartó kivitelezése, a magas szintű technikai képzés szükségessége, valamint az eredmények laboratóriumok közötti összehasonlításának nehézségei.

3.4.2.3. Plazmid profil vizsgálat és restrikciós fragmens hossz polimorfizmus (RFLP)

A plazmid tipizálás magában foglalja adott baktérium törzsben található plazmidok számának, méretének és/vagy restrikciós enzimekkel generált mintázatának vizsgálatát. A plazmidok olyan cirkuláris extrakromoszomális genetikai elemek – DNS molekulák –, amelyek önálló replikációra képesek. Bár nem szükségesek a baktériumok alapvető életfunkcióihoz, számos antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát, metabolikus enzimeket, toxinok és bakteriocinek termeléséért felelős géneket kódolhatnak. Továbbá rendelkezhetnek olyan génkészlettel is, amely konjugáció révén biztosítja átjutásukat más gazdasejtbe és ez által az összes, plazmidon kódolt tulajdonság átvitelét is (az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia terjedésének legfőbb mechanizmusa) (Mayer 1988).

Egy baktériumsejt különböző méretű (1-250 kb között) és számú plazmidot tartalmazhat. Egy adott törzs plazmidjainak méret szerinti elektroforetikus szétválasztása a plazmid profil vizsgálat. Ennek legfontosabb lépése a plazmid(ok) elkülönítése a bakteriális kromozómától. Erre számos, a bakteriális és a plazmid DNS eltérő tulajdonságain alapuló eljárás létezik. Míg a kémiai denaturáció során a kromoszomális DNS nagyszámú fragmensre esik szét és nem képes regenerálódni, addig a plazmidok nagyon gyorsan regenerálódnak és nem diffundálnak szét a gélben. Természetesen minél nagyobb a plazmid DNS molekulája, annál törekenyebb és nehezebben zár össze.

A plazmid izolálás klasszikus módszerei a Birnboim és Doli (1979), valamint a Kado és Liu (1981) által kidolgozott eljárások, de ma már több cég is forgalmaz olyan kitéket, melyekkel a plazmid DNS a profil vizsgálat mellett alkalmas restrikciós emésztésre, klónozási kísérletekhez vagy DNS-próbák készítésére is. Ma már a plazmid profil vizsgálatot nem alkalmazzák önálló tipizálási módszerként. Bebizonyosodott ugyanis, hogy azonos genetikai klón plazmidhordozó és plazmidmentes egyedekből is állhat, továbbá azonos plazmid profil előfordulhat különböző klónok törzseiben is. Sőt, az azonos méretű plazmidok sem feltétlenül azonos képletek. Kiegészítő tipizálásként azonban a plazmid profil vizsgálat igen informatív, főleg az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia terjedésének megítélésére szempontjából.

A plazmidok összehasonlítása restrikciós fragmens hossz polimorfizmussal (RFLP) végezhető el. A módszer lényege, hogy restrikciós emésztés után a plazmidokból képződött fragmensek alkotta mintázatokat gélelektroforézis segítségével vizsgálják és összevetik. Mivel a plazmid DNS molekulája viszonylag kicsi – a kromoszomális DNS-hez képest – érdemes gyakori hasítási hellyel rendelkező restrikciós endonukleázt választani, pl. *EcoR I*, *Hind III*, *Pst I*. A restrikciós emésztéshez megfelelő minőségű plazmid DNS izolálására a kereskedelmi forgalomba kapható kitek kiválóan alkalmasak. Adott baktérium törzs teljes plazmid tartalma is emészthető, de ebből (a vegyes restrikciós mintázat miatt) nehéz következtetni egyes R-plazmidok hasonlóságára vonatkozóan. A plazmidok önálló vizsgálatához szükség van előzetes futtatásra, ahol a gélből a kérdéses plazmidot ki lehet vágni, és később emésztetni. Másik megoldás lehet konjugáció révén a vizsgálni kívánt plazmidot recipiens törzs sejtjeibe átvinni, majd azokból hagyományos módszerekkel izolálni, és emésztetni.

3.4.2.4. Ribotipizálás

A ribotipizálás a riboszomális ribonukleinsav (rRNS) gének restrikciós mintázatainak összehasonlítása. A módszert széles körben alkalmazták *K. pneumoniae* törzsek tipizálására (Maslow és mtsai 1993, Arlet és mtsai 1994, Lhopital és mtsai 1997, Sader és mtsai 1998, Brisse és mtsai 2000). A módszer diszkriminativitása nagyon jó, mivel számos riboszomális RNS operon létezik a *K. pneumoniae* törzsek genomjában, automatizálható riboprinter alkalmazásával, könnyen kivitelezhető és standardizálható (Brisse 2000). Döntően az *EcoRI* enzimet használják a restrikciós emésztéshez. A módszer hátrányai közé tartozik a riboprinter igen magas ára, valamint járványok igazolására való korlátozott alkalmazhatósága.

3.5. A *K. pneumoniae* epidemiológiája

A *Klebsiella spp.*, beleértve a *K. pneumoniae*-t is általánosan előfordul a természetben. Két fő élőhelye van, a környezet (felszíni és szennyvizek, talaj, növények felületén és szöveteikben), valamint az emlősök különböző nyálkahártya felületein.

Az emberben a *K. pneumoniae* szaprofitaként van jelen a nasopharynxban és a gastrointestinalis traktusban. Mint Gram-negatív baktérium nem talál megfelelő szaporodási feltételeket az emberi bőr felszínén, így a tranziens flora tagjaként tartják számon.

A *K. pneumoniae* tünetmentes hordozásáról készült felmérések eredményei igen változatosak: területen a széklet mintákban 5-38% közötti, míg az orr-torokban 1-6% közötti arányban fordultak elő (Podschun és Ullmann 1998). Egy Kínában végzett tanulmány szerint a 65 év feletti körében az orr-torok kolonizációja elérheti a 22%-ot is (Wang és mtsai 2009). Kórházi körülmények között azonban a hordozási arány drasztikusan megemelkedik és egyenesen arányos az ápolási napok számával. Ehhez hozzájárul a kórházi személyzet szintén magas hordozási aránya is. Egyes tanulmányok szerint a *K. pneumoniae* kórházi hordozásának mértéke elérheti a 77%-ot székletben, 19%-ot torokban és 42%-ot az ápoltak kezén. (Podschun és Ullmann 1998). Fentiek ismeretében nem meglepő, hogy a legtöbb – és egyre több - *K. pneumoniae* által okozott fertőzés a kórházakban fordul elő és ezek jelentős részét antibiotikumokkal szemben rezisztens törzsek okozzák. (Brisse és mtsai 2006)

Az egészségügyi intézményekben a *K. pneumoniae* terjesztésében a páciensek gastrointestinalis traktusa és az ápoló személyzet keze játszik fő szerepet. Emellett a *K. pneumoniae* törzsek kitűnően megélnek a kórházi környezetben gyakorlatilag bármilyen felületen, infúziós palackokban, vérvérvételkészítvényekben, endoszkópon, ultrahang készüléken. (Gaillot és mtsai 1998, Podschun és Ullmann 1998, Aumeran és mtsai 2010). Gastmeier és munkatársai által végzett vizsgálatok kimutatták, hogy *K. pneumoniae* törzsek átlagosan 7,5 napig (4-27 nap) is életben maradnak különböző felületeken a kórházi környezetben. (Gastmeier és mtsai 2006). A *K. pneumoniae* ezen tulajdonságai (gyors terjedés, hosszú túlélés) is hozzájárulnak kórházi járványok

kialakulásához döntően Perinatális Intenzív Centrumokban és felnőtt intenzív osztályokon.

A *K. pneumoniae* jelentősége, mint területen szerzett súlyos fertőzések kórokozója, egyre nő. A klasszikus Friedlander pneumóniát ma már főleg krónikus alkoholistákban diagnosztizálják (Carpenter 1990). A legújabb felmérések eredményei még nem elegendők, de az otthon szerzett *K. pneumoniae* által okozott akut tüdőgyulladások száma elenyésző Európa, USA, Ausztrália és Argentína területén, ahol Ko és munkatársai (2002) összesen négy ilyen esetet találtak kórházaiban ápolott betegek között, viszont 53 esetet Dél-Afrika és Taiwan kórházaiban. Más tanulmányok szintén alátámasztják ezt a megállapítást, sőt néhány vizsgálatban a *K. pneumoniae* a vezető kórokozó az otthon szerzett pneumóniáknál Dél-Afrikában és több Ázsiai országban (Feldman és mtsai 1995, Jong és mtsai 1995, Ishida és mtsai 1998, Liam és mtsai, 2001).

3.6. A *K. pneumoniae* antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája

A *K. pneumoniae* természetes rezisztenciával rendelkezik az aminopenicillinekkal és a karboxi-penicillinekkal szemben, mivel kromozómálisan kódolt széles-spektrumú β -laktamázt termel, melyet háromféle gén kódolhat: *bla_{SHV}* (SulphHydryl reagent Variable), *bla_{LEN}* és *bla_{OKP}* (other *K. pneumoniae* β -lactamase) (Haeggman és mtsai 2004). Ezek az enzimek a Bush-Jacoby–Medeiros osztályozás szerint a 2b csoportba (széles spektrumú β -laktamázok), valamint az Ambler-féle osztályozás szerint az A molekuláris osztályba tartoznak (ld. később). A leggyakoribb kromozómálisan kódolt alléltípusok a *bla_{SHV-1}* vagy *bla_{SHV-11}* gének (Chaves és mtsai 2001, Lee és mtsai 2006). Az ureido-penicillineknek és az 1. generációs cefalosporinoknak is csekély aktivitásuk van a *K. pneumoniae* törzsekkel szemben. A Gram-negatív baktériumokra ható más antibiotikumcsoportokkal szemben – széles-spektrumú cefalosporinok, karbapenemek, aminoglikozidok, fluorokinolonok, tetraciklinek, sulfonamidok - a *K. pneumoniae*-nak nincs természetes rezisztenciája.

A XXI. század elején azonban megjelentek a multirezisztens – β -laktámokkal, fluorokinolonokkal, tetraciklinnel és aminoglikozidokkal szemben rezisztens - *K.*

pneumoniae törzsek, amelyek világszerte egyre több és súlyosabb nozokomiális járványt okoznak. Az 1970-es években a *K. pneumoniae* törzsek döntően aminoglikozid rezisztenciával rendelkeztek (Martin és mtsai 1971, Noriega és mtsai 1975). 1983-ban megjelentek a kiterjedt-spektrumú β -laktamázokat termelő *K. pneumoniae* (ESBL-KP) törzsek, amelyek ezáltal rezisztenssé váltak az oxyimino-cefalosporinokkal szemben is (Medeiros 1993, Reish és mtsai 1993, Bauernfeind és mtsai 1993). Az azóta eltelt közel 30 év alatt a világ majdnem összes országában elterjedtek és az egészségügyi intézmények többségében számolni kell a jelenlétükkel, valamint az általuk okozott súlyos fertőzések és kiterjedt nozokomiális járványok egyre növekvő számával.

3.6.1. Aminoglikozidokkal szembeni rezisztencia

Az aminoglikozidok fehérje szintézist gátló baktericid hatású antibiotikumok. Alapvető készítmények a klinikai szempontból jelentős Gram-negatív baktériumok - *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp. és *Pseudomonas* spp – által okozott fertőzések kezelésében. Potenciális nephro- és ototoxicitásuk, valamint a velük szemben kialakuló rezisztencia ellenére ezeket az antibiotikumokat ma is széles körben alkalmazzák döntően kombinációban β -laktám vagy sejtfal aktivitású antibiotikumokkal kombinációban.

Az aminoglikozidokkal szembeni rezisztencia több mechanizmusát írták le. Ezek között van az antibiotikum csökkent mértékű felvétele (a sejtfal permeabilitásának változása), a riboszómában található célmolekula megváltozása, efflux pumpa működtetése vagy enzimatisz modifikáció (Vakulenko és Mobashery 2003). A klinikai mintákból izolált *Enterobacteriaceae* törzseknél az aminoglikozid rezisztencia döntően enzimatisz modifikáció eredménye. A megváltoztatott szerkezetű aminoglikozid molekula így csak gyengén kötődik a riboszómához és a baktérium képes túlélni az antibiotikum jelenlétében. Jelenleg három aminoglikozid-modifikáló enzim családot ismerünk: foszotranszferázok (APH-k), acetiltranszferázok (AAC-k) és nukleotidiltranszferázok (ANT-k) (Vakulenko és Mobashery 2003).

Az utóbbi évtizedben az aminoglikozid rezisztencia epidemiológiája egyre összetettebb. Egyfelől azért, mert számos aminoglikozid-modifikáló enzim létezik, másfelől pedig az aminoglikozid rezisztenciát egyéb – nem enzimatisz – mechanizmus is befolyásolja.

Újabb vizsgálatok bebizonyították, hogy az aminoglikozid rezisztencia spektruma sokkal szélesebb olyan országokban és kórházakban, ahol a legtöbb klinikailag alkalmazható aminoglikozidot - gentamicin, tobramycin, amikacin és netilmicin – széles körben használják (Over és mtsai 2001). Belgiumban, Franciaországban és Görögországban, ahol az amikacint sokkal nagyobb mértékben használták más Európai országokhoz képest, az AAC(6')-I amikacin rezisztenciát biztosító enzim előfordulása is sokkal magasabb. Ezzel szemben Németországban, ahol a gentamicin adta a 80%-át az összes felhasznált aminoglikozidoknak az ANT(2'')-I és az AAC(3)-IV gentamicin rezisztenciát biztosító enzimek terjedtek el (Miller és mtsai 1997). Érdekes módon, annak ellenére, hogy több, mint 50 aminoglikozid-modifikáló enzimet ismerünk, az *Enterobacteriaceae* család tagjai – beleértve a *K. pneumoniae*-t is – csak néhány változatot preferálnak: leggyakrabban az ANT(2'')-I és az AAC(6')-I, ritkábban az AAC(3)-I, AAC(3)-II, AAC(3)-III, AAC(3)-IV és AAC(3)-VI enzimeket (Vakulenko és Mobashery 2003).

3.6.2. Fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia

A fluorokinolonok kiváló aktivitással rendelkeznek az *Enterobacteriaceae* törzsek ellen és az 1980-as években történt klinikai bevezetésük óta kiterjedten használják ezen patogének által okozott fertőzések kezelésére. Az utóbbi 20 év alatt azonban az *Enterobacteriaceae* törzseknél a fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia jelentős arányokat ért el, bizonyos egészségügyi intézményekben akár 50%-ot is meghaladó mértékben. (Robicsek és mtsai 2006, Canton és mtsai 2008).

Az utóbbi évekig az *Enterobacteriaceae* törzsek fluorokinolon rezisztenciáját két fő mechanizmus határozta meg: többszörös mutációk jelenléte a DNS topoizomeráz-II-t (*gyrA* és *gyrB*), valamint a topoizomeráz IV egyik alegységét kódoló génekben (*parC*) (ún. kinolon rezisztenciát meghatározó régiókban - QRDR), ami a magas szintű rezisztencia kialakulásáért felelősek, ill. aktív efflux pumpák működtetése (pl. AcrAB-TolC *Escherichia coli* törzsekben) gyakran csökkent membrán permeabilitással és porin vesztéssel párosulva (Robicsek és mtsai 2006a, Jacoby 2005, Huang 1996). Az elmúlt néhány évben 3 újabb csökkent fluorokinolon érzékenységet biztosító mechanizmust írtak le, és mindegyikük mobilis genetikai elemekhez (főleg plazmidokhoz) köthető.

(Robicsek és mtsai 2006a, Robicsek és mtsai 2006b, Tran és mtsai 2002, Yamane és mtsai 2007). Az egyik ilyen mechanizmust *qnr* gének terjesztik, ahol az általuk termelt fehérjék a topoizomeráz II-höz kötődve akadályozzák a fluorokinolonok hozzáférését. A QnrA, QnrB és QnrS világszerte elterjedtek, főleg kiterjedt-spektrumú β -laktamázokat termelő *Enterobacteriaceae* törzseknél írták le. (Robicsek és mtsai 2006a, Tran és mtsai 2002). Egy másik mechanizmus – az aminoglikozid acetiltransferáz (6')-Ib egy variánsa, az *aac(6')-Ib-cr* terméke – révén a baktériumok azokat a fluorokinolonokat képesek inaktiválni, amelyeknél a piperazin-gyűrűn amino-nitrogén található (norfloxacin, ciprofloxacin) (Robicsek és mtsai 2006a, Robicsek és mtsai 2006b). Mindkét mechanizmus kialakulása és terjedése nagyon aggasztó, mivel ezeket a géneket konjugatív plazmidok hordozzák, általában más rezisztencia génekkel együtt (pl. kiterjedt-spektrumú és AmpC-típusú β -laktamázok, egyéb aminoglikozid rezisztencia gének) (Robicsek és mtsai 2006a). Nemrég *E. coli* törzsekben leírtak egy harmadik transzferábilis rezisztencia mechanizmust is, amely plazmidhoz kötött, efflux pumpa működését kódoló gének – a *qep* gének – által biztosít rezisztenciát a hidrofil fluorokinolonokkal szemben (pl. norfloxacin és ciprofloxacin) (Yamane és mtsai 2007, Perichon és mtsai 2007).

Az *Enterobacteriaceae* törzsek magas szintű fluorokinolon rezisztenciája többtényezős folyamat. A szerzett fluorokinolon rezisztencia determinánsok önmagukba csak alacsony szintű rezisztenciát biztosítanak, viszont jelenlétük hozzásegíti a magas szintű rezisztenciáért felelős, kromoszómális mutációkkal rendelkező törzsek szelekcióját és így hozzájárulnak a riasztóan magas rezisztencia arányokhoz. (Robicsek és mtsai 2006a, Strahilevitz és mtsai 2007).

3.6.3. β -laktámokkal szembeni rezisztencia

Bush és mtsai 1995-ben publikálták a β -laktamázok ma is alkalmazott csoportosítását, melyben az ún. Bush-Jacoby-Medeiros féle funkcionális osztályozást ötvözik az Ambler-féle szerkezeti felépítésen alapuló csoportosítással. Eszerint a β -laktamázok négy csoportját különböztetünk meg (Bush és mtsai 1995):

- Csoport 1: Ambler-féle C molekuláris osztályba tartozó cefalosporinázok, melyek általában nem gátolhatók klavulánsavval, és döntően kromozómálisan kódoltak. Újabb plazmidon kódolt változatai is egyre inkább terjednek. A csoport tagjait AmpC-típusú β -laktamázoknak nevezik (Bush és mtsai 1995, Jacoby 2009, Livermore 1995).
- Csoport 2: Ambler-féle A és D molekuláris osztályba tartozó β -laktamázok különböző szubsztrát specifitással. Többnyire gátolhatók β -laktamáz inhibitorokkal.
- Csoport 3: Ambler-féle B molekuláris osztályba tartozó metallo- β -laktamázok, melyek hidrolizálják a penicillineket, cefalosporinokat és karbapenemeket is. Az aktív centrumban kétértékű kationt tartalmaznak (pl. Zn^{2+}), és működésüket kelátképző vegyületekkel lehet gátolni (etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA), dipikolinsav) (Shin és mtsai 2008, Yong és mtsai 2002)
- Csoport 4: penicillinázok, melyek nem gátolhatók klavulánsavval.

3.6.3.1. Kiterjedt-spektrumú β -laktamázok

Az elsőként leírt SHV és TEM-típusú ESBL-ek jellemzésére először 1988-ban alkalmazták a kiterjedt-spektrumú β -laktamáz elnevezést. Ez főleg az akkor ismert plazmidon kódolt, fent említett széles-spektrumú cefalosporinokat bontó β -laktamázok meghatározására vonatkozott (Philippon és mtsai 1989), viszont az újabban leírt széles-spektrumú cefalosporint bontó β -laktamáz enzimek besorolására már elégtelen. A számos vita ellenére ma sem rendelkezünk újabb definícióval. Így általánosan

elfogadott meghatározás, hogy az ESBL enzimek hidrolizálják az oxyimino-cefalosporinokat (ceftazidim, ceftriaxon, cefotaxim, cefepim), monobaktámokat (aztreonam) és a széles-spektrumú penicilleneket (ampicillin, amoxicillin), nem képesek hidrolizálni a karbapenemeket (imipenem, meropenem) és a cefamicineket (cefoxitin és cefotetan). A β -laktamáz inhibitorok (klavulánsav, szulbaktám, tazobaktám) általában gátolják az enzim működését (Paterson és Bonomo 2005, Stürenburg és Mack 2003).

A XX. század végéig döntően az SHV, TEM és OXA-típusú ESBL-k terjedtek el az *Enterobacteriaceae* család tagjainál, és így a *K. pneumoniae* törzseknél is. Az utóbbi évtizedben viszont a bélbaktériumoknál dominánssá vált a CTX-M-típusú ESBL, és ma már pandémiáról beszélünk (Canton és mtsai 2008).

3.6.3.1.1. SHV-típusú ESBL-k

A *K. pneumoniae* törzsek többsége rendelkezik kromoszómális bla_{SHV-1} vagy bla_{SHV-11} génekkel, amelyek azonban nem-kiterjedt-spektrumú β -laktamázokat kódolnak (Chaves és mtsai 2001, Lee és mtsai 2006). Plazmidok által hordozott bla_{SHV} gének feltehetően a kromoszómából mobilizálódtak a plazmidokra az IS26 inszerciós elem közreműködésével (Ford és Avison, 2004). Az IS26 elem beépülését több, plazmidon kódolt SHV-típusnál (pl. SHV-2a, SHV5, SHV-12) számos közleményben leírták (Gutmann és mtsai 1995, Nüesch-Inderbinnen és mtsai 1997, Podbieski és mtsai 1991).

Az SHV-típusú β -laktamázok esetében a széles-spektrumú cefalosporinokkal szembeni rezisztencia kialakulásában döntően a Gly238 és Glu240 pozíciókban bekövetkező aminosav változások játszanak jelentős szerepet. Az SHV-2, SHV-2a és SHV-3 enzimek, amelyekben a Gly238Ser szubsztitúció önmagában van jelen, magasabb szintű rezisztenciát mutatnak cefotaximmal, mint ceftazidimmal szemben (Bradford 2001, Podbieski és mtsai 1991). A Gly240 pozícióban bekövetkező mutációk azonban az enzim ceftazidimmal szembeni hidrolitikus aktivitását is emelik. Az SHV-5 és SHV-12 enzimeket (Gly238Ser és Glu240Lys mutációk) termelő törzsek ceftazidimmal szemben is magasabb szintű rezisztenciát mutatnak (Gutmann és mtsai 1995, Nüesch-Inderbinnen és mtsai 1997).

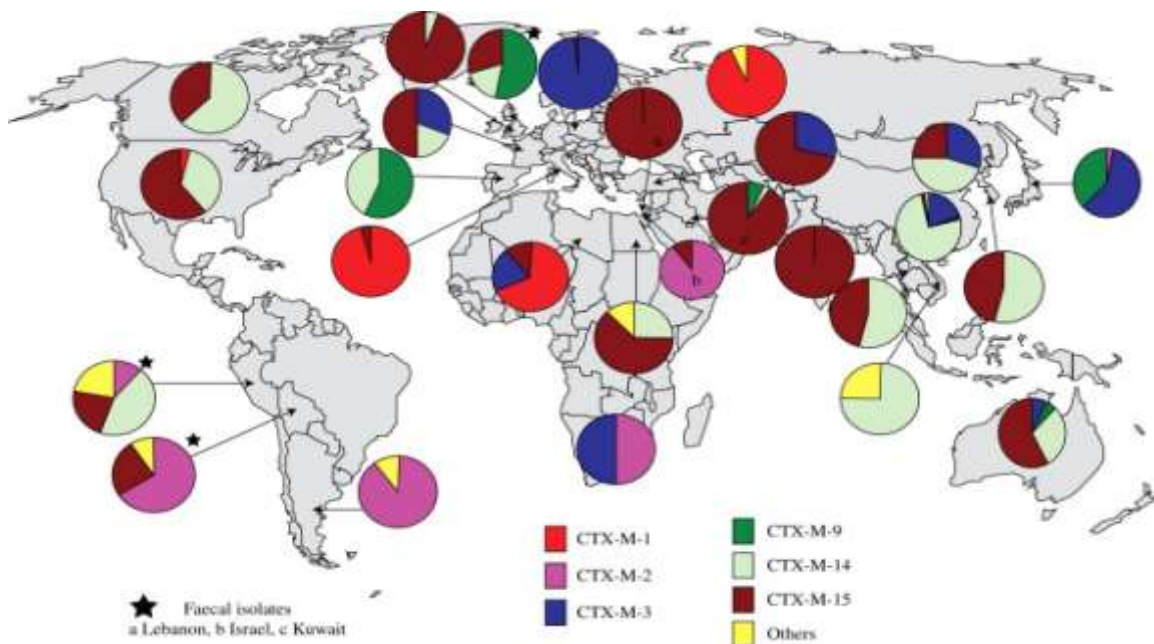
Jelenlegi ismereteink szerint és a klasszikus definíció szerint az összesen 134 eddig leírt SHV-típusú enzim közül 44 tartozik a valódi ESBL-ek közé (<http://www.lahey.org/Studies/>). Ezek közül az SHV-2, SHV-2a, SHV-5 és SHV-12 típusok terjedtek el széles körben főleg *Enterobacteriaceae* és *Pseudomonas spp.* törzsekben. Ma a legelterjedtebb SHV-típus az SHV-12, melyet főleg Távol-Keleten klinikai mintákból izolált *K. pneumoniae* törzseknél és területen szerzett húgyúti fertőzésekből izolált *E. coli* törzseknél mutattak ki (Canton és mtsai 2008).

3.6.3.1.2. TEM-típusú ESBL-k

A TEM-1 volt az első plazmidon kódolt β -laktamáz, amelyet Gram-negatív baktériumokban írtak le 1965-ben (Turner 2005). Eddig 182 típusát írták le (<http://www.lahey.org/Studies/>), ezek közül 92 ESBL típus. Hall és Barlow (2004) filogenetikai vizsgálatok alapján feltételezik, hogy a rokon TEM és SHV enzimek kb. 300-400 millió évvel ezelőtt váltak el egymástól. Az Asp104, Arg164, Ala237, Gly238 és Glu240 pozíciókban jellemző aminosav szubsztitúciók találhatóak, és az SHV-típusú ESBL-enzimekhez hasonlóan az Gly238Ser szubsztitúció a cefotaxim hidrolíziséért, a Glu240Lys szubsztitúció a ceftazidim hidrolíziséért felelős (Paterson és Bonomo 2005). A TEM ESBL-enzimek főleg *K. pneumoniae* és *E. coli* törzsekben fordulnak elő, de az *Enterobacteriaceae* család több tagjában is azonosították: *E. aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *P. rettgeri*, *Salmonella spp.* (Shah és mtsai 2004). Az Egyesült Államokban TEM-10 ESBL-enzimet termelő törzsek okoztak kórházi járványokat, Franciaországban a TEM-3 ESBL-enzim volt gyakori, TEM-12 és TEM-26 enzimet termelő törzsek pedig Nagy-Britanniában okoztak járványokat. Nozokomiális járványt okozó TEM-24 enzimet termelő törzseket írtak le Lengyelországból, Koreában viszont TEM-52 enzimet termelő törzsek terjedtek el (Bradford 2001).

3.6.3.1.3. CTX-M-típusú ESBL-k

A CTX-M-típusú kiterjedt spektrumú β -laktamázokat először Japánban azonosították 1986-ban és később – 1989-ben - Németországban CTX-M-1-típusú β -laktamázoknak nevezték el (Bauernfeind és mtsai 1990). A CTX-M-típusú enzimek 40%-nál kisebb homológiát mutatnak az SHV és a TEM-típusú enzimekkel és viszonylag heterogén családot alkotnak. Jelenleg ez a leggyorsabban terjedő β -laktamáz típus világszerte több, mint 90 képviselővel. (<http://www.lahey.org/>). A CTX-M-típusú enzimek elterjedése az utóbbi 10 évben pandémiás méreteket ért el, ma a leggyakrabban azonosított ESBL-k területi és kórházi mintákban egyaránt. (Canton és Coque 2006) (4. ábra).



4. ábra. Domináns és gyakori CTX-M β -laktamáz típusok különböző földrajzi régiókban

(Forrás: Hawkey és Jones 2006)

A szekvencia homológia alapján a CTX-M-típusú β -laktamázokat öt nagy csoportba sorolják: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 és CTX-M-25

(<http://www.lahey.org/studies/webt.stm>) (2. táblázat). Az egyes csoportok tagjai között legalább 94%-os hasonlóság van, míg a különböző csoportok tagjai között kevesebb, mint 90% (Bonnet 2004). A filogenetikai vizsgálatok alapján a CTX-M-1 csoport széles körben elterjedt enzimeket tartalmaz, mint pl. CTXM-1, CTX-M-3 és CTX-M-15, míg a CTX-M-2 csoportba kisebb elterjedésű enzimek tartoznak (CTX-M-2, CTX-M-4 és CTX-M-6). A szintén széles körben elterjedt CTX-M-9 csoport a CTX-M-9 és CTX-M-14 enzimeket tartalmazza (Canton és Coque 2006).

2. táblázat. Különböző CTX-M csoportok és *bla*_{CTX-M} gének eredete (Forrás: Canton és mtsai 2008)

	CTX-M csoport				
	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-25
Év (enzim, ország)^a	1989 (CTX-M-1, Németország)	1986 (FEC-1, Japán)	1996 (CTX-M-8, Brazília)	1994 (CTX-M-9, Spanyolország)	2000 (CTX-M-25, Kanada)
Enzimek	CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -22, -23, -29, -30, -32, -33, -28, -36, UOE-1	CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20, -31, -44 (korábban TOHO-1), FEC-1	CTX-M-8, CTX-M-40	CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -18, -19, -24, -27, -45 (korábban TOHO-2), -46, -47, -48, -49, -50,	CTX-M, -26, -25, -39, -41
Eredeti species	<i>K. ascorbata</i>	<i>K. ascorbata</i>	<i>K. georgiana</i>	<i>K. georgiana</i>	NM ^b

^a Az első izolálás, vagy leírás éve (elsőként leírt enzim és az ország, ahol izolálták); CTX-M-14 és CTX-M-18 azonos enzim; ^bNM: nem meghatározott.

A CTX-M-1 és a CTX-M-2 csoportokhoz tartozó enzimek feltehetően a *Kluyvera ascorbata* kromoszómális *bla*_{KLUA} génjéből erednek, míg más vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy a CTX-M-8 és a CTX-M-9 csoportok tagjai a *Kluyvera georgiana* kromoszómális *bla*_{KLUG} génjével állnak kapcsolatban (Olson és mtsai 2005, Rodriguez és mtsai 2004) (2. táblázat). A CTX-M enzimeket kódoló plazmidok általában nagyon könnyen átvihetők más gazdasejtekbe és ez a tulajdonságuk talán

magyarázattal szolgál a *bla*_{CTX-M}-hordozó plazmidok gyors terjedéséért világszerte (Baraniak és mtsai 2002).

Különböző inszerciós elemek (IS) játszanak szerepet a *bla*_{CTX-M} gének mobilizációjában. Leggyakrabban az *ISEcp1*-t mutattak ki a *bla*_{CTX-M} gének ORF-jétől 5' és 3' irányban, és feltételezik az IS elem erős promoter funkcióját is a mobilizált gén expressziójához (Lartigue és mtsai 2004). A feltételezés mellett szól Poirel és mtsai (2008) megfigyelése, akik megállapították, hogy *Kluyvera spp.* törzsekben a kromoszómális CTX-M alacsony szinten, míg a plazmidon kódolt gének magas szinten expresszálódnak.

A CTX-M típusú enzimek nagyobb aktivitást mutatnak cefotaximmal és ceftriaxonnal, mint ceftazidimmal szemben. Néhány pontmutáció azonban meg tudja emelni a ceftazidim iránti aktivitásukat. A CTX-M-15 és a CTX-M-32 egy Asp240Gly szubsztitúcióval különböznek a progenitor CTX-M-3 és a CTX-M-1 enzimektől, viszont sokkal nagyobb aktivitást mutatnak a ceftazidimmal szemben, mint progenitoraik (Cartelle és mtsai 2004, Poirel és mtsai 2002). A CTX-M-27 és a CTX-M-16, melyek ugyanazzal a mutációval különböznek a CTX-M-9-től és a CTX-M-14-től, szintén magasabb aktivitást mutatnak a ceftazidimmal szemben (Bonnet és mtsai 2001, Bonnet és mtsai 2003).

Döntően *K. pneumoniae* és *E. coli* törzsek segítségével, ma a CTX-M enzimek pándémiájáról beszélünk. Leggyakrabban CTX-M-15, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-2 és CTX-M-9 enzimeket azonosítanak (Hawkey és Jones 2009). Európában a CTX-M-15 a domináns típus, míg progenitor típusát - a CTX-M-3 típust - csak néhány kelet-európai országban azonosították. Érdekes módon Lengyelországban még mindig a CTX-M-3 a leggyakrabban izolált típus. A CTX-M-1 és CTX-M-32 kezdetben mediterrán országokban fordultak elő, de ma már egész Európában megtalálhatók. Meglepő, hogy Spanyolországban a CTX-M-9 csoport tagjai (CTX-M-9 és CTX-M-14) a domináns típusok (Canton és Coque 2006, Canton és mtsai 2008). Dél-Amerikában elsősorban a CTX-M-2, a CTX-M-9 és a CTX-M-15 (Bonnet 2004, Pallechi és mtsai 2007) típusokról számolnak be. Kínában készült felmérések a CTX-M-14 dominanciáját bizonyították, és ezt a típust más Távol-Kleleti országokban is leírták (4. ábra)(Chanawong és mtsai 2002, Hawkey 2008). Legújabb vizsgálatok szerint azonban CTX-M-15-termelő *E. coli* és *K. pneumoniae* törzsek okoztak járványokat Dél-Kínában,

ami a CTX-M-14 és CTX-M-3 típusok dominanciáját veszélyezteti (Liu és mtsai 2009). Indiából eddig csak CTX-M-15-ről számolnak be, és ma már feltételezik, hogy az enzim világméretű hódítása a sikeres uropatogén *E. coli* O25/ST131 segítségével indult útjára (Nicolas-Chanoine és mtsai 2008). A világ néhány országában a CTX-M még sporadikus elterjedésű, viszont Ázsiában, Európa és Dél-Amerika nagy részén endémiássá vált (Canton és Coque 2006). Sokáig úgy tűnt, hogy az Egyesült Államok mentes a CTX-M-típusú enzimektől. Egy 2007-ben végzett vizsgálatban azonban a CTX-M-15 és -14 típusokat a *K. pneumoniae* és *E. coli* izolátumok közel 40%-ában kimutatták és ezek az izolátumok a résztvevő kórházak 80%-ából származtak (Castanheira és mtsai 2008).

3.6.3.2. *K. pneumoniae* törzsekben azonosított egyéb jelentősebb β -laktamázok

3.6.3.2.1. KPC-típusú β -laktamázok

A KPC-típusú (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) β -laktamázok gyakorlatilag az összes β -laktám antibiotikumot képesek hidrolizálni, beleértve a karbapenemeket is (Grundmann és mtsai). Mivel a KPC-típusú karbapenemázt termelő *K. pneumoniae* törzsek a β -laktámok mellett több más antibiotikum csoporttal szemben is rezisztenciát mutatnak, ezeket a törzseket már nem MDR (multidrug resistant), hanem XDR (extensively drug resistant) fenotípusúnak nevezik. Souli és mtsai megfogalmazása szerint az XDR fenotípus olyan rezisztenciakép, amikor a baktériumtörzs egy vagy két antibiotikum osztály kivételével minden más egyébként hatékony antibiotikummal szemben rezisztenciát mutat (Souli és mtsai 2008). Döntően két típusa terjedt el, a KPC-2 és a KPC-3 (Grundmann és mtsai 2010).

KPC-termelő *K. pneumoniae* törzseket első alkalommal az USA-ban írták le 1996-ban (Yigit és mtsai 2001). Azóta is túlnyomórészt ebben a fajban azonosították, azonban mára már számos más *Enterobacteriaceae* speciesben és *Pseudomonas aeruginosa*-ban is kimutatták. Az utóbbi egy évtizedben a KPC-termelők aránya rohamosan nőtt a *K. pneumoniae* törzsek között, sőt ezek klonális megjelenését is leírták. Az egyik legelterjedtebb az ST258 szekvencia típusba tartozó KPC-termelő *K. pneumoniae* klón, melyet 2010 végéig Izraelben (Grundmann és mtsai 2010), USA-ban

(Kitchel és mtsai 2009), Norvégiában és Svédországban (Samuelsen és mtsai 2009) és Lengyelországban (Baraniak és mtsai 2009) írtak le.

3.6.3.2.2. AmpC-típusú β -laktamázok

Az AmpC-típusú β -laktamázok olyan Ambler-féle C molekuláris osztályba tartozó cefalosporinázok, melyek általában nem gátolhatók klavulánsavval. Főleg kromoszómálisan kódoltak, de előfordulnak plazmidon kódolt változatok is. (Bush és mtsai 1995, Livermore 2007, Jacoby 2009).

Az AmpC-típusú kromoszómálisan kódolt β -laktamázokat eddig 23 genusban írták le, de döntően az *Enterobacteriaceae* család tagjainál fordulnak elő. (Jacoby 2009).

Az *E. coli* és a *Shigella* spp. törzsek vad típusai nem-indukálható kromoszómálisan kódolt AmpC-típusú β -laktamázzal rendelkeznek. Ezzel szemben az *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp., *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* és *P. rettgeri* speciesek indukálható kromoszómálisan kódolt AmpC-típusú β -laktamázokat termelhetnek. *K. pneumoniae* törzsekben eddig nem írták le kromoszómálisan kódolt Amp-C β -laktamázokat (Jacoby 2009).

Plazmidon-kódolt AmpC-típusú β -laktamázokról először 1989-ben számoltak be. Jelenleg az aminosav szekvencia alapján hét enzimesaládot különböztetnek meg: eddig 43 CMY allélt, 7 FOX allélt, 4 ACC, LAT és MIR allélt, 3 ACT és MOX, illetve 2 DHA allélt írtak le. Egyes típusokat kromoszómálisan kódolt génként is azonosítottak, és a plazmidon kódolt változatok ezekből a fajokból származhatnak (pl. CMY-1 *Aeromonas hydrophila*-ból, vagy a MIR-1 *Enterobacter cloacae*-ból). A plazmidon kódolt AmpC enzimek általában konstitutívan termelődnek (ritkán indukálhatóak pl. ACT-1, DHA-1, DHA-2), és rezisztenciát biztosítanak penicillinekkal, széles-spektrumú cefalosporinokkal, cefamicinekkel, és változóan aztreonammal szemben, de a törzsek általában érzékenyek maradnak cefepimre és karbapenemekre (Jacoby 2009).

Ezek az enzimek gyakran fordulnak elő más rezisztencia génekkel együtt (aminoglikozidokkal, chloramphenicolal, kinolonokkal, sulfonamiddal, tetraciklinekkel, és trimethoprimmel szemben rezisztenciát biztosító génekkel, ill. számos más β -laktamázzal (pl. TEM-1, PSE-1, CTX-M-k, SHV-k, és VIM-1).

Hasonlóan a TEM és SHV-enzimekből kialakult ESBL-ekhez, az AmpC-enzimeknél is megjelentek olyan enzimvariánsok, melyeknél szélesedett a szubsztrát spektrum. Ezeknek a mutációknak a hatása általában a ceftazidim és a cefepim, illetve az aztreonam MIC értékét érintik, és magas szintű rezisztencia kialakulásához vezethetnek. Világszerte elterjedt enzimek, bár jóval kevésbé gyakoriak, mint az ESBL-k. A CMY-2 a legszélesebb földrajzi elterjedtségű plazmidon kódolt AmpC, és a nem-tifoid salmonella törzsekben a β -laktám rezisztencia egyik fontos okozója. Nem-salmonella törzsekben a CMY-típus mellett a DHA és FOX típusokat írták le leggyakrabban. (Jacoby 2009). Az utóbbi években plazmidon-kódolt, DHA-1-típusú AmpC-termelő *Klebsiella pneumoniae* izolátumok felbukkanását írták le több európai országban (Empel és mtsai 2010, Chudácková és mtsai 2010, Diestra és mtsai 2010, Cuzon és mtsai 2010a).

3.6.3.2.3. Metallo- β -laktamázok

A metallo- β -laktamázok (MBL-ek) az aminosav-homológián alapuló Ambler-féle „B” molekuláris osztályba tartoznak, és a 3-as csoportba sorolt enzimek a Bush-Jacoby-Medeiros-féle funkcionális osztályozás szerint. A metallo- β -laktamázok aktív centrumában kétértékű fémion található, leggyakrabban cinkion (Zn^{2+}). A szerin-típusú β -laktamázoknál szélesebb szubsztrát-spektrummal rendelkeznek (Walsh és mtsai, 2005).

A metallo- β -laktamázokat először kromoszómán kódolt génekként azonosítottak *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp., és *Stenotrophomonas maltophilia* környezeti törzsekben, amelyek ritkán okoznak súlyos fertőzéseket, vagy kórházi járványokat. A metallo- β -laktamáz gének mobilizációja azonban ma már jelentős egészségügyi problémát jelent. Általában integronokon helyezkednek el, más típusú antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát is kódoló génekkel együtt. Amennyiben ezek az integronok konjugatív plazmidokon, vagy transzpozonokhoz kapcsoltnak helyezkednek el, az MBL gének horizontális terjedése igen gyors lehet.

Eddig hat, mobilis genetikai elemeken is terjedő metallo- β -laktamáz családot írtak le: az IMP („active on imipenem”)-, a VIM (*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*)-,

a GIM (*German imipenemase*)-, a SIM (*Seoul imipenemase*)-, a SPM (*Sao Paolo metallo- β -lactamase*)- és a NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*) -típusú enzimeket (Queenan és Bush, 2007; Hawkey és Jones, 2009).

A Gram-negatív baktériumok körében a leggyakoribb szerzett MBL enzimek az IMP- és a VIM-típusúak. Korábban döntően *P. aeruginosa* és *A. baumannii* törzsekben azonosították, azóta viszont az *Enterobacteriaceae* család tagjai között széles körben terjedtek el (Pfeifer és mtsai, 2010).

Az IMP-típusú enzimet először 1988-ban írták le egy Japánban izolált *P. aeruginosa* törzsből, ahol a *bla_{IMP-1}*-gén konjugatív plazmidon helyezkedett el. Az enzim döntően a nem-fermentáló Gram-negatív pálcák körében terjed, de az *Enterobacteriaceae* család tagjai között is előfordul. *K. pneumoniae* törzsekben elvétve jelenik meg, és eddig egyetlen nozokomiális járványt írtak le, amit IMP-1-termelő törzs okozott Japánban (Fukigai és mtsai 2007). Brazíliában egy IMP-1-termelő *K. pneumoniae* törzset azonosítottak nozokomiális pneumóniában szenvedő betegnél (Lincopan és mtsai 2005), Ausztráliában pedig négy, különböző ribotípushoz tartozó IMP-4-termelő törzset (Peleg és mtsai 2005). Egy-egy IMP-termelő *K. pneumoniae* törzsről számoltak be Törökországból (Aktas és mtsai 2006) és Libanonból (Daoud és mtsai 2008). Minden vizsgálatban az IMP gének 1. osztályú integronon helyezkedtek el.

Elterjedtségével sokkal jelentősebb a MBL-k másik nagy családja, a VIM-enzimek. Ezeket is először *P. aeruginosa* törzsekben írták le: VIM-1-et 1997-ben Veronában, a VIM-2-t pedig 1996-ban Franciaországban. A VIM-2 típust ma már öt kontinens közel 40 országában írták le (Walsh 2008, Hawkey és Jones, 2009).

Az *Enterobacteriaceae* családban a VIM-1-, a VIM-2- és a VIM-4-típusú MBL enzimeket mutatják ki leggyakrabban (Walsh és mtsai 2005, Queenan és Bush 2007). VIM-1-termelő *K. pneumoniae* törzsek elsőként Görögországban jelentek meg 2001-ben, azóta számos nozokomiális járványt okoztak és endémiássá váltak az országban (Grundmann és mtsai 2010). VIM-4-termelő *K. pneumoniae* törzset először Olaszországban írtak le (Luzzaro és mtsai 2004).

Komoly riadalmat okozott a szakemberek körében egy nemrég felfedezett metallo- β -laktamáz enzim csoport, a New-Delhi metallo- β -laktamáz (NDM). Az enzimet Svédországban élő betegből izolált *K. pneumoniae* és *E. coli* törzsekben azonosították, aki előzőleg Indiában részesült kórházi kezelésben. A karbapenem rezisztenciáért

felelős *bla*_{NDM-1} gén konjugatív plazmidon, de nem integronon helyezkedett el. 2009-2010-ben már Európa több országában írták le: Ausztria, Belgium, Franciaország, Németország, Norvégia, Svédország és Hollandia (Grundmann és mtsai 2010). Az Egyesült Királyságban ma a NDM-1 a leggyakoribb metallo- β -laktamáz enzimtípus a karbapenemáz-termelő *Enterobacteriaceae* izolátumok között, és a *K. pneumoniae* izolátumoké a vezető szerep (Pfeifer 2010; Kumarasamy és mtsai, 2010). Az ECDC által végzett Európai surveillance eredményei alapján az NDM jelenléte néhány Balkáni országban nem kapcsolódik sem indiai vagy pakisztáni kórházi kezeléssel, sem odautazással (Struelens és mtsai 2010).

3.6.3.2.4. OXA β -laktamázok

Az OXA-típusú (oxacillin-hidrolizáló) β -laktamázok a D molekuláris osztályba tartoznak, és szerin csoportot tartalmaznak az aktív centrumukban. Döntően az aminos- és ureidopenicillinekkal szemben biztosítanak rezisztenciát. Nagyfokú hidrolitikus aktivitással bírnak a cloxacillinnel, az oxacillinnel és a methicillinnel szemben, az aktivitásukat gyengén gátolja a klavulánsav (Bush és mtsai 1995). Az oxacillináz gének többsége mobilis genetikai elemeken található (plazmidok, transzpozonok vagy integronok). Jelenleg a több mint 160 eddig leírt típusa közül csak 18 típus képes hatékonyan bontani a széles-spektrumú cefalosporinokat (Paterson és Bonomo 2005). A karbapenemeket is hidrolizáló OXA-típusú β -laktamázokat (Carbapenem-Hydrolyzing class D β -lactamases – CHDL) általában *Pseudomonas aeruginosa* és *Acinetobacter* spp. izolátumokban azonosítják. *K. pneumoniae* izolátumokban az OXA-48 a leggyakoribb CHDL típus. Először Törökországban izolálták (Poirel és mtsai 2004), ahol később egy isztambuli kórházban nozokomiális járványt okozott (Carrer és mtsai 2008). Azóta Tunéziában (Cuzon és mtsai 2010b), Belgiumban (Cuzon és mtsai 2008), Libanonban (Matar és mtsai 2010) és Franciaországban (Levast és mtsai 2011) izolálták OXA-48-termelő *K. pneumoniae* törzseket.

3.7. Az első hazai ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek vizsgálatai

ESBL-termelő *Enterobacteriaceae* izolátumok első hazai vizsgálatát 1996-ban végezték. Összesen 170 *K. pneumoniae* (114 Szegedről, 27 észak-, 10 észak-nyugat-, 8 nyugat-magyarországi régióból és 11 Budapestről származott), valamint 82 *E. cloacae* és 15 *S. marcescens* izolátumot gyűjtöttek össze és elemeztek. Ezek közül 15 *K. pneumoniae* (9 szegedi, 3 budapesti és 2 észak-magyarországi) és egy *S. marcescens* izolátum bizonyult SHV-típusú ESBL-termelőnek. Az ESBL-t kódoló gén alléltípusainak meghatározásához PCR-RFLP-SSCP módszert alkalmaztak, így 12 *K. pneumoniae* és a *S. marcescens* izolátum SHV-2, továbbá 3 *K. pneumoniae* SHV-5 termelőnek bizonyult. Egy beteg mintájából izoláltak egy SHV-2 termelő *S. marcescens* és egy SHV-2-pozitív *K. pneumoniae* izolátumot is, így a szerzők *in vivo* horizontális génátvitelt feltételeztek (Nagy és mtsai 1998, Prágai és mtsai 1998).

Szabó és mtsai 1999-ben számoltak be az első nozokomiális járványról, amelyet bizonyítottan ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzs okozott Magyarországon. A szolnoki Hetényi Géza Megyei Kórház PIC részlegén 1998. június 1. és november 30. között 15 betegről összesen 21 SHV-5-típusú ESBL-termelő *K. pneumoniae* és egy SHV-5 pozitív *S. marcescens* törzset izoláltak. A környezeti (n=143) és a dolgozói (n=22) szűrések során egy fürdető szappanból származó mintából tenyésztett ki SHV-5-termelő *K. pneumoniae* törzs. Az összes izolátum gentamicinnel szemben rezisztens volt, és érzékeny amikacinra és ciprofloxacinra. Ennél a vizsgálatnál is PCR-RFLP-SSCP módszert alkalmaztak az ESBL-típusok meghatározására. Egy kivételével a *K. pneumoniae* klinikai izolátumok, a környezeti mintából izolált *K. pneumoniae*, ill. a *S. marcescens* izolátum egy nagyon hasonló restrikciós mintázatot mutató, nagyméretű plazmidot hordoztak. Emellett a 15 *K. pneumoniae* törzs közül 14, valamint a környezeti szűrésből származó törzs klonális rokonságot mutatott AP-PCR módszerrel. Ez bizonyította a törzsek genetikai rokonságát, valamint a *S. marcescens* esetében a *bla_{SHV-2}* gén *in vivo* horizontális átadását (Szabó és mtsai 1999).

Tóth és mtsai az ESBL-NRL-be beküldött 2002. január és 2003. augusztusa között 25 hazai mikrobiológiai laboratóriumban izolált 252 ESBL-termelő *Enterobacteriaceae* izolátum vizsgálatát végezték el. A beküldött izolátumok túlnyomó többsége a

Klebsiella genusba tartozott (*K. pneumoniae* (65,9%), *K. oxytoca* (12,7%), továbbá *E. coli* (11,5%), *E. cloacae* (5,2%), *S. marcescens* (2,8%), *C. freundii* (1,2%), és 1-1 *Serratia liquefaciens* és *E. aerogenes*. Az izolátumok 92,1%-a SHV-típusú géneket hordozott. Ezek közül Budapestről és 14 megyéből (megyénként 1-3 törzs) származó 35 izolátumot tovább vizsgáltak: *K. pneumoniae* (n=21), *K. oxytoca* (n=6), *S. marcescens* (n=3), *E. coli* (n=3) és *E. cloacae* (n=2). Mind a 35 izolátum esetében az SHV gén típusát DNS-szekvenálással határozták meg. Két domináns ESBL-típust azonosítottak: 28 izolátumban a SHV-5 típust (16 *K. pneumoniae*, 6 *K. oxytoca*, 3 *S. marcescens*, 2 *E. coli*, 1 *E. cloacae*), 6 izolátumban pedig a SHV-2a típust (5 *K. pneumoniae*, 1 *E. coli*). Ezenkívül egy *E. cloacae* izolátum SHV-12-t kódoló gént hordozott. Az SHV-5- és az SHV-12-termelő izolátumok ceftazidimmal szemben magasabb szintű rezisztenciát mutattak, mint cefotaximmal szemben, az SHV-2a termelő izolátumoknál ez fordítva volt. Korongdiffúziós vizsgálat alapján minden izolátum érzékeny volt ciprofloxacinnra (Tóth és mtsai 2005).

4. Célkitűzések

Az Országos Epidemiológiai Központban 2002 óta működik az Enterális és nozokomiális baktériális patogének nemzeti tipizáló referencia laboratóriuma (BP-NTRL). A referencia laboratórium egyik legfontosabb feladata a területi és nozokomiális bakteriális járványok igazolása és kivizsgálása, a patogén törzsek terjedési útvonalának magállapítása, a fertőző forrás felkutatása, és különösen virulens törzsek azonosítása a molekuláris tipizálás segítségével.

A századfordulón Magyarországon ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek egyre több, súlyos nozokomiális járványt okoztak, főleg PIC-ban. A helyzet súlyossága indokolta a BP-NTRL-be 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 robbanásszerű országos terjedésének hátterében húzódó molekuláris-genetikai folyamatok feltérképezése. A több száz izolátum jellemzéséhez döntően teljes genom makrorestrikciós profilanalízist (PFGE) alkalmaztunk, kiegészítve plazmidprofil, fenotípusos rezisztencia mechanizmus meghatározással, továbbá antibiotikum rezisztencia és háztartási genek (MLST) szekvencia meghatározásával. Bízom abban, hogy az eredményeink hozzájárulhatnak a Magyarországon második legjelentősebb nozokomiális kórokozójává vált *K. pneumoniae* molekuláris epidemiológiájának és antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának alaposabb ismeretéhez, továbbá segítséget nyújthatnak az infektológus és kórházhigiénikus szakembereknek a súlyos hazai helyzet javításához.

Dolgozatom célkitűzései egyben az BP-NTRL-be végzett munkám célkitűzéseit is tartalmazzák:

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 országos előfordulásáról.
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.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Baktérium törzsek

A Fágtipizáló és molekuláris epidemiológiai osztályra 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 ESBL-NRL-ba. 2002-2010 között a 3. generációs cefalosporinokkal szembeni rezisztenciát mutató KP izolátumok megoszlása a következőképpen alakult: 85 db (2002), 197 db (2003), 183 db (2004), 281 db (2005), 102 db (2006), 129 db (2007), 257 db (2008), 145 db (2009) és 329 (2010).

Munkánkat nagyban segítik az izolátumokhoz mellékelt beküldőlapok, amelyek tartalmazzák a legfontosabb epidemiológiai adatokat (beteg adatai, mintatípus, izolálás helye, ideje, laboratóriumi vizsgálati eredmények). Ez később lehetővé teszi a molekuláris epidemiológiai vizsgálatok elvégzését.

SHV-termelő Klebsiella spp. járványtörzsek vizsgálata: 1998-ban, valamint 2002-2003. között 5 megyei, illetve oktató kórház PIC osztályán lezajlott járványokból izolált 126 ESBL-termelő *Klebsiella spp.* izolátumot küldtek be az FMEO és az ESBL-NRL-ba további vizsgálatra. A bejelentett járványok a következők voltak: *i*, PIC 1 (Fejér megye): 2002-ben egy elhúzódó járvány után (izolátumok n=35) egy évvel később egy újabb járvány ugyanazon az osztályon (n=26); *ii*, PIC 2 (Bács-Kiskun megye): két járvány négy év különbséggel (n=24 (1998), n=9 (2002)); *iii*, PIC 3 (Csongrád megye): 2002-ben két hónapig tartó járvány (n=12); *iv*, PIC 4 (Vas megye): *K. oxytoca* járvány (n=10); *v*, PIC 5 (Baranya megye): széklet hordozás halmozódása (n=8).

A vizsgált izolátumok 86 beteg klinikai mintáiból származtak: vér (n=17), felső légúti váladék (n=55), alsó légúti váladék (n=3), vizelet (n=18), szemváladék (n=1), fülváladék (n=1), széklet (n=18), sebváladék (n=1), katéter (n=1), köldök (n=1), endotracheális tubus (n=12).

CTX-M-termelő K. pneumoniae törzsek vizsgálata: 2003-ban az FMEO és az ESBL-NRL-ba beküldött ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumok közül 17 igen ritka – XIA1 - fajtípusú volt, és addig nem tapasztalt magas szintű ciprofloxacinnal szembeni rezisztenciát, valamint ceftazidimmal szemben magasabb szintű cefotaxim rezisztenciát mutatott. Az izolátumok öt megye nyolc különböző kórházának felnőtt beteg ellátó osztályairól (sebészet, urológia, belgyógyászat, nefrológia) származtak, melyeket elsősorban műtéti sebváladékokból (10/17) és vizeletből (3/17) izolálták. Ezek a törzsek bizonyultak az első CTX-M-típusú β -laktamáz termelő izolátumok Magyarországon.

A 2004-ben beküldött izolátumok között csak 4 volt CTX-M-termelő. Azonban a 2005-ben beérkezett 281 ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátum közül már 196 volt CTX-M-termelő és magas szinten ciprofloxacinnal szemben rezisztens. Ezek az izolátumok 13 megye 35 kórházából érkeztek be az ESBL-NRL-be, és hat járványból (n=137) valamint sporadikus esetekből származtak. Elsősorban intenzív terápiás (n=82), belgyógyászati (n=34), traumatológiai (n=18), sebészeti (n=18) és urológiai (n=18) osztályokról izolálták. Az izolátumok 36%-a vizeletből, 18%-a vérből, 15%-a sebből és 9%-a alsólégúti váladékból származott.

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 között volt 27 olyan törzs, mely csökkent érzékenységet mutatott fluorokinolonokkal szemben (CLSI (2009) breakpointok: $E \leq 1$ mg/L; $R \geq 4$ mg/L). A 27, ciprofloxacinnal szemben emelkedett minimális inhibitor koncentráció (MIC) értéket mutató törzseket 5 egészségügyi intézményben izolálták a következő megoszlásban: i, 10 törzs felnőtt ápolási osztályokról (ebből 5 invazív minta egy nosocomiális járványból); ii, 17 törzs csecsemő osztályokról (ebből 12 invazív minta két nosocomiális járványból különböző PIC-ban).

KPC-termelő K. pneumoniae izolátumok vizsgálata: 2008. október és 2009. április között kilenc, karbapenemekkel szemben nem-érzékeny *K. pneumoniae* izolátumot küldtek be az Országos Epidemiológiai Központba a rezisztencia mechanizmus meghatározására és molekuláris tipizálásra. A kilenc törzs hét betegről származott a

következő megoszlásban: seb (n=2), alsólégúti váladék (n=2), felső légúti váladék (n=2), széklet (n=2) és centrális véna kanül (n=1).

*Metallo- β -laktamáz-termelő *K. pneumoniae* törzs vizsgálata:* 2009 februárjában egy Budapesti kórházban ápolat páciens broncho-alveoláris lavage mintájából a KP3686 *K. pneumoniae* izolátumot azonosították, melyet az előzetes fenotípusos vizsgálatok alapján metallo- β -laktamáz-termelés gyanújával küldtek be további vizsgálatra.

*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 összesen 116 ilyen izolátumot küldtek be további vizsgálatra, mely 86 betegről származott. Az izolátumok döntően székletből (n=32), vizeletből (n=30) és felsőlégúti váladékból (n=25) származtak, továbbá alsólégúti mintából (n=11), sebváladékból (n=8), hemokultúrából (n=4), kanül és katétervégéből (n=3), hasúri váladékból (n=2) és drainből (n=1) is izolálták.

5.2. Baktériumtörzsek fenotípusos vizsgálata

5.2.1. Törzsek identifikálása

A törzsek identifikálását különböző félautomata identifikáló rendszerekkel végeztük: API20E, ATB ID32E (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Franciaország), Micronaut E (Genzyme Virotech GmbH, Ruesselsheim, Németország).

5.2.2. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok

5.2.2.1. Korongdiffúziós vizsgálatok

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok egy részét korongdiffúziós módszerrel végeztük a CLSI ajánlása alapján. A vizsgálandó törzsek 0,5 McFarland-os ($\sim 1,5 \times 10^8$ CFU/ml) szuszpenziójából steril vattapálca segítségével egyenletes pázsitot kentünk Mueller-Hinton agarra (OEK, Táptalajkészítő Egység), majd felhelyeztük az antibiotikum tartalmú korongokat. A lemezeket 37°C-os, normál atmoszférájú termosztátban inkubáltuk egy éjszakán keresztül, majd lemértük a gátlási zónák átmérőjét.

Az ESBL-termelés megerősítésére a kombinált korong módszer elvén alapuló ESBL SET (MAST Diagnostics, Reinfeld, Németország) kereskedelmi tesztet alkalmaztunk. A vizsgálat során ceftazidim (30 μ g) – ceftazidim (30 μ g)/ klavulánsav (10 μ g); cefotaxim (30 μ g) – cefotaxim (30 μ g)/ klavulánsav (10 μ g) és cefpodoxim (30 μ g) – cefpodoxim (30 μ g)/ klavulánsav (10 μ g) tartalmú korongokat használtunk. Bármely klavulánsav tartalmú koronggal mért gátlási zóna átmérő ≥ 5 mm-el nagyobb, mint a klavulánsav mentes cfalosporin esetében, akkor a teszt eredménye pozitív.

A felételezett karbapenemáz termelés fenotípusos kimutatására módosított Hodge-tesztet alkalmaztunk. Ennek során az indikátortörzs (ATCC 25922 *E. coli*) 0,5 McFarlandos szuszpenziójából vattapálcával egyenletes pázsitot kentünk Mueller-Hinton agarra. A lemezre 10 μ g karbapenem tartalmú (ertapenem, meropenem, imipenem) korongot helyeztünk egymástól ~ 3 -3 cm-es távolságban. A korongokra 4,5 μ l ZnSO₄ oldatot mértünk. A cinkion a metallo- β -laktamáz enzim működéséhez szükséges kofaktor, amely elősegíti az enzimtermelés kimutatását. (Lee és mtsai, 2003).

Ezután a vizsgálandó izolátumokat egy csíkban végighúztuk a korong irányából a Petri-csésze széle felé haladva az agar felületén. Egy éjszakát inkubáltuk 37°C-on, normál atmoszférán a kiértékelés előtt. Karbapenemáz termelés esetében az ATCC 25922 *E. coli* törzs benövése látható a gátlási zónába a tesztizolátum mentén.

A különböző β -laktamáz típusok elkülönítésére további β -laktamáz gátlószerekkel kiegészített kombinált korong módszereket alkalmaztunk karbapenem (imipenem, meropenem és ertapenem) tartalmú korongok felhasználásával. A KPC-termelés kimutatásához 3-aminofenil-boronsavat (300 μ g), a MBL-termelés vizsgálatához EDTA-t (750 μ g) és dipikolinsavat (835 μ g) alkalmaztunk, az AmpC-enzim aktivitását pedig cloxacillinnel (750 μ g) gátoltuk (Yong és mtsai 2002, Anderson és mtsai 2007, Shin és mtsai 2008). A kiértékelés során hasonlóan jártunk el, mint az ESBL-termelés vizsgálatánál.

5.2.2.2. Minimális inhibitor koncentráció (MIC) meghatározása

A *K. pneumoniae* L klón izolátumainak vizsgálatánál a CLSI ajánlása szerint végzett agarhígítós módszerrel határoztuk meg az izolátumok ceftazidim, cefotaxim, ciprofloxacín, gentamicin és amikacin MIC értékeit.

A további vizsgálatokban kiválasztott törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálatánál a MIC értékek meghatározását E-teszt (AB Biodisk, Solna, Svédország) módszerrel végeztük. A következő antibiotikumokat alkalmaztuk: ceftazidim (0.016–256 mg/L), cefotaxim (0.016–256 mg/L), cefepim (0.016–256 mg/L), gentamicin (0.016–256 mg/L), tobramycin, (0.016–256 mg/L), amikacin (0.016–256 mg/L), netilmicin (0.016–256 mg/L), ciprofloxacín (0.002–32 mg/L), tetraciklin (0.016–256 mg/L), trimetoprim/sulfamethoxazol (0.002–32 mg/L), imipenem (0.002–32 mg/L), meropenem (0.002–32 mg/L), ertapenem (0.002–32 mg/L), tigecyclin (0.016–256 mg/L), colistin (0.016–256 mg/L) és cefoxitin (0.016–256 mg/L). Egyes vizsgálatoknál ennél kevesebb antibiotikum csoport MIC értékét határoztuk meg. ESBL-termelés megerősítéséhez ESBL E-teszt-t (cefotaxim, ceftazidim és cefepim tartalmú tesztcsíkok) is alkalmaztunk (AB Biodisk).

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatoknál az *E. coli* ATCC 25922, illetve az ESBL-termelő *K. pneumoniae* ATCC700603 törzset használtuk kontrollként.

Az izolátumok identifikálását és az antibiotikum rezisztencia vizsgálatokat az OEK Bakteriológia I. Osztályán végezték.

5.3. Molekuláris vizsgálatok

A leírt molekuláris epidemiológiai és genetikai vizsgálatokat általánosan használjuk az FMEO-ra és az ESBL-NRL-ba további vizsgálatokra beküldött törzsek esetében. A dolgozatban tárgyalt tanulmányoknál nem minden esetben használtuk az összes módszert.

5.3.1. Polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction – PCR)

Laboratóriumainkban a polimeráz láncreakció a különböző antibiotikum rezisztencia gének kimutatására és DNS szakaszok specifikus felszaporítására általánosan alkalmazott módszer.

A különböző antibiotikum rezisztencia gének kimutatására használt primerek listáját a 3. táblázat, az alkalmazott PCR hőprofilokat a 4. táblázat tartalmazza.

A bakteriális DNS feltárását a PCR vizsgálatokhoz alkalikus lízissel végeztük. A 16-18 órás tenyészet néhány telepét 25 µl 0,5M NaOH (Merck, Darmstadt, Németország) oldatban szuszpendáltunk és 15 perc szobahőmérsékletű inkubáció után hozzáadtunk 25 ml 1M Tris-HCl (pH 8,3) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Németország) oldatot, valamint 200 µl PCR tisztaságú vizet (GIBCO, Invitrogen, CA, USA). A mintát további felhasználásig -20°C-on tartottuk.

A PCR reakciók összetétele, 25µl végtérfogatra számolva, a következő volt: 12,5µl 2x koncentrációjú ThermoPrime Master Mix (1,5 mM Mg₂Cl) (Thermo Scientific, Epsom, Egyesült Királyság), 3 µl DNS minta, 0,5 µM végkoncentrációjú primerek (IDT Inc., Coralville, USA) (3. táblázat szerint). Kivéve a metallo-β-laktamáz gének kimutatására használt és a plazmidon-kódolt AmpC-típusú gének kimutatására használt multiplex PCR-eket.

A metallo-β-laktamáz gének kimutatására használt PCR reakció összetétele 25 µl végtérfogatra számolva: 12,5µl 2x koncentrációjú ThermoPrime Master Mix (1,5

mM Mg₂Cl) (Thermo Scientific), 5 µl DNS minta, 0,5 µM végkoncentrációjú VIM, GIM, SIM és SPM primerek, valamint 1 µM végkoncentrációjú IMP primerek (IDT Inc.) (Ellington és mtsai 2007).

A plazmidon-kódolt gének kimutatására használt PCR reakció összetétele 25 µl végtérfogatra számolva: 12,5µl 2x koncentrációjú ThermoPrime Master Mix (1,5 mM Mg₂Cl) (Thermo Scientific), 5 µl DNS minta, 0,6 µM végkoncentrációjú MOX, CIT, DHA primerek, 0,5 µM ACC, EBC primerek, valamint 0,4 µM FOX primerek (Pérez-Pérez és Hanson 2002).

Minden PCR reakciónál alkalmaztunk negatív kontrollt (DNS feltárásához használt oldat baktérium nélkül), valamint a megfelelő pozitív kontrollokat (kontroll törzseket, illetve publikációban megjelent pozitív törzseket).

A PCR-t követően a termékeket 2% agaróz gélben (Agarose, Type II, Sigma) detektáltuk, és ethidium-bromiddal festettük. A gélelektroforézist 45 percig végeztük, az alábbi képlet alapján számított feszültségen: az anód és katód között mért távolság (cm) x 5 V/cm. Molekulasúly markerként 100 bp markert (Superladder-Low 100bp Ladder, Thermo Scientific), vagy 500 bp markert (Superladder-MID 500bp Ladder, Thermo Scientific) használtunk.

Az inszerciós elemek (IS26 és *ISEcp1*) elhelyezkedését „PCR-mapping” módszerrel vizsgáltuk, melynek során az IS elemekre specifikus primereket kombináltuk a β-laktamáz génekre tervezett primerekkel.

Az ESBL, AmpC, KPC géntípusok meghatározását, illetve a további antibiotikum rezisztencia gének PCR-val kapott termékeinek vizsgálatát DNS-szekvenálással végeztük el. Ehhez a legtöbb vizsgálatnál az amplifikáló primereket használtuk, a CTX-M és a KPC gének kivételével. Utóbbi kettőnél külön szekvenáló primereket alkalmaztunk (3. táblázat). Az MBL gének típusát az azokat hordozó I. osztályú integronok szekvenálásával határoztuk meg. A szekvenciák értékeléséhez a Chromas, a ClustalX és a BioEdit Sequence Alignment Editor freeware programokat használtuk, és BLAST program (<http://www.ncbi.nih.gov>) segítségével hasonlítottuk össze a GenBank adatbázisában található szekvenciákkal.

3. táblázat. A PCR vizsgálatokhoz használt primerpárok szekvenciái és referenciái

Célszekvencia	Funkció	Primer	Oligonukleotid szekvencia (5'-3') ^a	Referencia
<i>bla_{SHV}</i>	β-laktamáz	SHV-F	5'-CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC-3'	Bedenic és mtsai (2001)
		SHV-R	5'-TCTTTCCGATGCCGCCAGTCA-3'	
<i>bla_{TEM}</i>	β-laktamáz	TEM-F	5'-ATGAGTATCAACATTTCCGTG-3'	Vahaboglu és mtsai (2001)
		TEM-R	5'-TTACCAATGCTTAATCAGTGAG-3'	
<i>bla_{CTX-M}</i>	β-laktamáz	CTX-Mált-F	5'-TTTGGCATGTGCAGTACCAGTAA-3'	Edelstein és mtsai (2003)
		CTX-Mált-R	5'-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3'	
CTX-M-I csoport	β-laktamáz	CTX-M-I-F	5'-ATGGTAAAAAATCACTGCG-3'	Baraniak és mtsai (2002a)
		CTX-M-I-R	5'-CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG-3'	
CTX-M-II csoport	β-laktamáz	CTX-M-II-F	5'-ATGATGACTCAGAGCATTGCG-3'	Chmelnitsky és mtsai (2005)
		CTX-M-II-R	5'-TTATTGCATCAGAAACCGTG-3'	
KPC	β-laktamáz	KPC F	5'-ATGTCACTGTATCGCCGTCT-3'	Queenan és Bush, (2007)
		KPC R	5'-TTTTTCAGAGCCTTACTGCCC-3'	
KPC seq	β-laktamáz	KPC F	5'-TGTCACTGTATCGCCGTC-3'	Yigit és mtsai (2001)
		KPC R	5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3'	
IMP	β-laktamáz	Imp F	5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3'	Ellington és mtsai (2007)
		Imp R	5'-CCAAACYACTASGTTATCT-3'	
VIM	β-laktamáz	Vim F	5'-GATGGTGTGGTGGTGCATA-3'	Ellington és mtsai (2007)
		Vim R	5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'	
GIM	β-laktamáz	Gim F	5'-TCGACACACCTTGGTCTGAA-3'	Ellington és mtsai (2007)
		Gim R	5'-AACTTCCAACCTTTGCCATGC-3'	
SPM	β-laktamáz	Spm F	5'-AAAATCTGGGTACGCAAACG-3'	Ellington és mtsai (2007)
		Spm R	5'-ACATTATCCGCTGGAACAGG-3'	
SIM	β-laktamáz	Sim F	5'-TACAAGGGATTCGGCATCG-3'	Ellington és mtsai (2007)
		Sim R	5'-TAATGGCCTGTTCCCATGTG-3'	
MOX-1-2, CMY-1, CMY-8-11	β-laktamáz	MOX F	5'-GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT-3'	Pérez-Pérez és Hanson (2002)
		MOX R	5'-CACATTGACATAGGTGTGGTGC-3'	
LAT-1-4, CMY-2-7, BIL-1	β-laktamáz	CIT F	5'-TGGCCAGAAGTGCAGGCAAA-3'	Pérez-Pérez és Hanson (2002)
		CIT R	5'-TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC-3'	
DHA-1, DHA-2	β-laktamáz	DHA F	5'-AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT-3'	Pérez-Pérez és Hanson (2002)
		DHA R	5'-CCGTACGCATACTGGCTTTGC-3'	
ACC	β-laktamáz	ACC F	5'-AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA-3'	Pérez-Pérez és Hanson (2002)
		ACC R	5'-TTCGCCGCAATCATCCCTAGC-3'	
MIR-1, ACT-1	β-laktamáz	EBC F	5'-TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG-3'	Pérez-Pérez és Hanson (2002)
		EBC R	5'-CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT-3'	
I. osztályú integron	mobilis genetikai elem	5'CS	5'-GGCATCCAAGCAGCTTTGAC-3'	Daly és Fanning (2000)
		3'CS	5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'	
ISEcp1	inszerciós	ISEcp1 F	5'-GCAGTCTTTTCTGCTCC-3'	Karim és mtsai

	szekvencia	ISEcp1 R	5'-ATTTCGGCAGCACCGTTTGC-3'	(2001)
IS26	inszerciós szekvencia	IS26 F	5'-AGCGGTAAATCGTGGAGTGA-3'	Eckert és mtsai (2004)
Ma1	CTX-M reverse általános	Ma1	5'-ACYTTACTGGTRCTGCACAT-3'	Eckert és mtsai (2004)
<i>aac(6')-Ib</i>	aminoglikozid rezisztencia	aac(6')-Ib-F	5'-CATGACTGAGCATGACCTT-3'	Leflon-Guibout és mtsai (2004)
		aac(6')-Ib-R	5'-GAAGGGTTAGGCATCACT-3'	
<i>aac(3)-II</i>	aminoglikozid rezisztencia	aac(3)-II-F	5'-CAATAACGGAGGCAATTCG-3'	Leflon-Guibout és mtsai (2004)
		aac(3)-II-R	5'-GATTATCATTGTGCGACGG-3'	
OXA-1- like	β-laktamáz	OXA-1-like- F	5'-GGATAAAACCCCAAAGGAA-3'	Karisik és mtsai (2006)
		OXA-1-like- R	5'-TGCACCAGTTTTCCCATACA-3'	
<i>tet(A)</i>	tetraciklin rezisztencia	tet(A)-F	5'-GTAATTCTGAGCACTGTGCG-3'	Guardabassi és mtsai (2000)
		tet(A)-R	5'-CTGCCGTGGACAACATTGCTT-3'	
<i>tet(B)</i>	tetraciklin rezisztencia	tet(B)-F	5'-CTCAGTATTCCAAGCCTTTG-3'	Guardabassi és mtsai (2000)
		tet(B)-R	5'-CTAAGCACTTGTCTCCTGTT-3'	
<i>tet(C)</i>	tetraciklin rezisztencia	tet(C)-F	5'-TCTAACAATGCGCTCATCGT-3'	Guardabassi és mtsai (2000)
		tet(C)-R	5'-GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC-3'	
<i>qnrA</i>	kinolon rezisztencia	qnrA-F	5'-TCAGCAAGAGGATTCTCA-3'	Kehrenberg és mtsai (2006)
		qnrA-R	5'-GGCAGCACTATGACTCCCA-3'	
<i>qnrB</i>	kinolon rezisztencia	qnrB-F	5'-TCGGCTGTCAGTTCTATGATCG-3'	Kehrenberg és mtsai (2006)
		qnrB-R	5'-TCCATGAGCAACGATGCCT-3'	
<i>qnrS</i>	kinolon rezisztencia	qnrS-F	5'-TGATCTCACCTTCACCGCTTG-3'	Kehrenberg és mtsai (2006)
		qnrS-R	5'-GAATCAGTTCTTGCTGCCAGG-3'	
<i>gyrA</i>	topoizomeráz II	gyrA-F	5'-CGACCTTGCGAGAGAAAT-3'	Weigel és mtsai (1998)
		gyrA-R	5'-GTTCCATCAGCCCTTCAA-3'	
<i>parC</i>	topoizomeráz IV	parC-F	5'-AATGCCAGCGCCAAATTCAAAAAG-3'	Gruteke és mtsai (2003)
		parC-R	5'-CCCCAGTTTCCCTGACCATCC-3'	

^a Kevert bázisok kódjai: M=A+C, R=A+G, W=A+T, S=G+C, Y=C+T, V=A+G+C,
H=A+C+T, D=A+G+T, B=G+T+C, N=A+G+C+T, K=G+T

4. táblázat. A PCR reakciók paramétereit

Primerék	Kezdő denaturáció	Ciklusok száma	Denaturáció	Anneláció	Elongáció	Végső elongáció	Hűtés
SHV-F	95°C	28	95°C	65°C	72°C	72°C	4°C
SHV-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
TEM-F	95°C	28	95°C	50°C	72°C	72°C	4°C
TEM-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
CTX-Mált-F	95°C	28	95°C	65°C	72°C	72°C	4°C
CTX-Mált-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
CTX-M-I-F	95°C	28	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
CTX-M-I-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
CTX-M-II-F	95°C	28	95°C	60°C	72°C	72°C	4°C
CTX-M-II-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
KPC F	95°C	28	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
KPC R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
MBL multiplex PCR	95°C	33	95°C	52°C	72°C	72°C	4°C
	150 s		25	40 s	50 s	300 s	∞
AmpC multiplex PCR	95°C	25	95°C	64°C	72°C	72°C	4°C
	150 s		30 s	30	60	420 s	∞
5'CS	95°C	28	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
3'CS	150 s		60 s	60 s	420 s	600 s	∞
ISEcp1 F	95°C	28	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
ISEcp1 R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
aac-(6)-Ib-F	95°C	28	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
aac-(6)-Ib-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
aac(3)-II-F	95°C	28	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
aac(3)-II-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
OXA-1-like-F	95°C	28	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
OXA-1-like-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
tet(A)-F	95°C	28	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
tet(A)-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
tet(B)-F	95°C	28	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
tet(B)-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
tet(C)-F	95°C	28	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
tet(C)-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
qnrA-F	95°C	28	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
qnrA-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
qnrB-F	95°C	28	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
qnrB-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
qnrS-F	95°C	28	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
qnrS-R	150 s		30 s	30 s	90 s	300 s	∞
gyrA-F	95°C	30	95°C	55°C	72°C	72°C	4°C
gyrA-R	240 s		30 s	30 s	45 s	300 s	∞
parC-F	95°C	30	95°C	52°C	72°C	72°C	4°C
parC-R	180 s		30 s	60 s	60 s	480 s	∞

5.3.2. CTX-M-termelő *K. pneumoniae* törzsek kinolon rezisztenciát meghatározó régióinak (QRDR) vizsgálata

A CTX-M-termelő *K. pneumoniae* törzsek magas szintű ciprofloxacin rezisztenciáját a QRDR-k DNS-szekvenálásával vizsgáltuk. A *gyrA* és *parC* QRDR-ban bekövetkezett változásokat 10 kiválasztott izolátumnál határoztuk meg. A szekvenáláshoz a PCR-nél használt (3. táblázat) primereket alkalmaztuk (Weigel és mtsai 1998, Gruteke és mtsai 2003). Az aminosav változásokat okozó nukleotid szubsztitúciókat korábbi publikációk alapján azonosítottuk (Weigel és mtsai 1998, Gruteke és mtsai 2003).

5.3.3. *K. pneumoniae* törzsek makrorestrikciós profil meghatározása PFGE módszerrel

A *K. pneumoniae* törzsek genetikai rokonságát a nemzetközi „gold-standard” módszerrel, pulzálatott-mezejű gélelektroforézissel (PFGE) vizsgáltuk. A vizsgálatokhoz a CDC (Centers for Disease Control and Prevention) standardizált PFGE protokollját használtuk (<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/pulsenet/pulsenet.htm>), és a vizsgálatokat Chef-DR II rendszeren végeztük el (BioRad, Kalifornia, CA, USA). A gélképek értékelését Fingerprinting II Informatix Software (BioRad, Ventura, CA, USA) 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. Egy pulzotípusba (PT) tartozónak tekintettük azokat a makrorestrikciós mintázatokat, melyek legalább 85%-s hasonlóságot mutattak. Az egyes PT-kat a Tenover kritériumok alapján jelöltük betűkkel vagy betűkkel és számokkal (Tenover és mtsai 1995). Az azonos PT-ba való besorolás a törzsek genetikai rokonságát és valószínű klonális kapcsolatát jelenti.

A vizsgálat célja a makrorestrikciós fragmentumok számának és méretének meghatározása. A vizsgálat elve a baktériumok teljes kromoszóma állományának feldarabolása ritkán hasító enzimekkel (makrorestrikció), a keletkezett termékek

(makrorestrikciós fragmentumok) molekulásúly szerinti szétválasztása pulzáló mezejű gélelektroforézissel (PFGE), majd detektálásuk ethidium-bromiddal való jelölés után (UV fényben láthatóvá válik a jelölt DNS). A jelölt termékek száma és mérete egy mintázatot határoz meg (PFGE mintázat), amelyet vizuálisan és szoftver segítségével értékeltünk és tároltunk.

A módszer nem szabványos, validálását referencia anyagminták és molekulásúly standard alkalmazásával végeztük. A specificitás és a prediktív érték ebben az esetben nem értelmezhető kategóriák, mivel a vizsgált baktérium populációtól (biológiai minta diverzitásától), az előforduló PFGE mintázatok számától és gyakoriságától függően változó. A módszer érzékenysége $10^9 \pm 5 \times 10^8$ DNS molekula, reprodukálhatósága $95 \pm 1\%$, 30-680 kilobázis mérési tartományban.

A vizsgálandó minták aktuális sorozata mellett a teljes munkafolyamatot elvégeztük a kontroll törzsszel - *K. pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL: SHV-18 pozitív), valamint a molekulásúly marker törzsszel – *Salmonella* branderup H9812 (PulseNet általános standard).

DNS agaróz blokk (plug) készítés lépései. A vizsgálandó izolátumok nutrient 2 agar friss szélesztéséből indultunk ki. A DNS agaróz blokkokkal végig úgy dolgoztunk, hogy megóvjuk őket a töréstől, kiszáradástól, kontaminációtól, DNáz enzimek hatásától.

1 ml sejtszuszpendáló (100mM EDTA, 100mM Tris, Na-lauril szulfát, destillált víz) oldatba kacsnyi telepet jól felszuszpendáltunk. 500 µl-t 450 nm-en fotometráltunk, *K. pneumoniae* esetében az optimális optikai denzitás 450 nm-en mérve 1.2-1.5 között van. A másik 500 µl-t hígítottuk a megfelelő sejtsűrűsége, majd ebből 150 µl-t kivettünk. 1 %-os alacsony olvadás pontú agaróz gélt készítettünk sejtszuszpendáló oldat felhasználásával: 10 ml oldatot és 0,1 g SeaKem agarózt (Lonza, Rockland USA) összekevertünk, felolvasztottuk és 60 °C –os vízfürdőbe helyeztük a felolvadt gélt. A sejtszuszpenziót összekevertük 175 µl 1 %-os géllal, és zárt aljú öntőformába pipettáztuk (90-100 µl/cella). A plugokat 30 percig dermedni hagytuk +4 °C-on, utána hőálló csövekbe helyeztük át (a csövek már tartalmazzák a szétmért lízisoldatot, 0,5 ml/plug)

Az agaróz blokkokat lízis oldatban (50mM EDTA, 1% Na-laurylsarcosine, desztillált víz, 20mg/ml Proteináz K) inkubáltuk 55°C-on rázó vízfürdőben (50 rpm) 18 órán keresztül. A lízist követően 4x20-30 percenként mosogatjuk a plugokat tároló oldattal

(10mM Tris, 1mM EDTA, desztillált víz) szobahőmérsékleten. Az agaróz blokkokat +4°C-n tároljuk a tároló oldatban, 6-12 hónapig alkalmasak vizsgálatok elvégzésére.

Enzimatis hasítás restrikiós endonukleázzal (makrorestrikió). A DNS agaróz blokkokból 2 mm széles darabkát vágunk és a gyártó utasításának megfelelően, frissen elkészített Neb2 (New England BioLabs) enzim pufferbe (150-200 µl) helyeztük és 20-30 percig állni hagyjuk. A puffert ezután lecseréltük újabb 150-200 µl Neb2 enzim pufferre (mosás), majd újabb 20-30 perc inkubálás után enzimet és szükség szerint BSA-t (New England BioLabs) is tartalmazó 150 –200 µl enzim pufferre cseréltük. *Klebsiella spp.* esetén 50U *Xba*I restrikiós endonukléáz (New England BioLabs) hozzáadásával 37°C-on 18 órán keresztül folyik az emésztés rázó vízfürdőben (50rpm). (A fenti mennyiségek egy reakcióra értendők).

PFGE. Az elektroforézis puffer elkészítése: 4000 ml 0.5x TBE (Invitrogene) oldatot készítünk (200 ml 10xTBE + 3800ml steril desztillált víz).

A gél készítése: 100 ml 1%-os gélt készítünk (100 ml 0,5x TBE + 1 g agaróz). Olvasztás után a 60-70°C-ig visszahűtött agarózt fésűvel ellátott géltetrecbe öntjük. A dermedés után (30 perc) a fésűt eltávolítjuk, a gélt óvatosan kiemeljük.

A minták behelyezése a gélbe: behelyezzük a megemésztett agaróz darabokat az előkészített gél zsebeibe és PFGE kád gélrögzítő keretébe helyeztük. Az elektroforézis során a géleket 20 órán keresztül futtattuk 6 V/cm feszültségen, 2,16-54,17s közötti pulzációs időintervallummal.

A lefutott gélt 30 percig festettük 0,5 µg / ml ethidiumbromid (Invitrogene) koncentrációjú 1x TAE pufferrel (Merck), ezután ugyanígy 30 percig mostuk ethidiumbromid mentes pufferben. A termékek detektálását UV fényben, transzilluminátor segítségével a GelDoc 2000 (BioRad, Kalifornia, CA, USA) gél dokumentációs rendszerben végeztük és a gélképeket rögzítettük.

A vizsgálatok eredményeinek értékelését szemmel, illetve számítógépes programmal végeztük (Quantity One, BioRad, Fingerprinting II Informatix version 3.0), amely a molekulásúly értékeket 1% pontossággal méri meg. Amennyiben a kapott mintázatok nem több, mint 6 restrikiós termékben különböznek, a mintázatok azonos PFGE típushoz (pulzotípus) tartozónak tekintettük. Amennyiben a kapott mintázatok azonosak, vagy nem több mint 3 restrikiós termékben különböztek, azokat azonos

PFGE típushoz és altípushoz tartozónak tekintettük (Dijkshoorn és mtsai, 2001). Az egymástól 4-6 restrikciós termékben különböző mintázatokat azonos PFGE típusba, de különböző PFGE altípusba tartozónak tekintettük. *K. pneumoniae* törzseknél a mintázatokkal készített szoftveres dendrogram alapján legalább 85%-os hasonlóság esetén meghatározható a PFGE típus (Dijkshoorn és mtsai, 2001.). Az elterjedt (epidémiás) típusok (klónok) esetében előfordult, hogy a különböző járványokból, valamint sporadikus esetekből izolált törzsek PFGE mintázatai közötti különbség a 6 terméket meghaladta. Ilyen esetekben kiegészítő vizsgálatok eredményei, valamint a szemmel látható hasonlóság (PFGE mintázatok) alapján a törzset az adott epidémiás PFGE klónhoz tartozónak minősítettük.

5.3.4. *Klebsiella pneumoniae* izolátumok szekvencia típus meghatározása MLST módszerrel

A multi-lókuszos szekvencia tipizálás (MLST) során a *K. pneumoniae* 7 háztartási génjének specifikus szakaszát hasonlítják össze DNS-szekvenálással. A különböző allélvariánsok együttesen ún. szekvencia típusokat (ST) határoznak meg (5. táblázat). Az MLST vizsgálatot Diancourt és mtsai (2005) által kidolgozott séma alapján végeztük.

5. táblázat *Klebsiella pneumoniae* MLST-hez használt primerei

Gén	Funkció	Primer	Oligonukleotid szekvencia (5'-3') ^a	Referencia
<i>rpoB</i>	RNS polimeráz	rpoB-F	5'-GGCGAAATGGCWGAGAACCA-3'	Diancourt és mtsai (2005)
	B b-alegység	rpoB-R	5'-GAGTCTTCGAAGTTGTAACC-3'	
<i>gapA</i>	Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz	gapA-F	5'-TGAAATATGACTCCACTCACGG-3'	
		gapA-R	5'-CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT-3'	
<i>mdh</i>	Almasav-dehidrogenáz	mdh-F	5'-CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG-3'	
		mdh-R	5'-CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG-3'	
<i>phoE</i>	Foszforin E	phoE-F	5'-ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG-3'	
		phoE-R	5'-TGATCAGAACTGGTAGGTGAT-3'	
<i>tonB</i>	Periplazmatikus energia transzducer	tonB-1F	5'-CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT-3'	
		tonB-2R	5'-ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG-3'	
<i>pgi</i>	Foszfoglükóz-izomeráz	pgi-F	5'-GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC-3'	
		pgi-R	5'-CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT-3'	
<i>infB</i>	Transzláció iniciáló faktor 2	infB-F	5'-CTCGCTGCTGGACTATATTCG-3'	
		infB-R	5'-CGTTTCAGCTCAAGAACTTC-3'	

^a Kevert bázisok kódjai: M=A+C, R=A+G, W=A+T, S=G+C, Y=C+T, V=A+G+C, H=A+C+T, D=A+G+T, B=G+T+C, N=A+G+C+T, K=G+T

A makrorestrikciós profil vizsgálat kiválóan alkalmazható a baktérium izolátumok lokális epidemiológiai tipizálására, azonban térben és időben nem-összefüggő izolátumok összehasonlítása ezzel a módszerrel csak nagy, többszáz mintázatot tartalmazó adatbázisok segítségével végezhető el megbízhatóan. Ezzel ellentétben, az MLST módszer, mely a háztartási gének genetikai változatosságán alapul, jól alkalmazható időben és térben hosszabb távot felölelő epidemiológiai összehasonlító és populáció-genetikai vizsgálatok elvégzésére (Maiden és mtsai 1998).

5.3.5. Plazmid profil analízis, konjugációs és elektroporációs kísérletek

A plazmid DNS kivonását és a vertikális gélelektroforézist Kado és Liu módszerével végeztük el (Kado és Liu 1981). Molekulasúly markerként az *E. coli* 517 törzset használtuk (Macrina és mtsai 1978).

A β -laktamáz gének átvihetőségét recipiens törzsbe konjugációs kísérletekkel vizsgáltuk. A vizsgálat során 4 ml táplevesben (OEK, Táptalajkészítő Egység) 0,5 McFarland sűrűségű szuszpenziót készítettünk az *E. coli* K12 J5-3^{Rif} törzsből. A donor izolátumból szintén 0,5 McFarland sűrűségű szuszpenziót készítettünk 2 mg/L cefotaxim vagy ceftazidim tartalmú táplevesben. 37°C-on rázatva inkubáltuk, amíg a szuszpenziók sűrűsége elérte a 3 McFarlandot. Centrifugáltuk 3000 rpm-en 5 percig a recipiens teljes térfogatát, a donor szuszpenzióból pedig 1 ml-t. Majd átmértük a recipiens pelletét a donor pelletéhez, és szuszpendáltuk. Felengedtük 1 ml táplevessel, és egy éjszakán át növesztettük 35-37 °C-on, ráztatás nélkül. A következő napon szelektív táptalajra (cefotaxim 4 mg/L és rifampicin 300 mg/L) szélesztettünk 50 μ l-t, és a kinőtt telepeket vizsgáltuk tovább. Azoknál a donor törzseknél, amelyek rezisztensebbek voltak ceftazidimmal szemben, mint cefotaximmal szemben, ceftazidimet is használtunk antibiotikumként, az előzőekkel megegyező arányokban.

Abban az esetben, ha egy vizsgált izolátumnál a konjugációs kísérletek negatív eredménnyel zárultak, elektroporációval próbáltuk DH5- α *E. coli* recipiens törzsbe átvinni az ESBL-gént kódoló mobilis genetikai elemet. Az elektroporációt Gene Pulser Xcell elektroporátor rendszerrel (BioRad) végeztük. A recipiens sejtek előkészítését és a vizsgálatot a Gene Pusler Xcell *E. coli*-ra vonatkozó ajánlása szerint végeztük. Az elektroporánsokat cefotaxim 2 mg/L vagy ceftazidim 2 mg/L tartalmú táptalajon növesztettük.

Sikeres konjugáció vagy elektroporáció esetén vizsgálatonként 10-10 telepből plazmid profil analízist végeztük Kado és Liu módszerével. Azokat a transzkonjugánsokat (TK)/ elektroporánsokat (EP) vizsgáltuk tovább, melyekbe egyetlen plazmid került át. A TK/EP törzsekből QIAprep Spin Miniprep Kit-tel (Qiagen, Hilden, Németország) nyertük ki a plazmid DNS-t. Ezután plazmid-RFLP vizsgálatot végeztünk: *Pst*I (New England BioLabs) enzimes emésztés után 0,7%-s agaróz gélben (SIGMA) futtattuk 5V/cm feszültségen 90 percig. A plazmid-RFLP során kapott restrikciós mintázatokat szemmel értékeltük ki, és hasonlítottuk össze.

6. Eredmények

6.1. 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 (5. ábra) 126 törzs fenotípusos és molekuláris vizsgálatait végeztük el (6. táblázat).

A PCR-RFLP vizsgálat alapján az összes törzs SHV-típusú ESBL-gént hordozott.

Minden izolátum rezisztens volt ceftazidimmal és cefotaximmal szemben, 74% netilmicinnel és 71% trimethoprim/sulfamethoxazollal szemben is rezisztens volt. Ciprofloxacin rezisztens izolátumot nem izoláltak a járványok során. Ki kell emelni, hogy akár ugyanabból a járványból származó izolátumok között is előfordultak eltérő antibiotikum rezisztencia mintázatok (6. táblázat).



5. ábra. ESBL-termelő *Klebsiella spp.* által okozott járványok Magyarországon, 1998-2003 (Az OEK-be bejelentett járványok). NICU=PIC

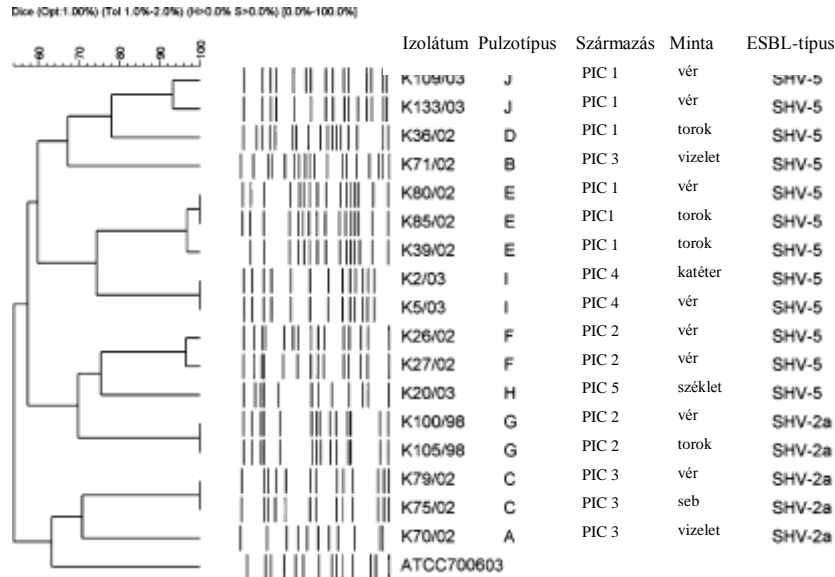
6. táblázat. SHV-termelő *Klebsiella spp.* okozta járványok helye és időtartama, az izolátumok plazmid profilja, antibiogramja és pulzotípusa

Faj/származás	Izolálás hónapja (járvány időtartama)	Plazmid profil (kb) (n)	Antibiogram ^b						Pulzo-típus
			CA	CT	FE	NE	SX	CI	
			Z	X	P	T	T	P	
<i>K. pneumoniae</i> , PIC 1 (Fejér megye)	2002. június-július	181, 94, 80 (9) ^{a2}	R	R	É	R	É	É	E
		203, 94 (2)	R	R	É	R	É	É	E
		181, 94 (3) ^{a2}	R	R	É	R	É	É	E
		181, 94, 50 (8)	R	R	É	R	É	É	D
		181, 94 (4) ^{a1}	R	R	É	R	É	É	D
		203, 94 (3)	R	R	É	R	É	É	D
		112 (1)	R	R	É	É	É	É	K
	2002. november	217, 58 (1)	R	R	R	R	R	É	L
		181, 94 (4) ^{a1}	R	R	É	R	É	É	E
		203, 94 (2)	R	R	É	R	É	É	E
		2003. július	94, 2,7 (26) ^{a3}	R	R	É	R	R	É
<i>K. pneumoniae</i> , PIC 2 (Bács-Kiskun megye)	2002. július	137, 94 (9) ^{a3}	R	R	É	R	R	É	F
	1998. szeptember	94, 2,2 (24) ^{a2}	R	R	É	É	R	É	G
<i>K. pneumoniae</i> , PIC 3 (Csongrád megye)	2002. november-december	162, 94 (3) ^{a2}	R	R	É	É	R	É	C
		203, 94 (1)	R	R	É	R	R	É	C1
		94, 50, 5.4, 4.3, 3.7, 2.3 (1)	R	R	É	R	R	É	B2
		116, 18 (2)	R	R	É	É	R	É	A
		228, 94, 5.5 (1)	R	R	É	R	R	É	B
		228, 94, 5.5, 5.2, 2.9 (2)	R	R	R	R	R	É	B
		94, 5.5 (1)	R	R	R	É	R	É	B1
		228, 130, 94, 94, 6.0 (10) ^{a1}	R	R	R	É	É	É	C2
<i>K. oxytoca</i> , PIC 4 (Vas megye)	2002. április	94, 6.0 (10) ^{a1}	R	R	É	R	R	É	I
<i>K. pneumoniae</i> , PIC 5 (Baranya megye)	2002. július	170, 94 (1)	R	R	É	R	R	É	H
		94 (7)	R	R	É	R	R	É	

CAZ, ceftazidim; CTX, cefotaxim; FEP, cefepim; NET, netilmicin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazol; CIP, ciprofloxacín.
^{a1,2,3} Hemokultúrából származó törzsek száma

^b Antibiogram: Korongdiffúziós vizsgálat eredménye (É, érzékeny; R, rezisztens)

A PFGE vizsgálat alapján a 126 izolátum 12 különböző PT-ba tartozott (6. táblázat, 6. ábra). A makrorestrikciós profilokból készült dendrogram igazolta, hogy az 5 különböző kórház PIC osztályán a hét járványt 10 különböző genetikai klón okozta.

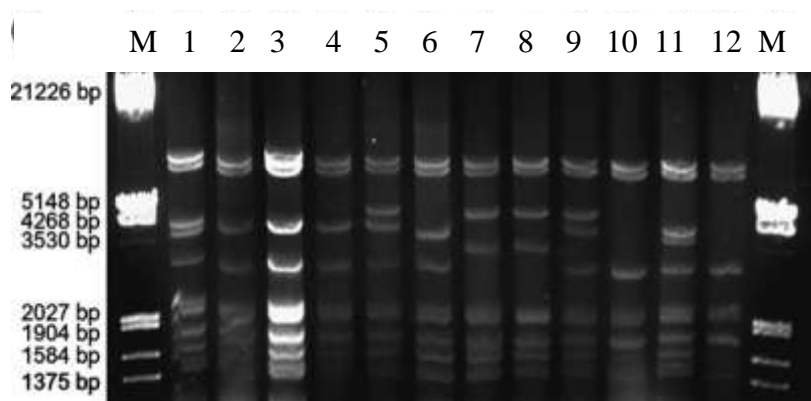


6. ábra. ESBL-termelő *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* izolátumok makrorestrikciós profiljának klaszter analízise

A rezisztencia genetikai hátterének vizsgálatához 13 izolátumot választottunk ki a faj, az antibiogram, a pulzotípus, a plazmid tartalom, az izolálás éve és a kórházi osztály figyelembevételével.

Nyolc *K. pneumoniae* és 2 *K. oxytoca* izolátum SHV-5 gént hordozott, három *K. pneumoniae* izolátum SHV-2a-t hordozott, és mindegyik izolátum esetében a gén átvihető volt konjugációval a recipiens törzsbe. Mindegyik SHV géntől 5' irányban IS26 inszerciós elemet mutattunk ki PCR módszerrel. A TK-k cefalosporin és aminoglikozid MIC értékei legalább 5 hígítási fokkal a recipiens törzs MIC értékei felett voltak (7. táblázat). 10 *K. pneumoniae* és 2 *K. oxytoca* donor törzsből egy kb. 90 kb nagyságú plazmid jutott át a TK-okba, egyetlen *K. pneumoniae* törzsnél (K70/02) az átjutott plazmid mérete kb. 120 kb volt. Utóbbi törzs TK-ából a *bla_{SHV}* gén mellett *bla_{TEM-1}* gént is kimutattunk. A plazmid RFLP vizsgálatot *Pst*I enzimmal végeztük el. Nagyon hasonló vagy azonos emésztési mintázat volt látható az összes *bla_{SHV-5}* gént

hordozó plazmidnál. Továbbá két *bla*_{SHV-2a} gént hordozó plazmid is (TK105/98, PIC2, 1998; TK75/02, PIC3, 2002) teljesen azonos emésztési mintázatot mutatott egymással (7. ábra).



7. ábra Transzkonjugánsokból izolált plazmidok *Pst*I emésztési mintázata.

M, molekulásúly marker; Futtatási sorrend: **1.** TK36/02 (D PT, SHV-5, PIC 1); **2.** TK39/02 (E PT, SHV-5, PIC 1) **3.** TK85/02 (E PT, SHV-5, PIC 1) **4.** TK109/03 (J PT, SHV-5, PIC 1) **5.** TK26/02 (F PT, SHV-5, PIC 2) **6.** TK71/02 (B PT, SHV-5, PIC 3) **7.** TK2/03 (I PT, SHV-5, PIC 4) **8.** TK5/03 (I PT, SHV-5, PIC 4) **9.** TK20/03 (H PT, SHV-5, PIC 5) **10.** TC105/98 (G PT, SHV-2a, PIC 2) **11.** TC70/02 (A PT, SHV-2a, PIC 3) **12.** TC75/02 (C PT, SHV-2a, PIC 3)

7. táblázat. Reprezentatív ESBL-termelő *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* izolátumok és azok transzkonjugánsainak jellemzői

Törzs száma/ Izolálás éve	Szármaszás/Minta ^a	Plazmid profil (kb)	Pulzotípus	SHV-típus	MIC (mg/L)												
					CAZ	CTX	CRO	FEP	FOX	IMP	AMC	GEN	TOB	NET	AMK	CIP	
K36/02	I/T	181, 94, 50	D	SHV-5	96	8	8	1	3	0.125	4	4	12	32	16	0.023	
TK36/02		94	—		3	0.38	0.5	0.047	NM	NM	2	0.5	2	4	1	0.006	
K39/02	I/T	181, 94, 80	E	SHV-5	96	16	12	2	4	0.25	4	4	12	64	32	0.064	
TK39/02		94	—		3	0.25	0.5	0.047	NM	NM	1.5	0.5	2	4	1	0.006	
K41/02	I/T	181, 94, 80	E	SHV-5	128	12	12	1.5	3	0.19	4	4	12	32	16	0.023	
TK41/02		94	—		3	0.25	0.38	0.047	NM	NM	2	0.5	2	4	1	0.006	
K85/02	I/T	181, 94	E1	SHV-5	192	8	8	1	3	0.25	6	3	12	32	12	0.032	
TK85/02		94	—		4	1.5	1.5	0.125	NM	NM	1.5	0.75	2	4	2	0.004	
K109/03	I/HK	94, 2.7	J	SHV-5	128	16	24	2	32	0.19	8	3	12	48	8	0.125	
TK109/03		94	—		3	0.38	0.25	0.064	3	NM	1.5	0.5	2	3	1	0.006	
K26/02	II/HK	137, 94	F	SHV-5	128	24	12	2	3	0.19	4	4	16	48	16	0.047	
TK26/02		94	—		8	0.5	0.38	0.047	NM	NM	2	0.38	2	2	0.75	0.006	
K105/98	II/T	94	G	SHV-2a	8	8	8	2	8	0.25	12	48	8	8	1.5	0.064	
TK105/98		94	—		0.5	1.5	1.5	0.25	1.5	NM	3	6	2	2	0.25	NM	
K70/02	III/V	116, 18	A	SHV-2a	6	6	6	1.5	2	0.25	8	4	4	0.5	1.5	0.032	
TK70/02		116	—		0.38	0.5	0.5	0.094	NM	NM	3	0.75	1	0.047	1	0.006	
K71/02	III/V	228, 94, 5.5, 5.2, 2.9	B	SHV-5	256	4	12	0.75	3	0.125	3	2	6	24	6	0.064	
TK71/02		94	—		3	0.25	0.25	0.047	NM	NM	1.5	0.38	2	4	1	0.006	
K75/02	III/S	162, 94	C	SHV-2a	4	4	8	1	2	0.19	16	32	6	8	15	0.023	
TK75/02		94	—		0.5	0.75	0.5	0.125	NM	NM	6	3	1	1.5	0.25	0.006	
K20/03	V/Sz	170, 94	H	SHV-5	128	16	8	2	3	0.19	3	4	16	64	24	0.047	
TK20/03		94	—		6	0.5	0.75	0.047	NM	NM	2	0.5	2	3	1	0.006	
K2/03	IV/K	94, 6.0	I	SHV-5	256	32	24	1.5	2	0.25	2	3	4	12	4	0.016	
TK2/03		94	—		3	0.5	0.5	0.047	NM	NM	2	0.25	1.5	1.5	0.5	0.006	
K5/03	IV/V	94, 6.0	I	SHV-5	96	24	24	1	3	0.25	3	6	12	64	16	0.016	
TK5/03		94	—		4	0.38	0.25	0.047	NM	NM	2	0.5	2	4	1	0.006	
J-5-3		—	—	—	0.09	0.03	0.02	0.023	1.5	0.09	1.5	0.06	0.13	0.047	0.09	0.006	
ATCC 700603			—	SHV-18	32	4	8	1	32	0.19	4	6	4	0.75	2	NM	

MIC, minimális inhibitor koncentráció; CAZ, ceftazidim; CTX, cefotaxim; CRO, ceftriaxon; FEP, cefepim; FOX, cefoxitin; IMP, imipenem; AMC, amoxicillin/klavulánsav; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; NET, netilmicin; AMK, amikacin; CIP, ciprofloxacin; NM, Nem vizsgált.

^a Szármaszás: I = PIC 1; II = PIC 2; III = PIC 3; IV = PIC 4; V = PIC 5. Minta: T = torok; HK = hemokultúra; V = vizelet; S = seb; Sz = széklet; K = katéter.

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

Az első magas szinten ciprofloxacinnal rezisztens, ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumokat 2003-ban küldték be az ESBL-NRL-be megerősítő vizsgálatra. Az összesen 17 izolátum mindegyike *bla*_{CTX-M-15} ESBL-gént hordozott. Az antibiotikum rezisztencia alapján a törzsek magas szintű cefotaxim, tetraciklin, ciprofloxacinnal és egy kivétellel (K16/03) gentamicinnal rezisztenciát mutattak. Mérsékelt szintű rezisztenciát mutattak ceftazidimmal, amoxicillin/klavulánsavval és cefepimmal szemben (8. táblázat). A TK-okba egy nagyméretű, kb. 140 kb nagyságú plazmid jutott át, mely hordozta a CTX-M-15 kódoló gént, valamint a gentamicinnal érzékeny törzs kivételével az *aac(3)-IIa* aminoglikozid rezisztencia gént is. *PstI* enzimmal végzett plazmid RFLP nagyon hasonló mintázatot adott mindegyik plazmidnál. Az *ISEcpI* inszerciós elem meglétét PCR mapping módszerrel vizsgáltuk, és mindegyik TK-nál negatív eredményt kaptunk.

A 17 izolátum 5 megyében és Budapesten levő 8 egészségügyi intézményből származott, de a közös jellemzők (antibiogram, hasonló osztály, azonos klinikai minta, CTX-M-15 hordozás) arra utaltak, hogy összefüggés lehet az egyes izolátumok között. Az izolátumok makrorestrikciós profil vizsgálata igazolta a 17 izolátum közötti klonális kapcsolatot (89%-os hasonlósági szint). Az izolátumokat az N PT-ba soroltuk és a Magyar Epidémiás Klón elnevezést ajánlottuk (HEC-Hungarian Epidemic Clone). A HEC-hez tartozó izolátumok mintázatai egyértelműen különböztek a korábban leírt SHV-típusú ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumokétól.

8.táblázat CTX-M-15-termelő *K. pneumoniae* (K) izolátumok és a transzkonjugánsok (TK) jellemzői

Izolátum	Kórház elhelyezkedése	Izolálás dátuma	Kórházi osztály ^b	Minta	Pulzotípus	MIC (mg/L) ^a									
						CTX	CAZ	AMC	FEP	FOX	IMP	GEN	AMK	TET	CIP
K34/03	Pest megye	2003.01.06	ITO	Hasúri váladék	N1	256	64	48	32	4	0.25	128	8	256	32
TK34/03						256	1.5	16	1	2	0.125	6	0.75	64	0.016
K46/03	Pest megye	2003.02.10	Sebészeti	Seb	N1										
K54/03	Pest megye	2003.02.11	Sebészeti	Seb	N1	256	96	256	32	16	0.19	32	3	256	32
TK54/03						24	3	3	2	1.5	0.125	3	1	64	0.032
K55/03	Pest megye	2003.02.28	Sebészeti	Seb	N1										
K83/03	Pest megye	2003.03.31	Sebészeti	Seb	N1										
K85/03	Nógrád megye	2003.03.31	Sebészeti	Seb	N1										
K86/03	Nógrád megye	2003.04.08	ITO	Hasúri váladék	N1	256	64	48	32	4	0.25	128	8	256	32
TK86/03						256	2	32	0.5	1	0.125	4	0.5	96	0.016
K168/03	Nógrád megye	2003.06.10	Sebészeti	Seb	N1										
K171/03	Budapest I	2003.06.11	Urológia	Vizelet	N2	256	96	48	32	8	0.19	24	2	256	32
TK171/03						16	3	8	2	1.5	0.125	4	1	96	0.023
K153/03	Budapest I	2003.06.11	Traumatológia	Orrváladék	N2										
K154/03	Budapest I	2003.06.12	Nefrológia	Vizelet	N2	256	96	96	32	16	0.19	32	3	256	32
TK154/03						24	3	3	2	1.5	0.125	3	0.75	64	0.032
K158/03	Budapest II	2003.06.16	Sebészeti	Seb	N2	256	48	48	32	32	0.25	128	6	156	32
TK158/03						256	3	32	1.5	1.5	0.125	4	0.5	96	0.023
K233/03	Tolna megye I	2003.06.16	Belgyógyászat	Vizelet	N1	256	64	48	32	16	0.19	96	6	156	32
TK233/03						128	4	24	2	0.75	0.125	4	0.75	96	0.016
K152/03	Pest megye	2003.07.16	Sebészeti	Seb	N1										
K150/03	Budapest III	2003.07.16	Belgyógyászat	Vér	N1	256	48	16	32	4	0.25	48	3	256	24
TK150/03						256	4	3	1	1	0.125	4	0.25	96	0.006
K165/03	Baranya megye	2003.09.16	Sebészeti	Seb	N1	256	64	24	24		0.25	0.5	3	156	32
TK165/03						256	4	6	0.75	0.75	0.125	0.125	1	96	0.016
K262/03	Tolna megye II	2003.10.03	Sebészeti	Seb	N1	256	64	48	32	16	0.19	96	8	156	32
TK262/03						256	2	24	6	1.5	0.125	6	0.5	64	0.023
J 5-3						0.03	0.09	1.5	0.023	1.5	0.09	0.06	0.19	NM	0.006
ATCC 700603						4	32	2	1	32	0.19	6	2	NM	NM

^aCTX: cefotaxim, CAZ: ceftazidim, AMC: amoxicillin/klavulánsav, FEP: cefepim, FOX: ceftoxitin, IMP: imipenem, GEN: gentamicin, AMK: amikacin, TET: Tetraciklin, CIP: ciprofloxacín. ^bITO: intenzív terápiás osztály

A HEC azonosítása után folyamatosan monitoroztuk a ciprofloxacinnal rezisztens CTX-M-termelő *K. pneumoniae* előfordulását az ESBL-NRL-be beküldött izolátumok között. 2004-ben csak négy hasonló izolátum érkezett megerősítésre, azonban 2005-ben a CTX-M-15 termelő, ciprofloxacinnal rezisztens *K. pneumoniae* izolátumok számának robbanásszerű növekedését tapasztaltuk, ami részben annak is az eredménye, hogy ebben az évben ezek a törzsek 6 súlyos noszokómiai járványt okoztak. A beérkezett és megvizsgált 196 CTX-M-15 termelő, ciprofloxacinnal rezisztens *K. pneumoniae* izolátum 13 megye 35 kórházából származott (8. ábra). A beküldött izolátumok többsége intenzív terápiás osztályokról (n=82), belgyógyászati (n=34), traumatológiai (n=18), sebészeti (n=17) és urológiai (n=15) osztályokról származott. Összességében az izolátumok 36%-a vizelet mintákban fordult elő, de 18%-a hemokulturában, 15%-a sebváladékban és 9%-a alsó légúti mintákban.

A 196 izolátum mindegyike hordozta a *bla_{SHV}*, *bla_{OXA}* és *bla_{CTX-M}* géneket, ezek közül 21 izolátum *bla_{TEM}* pozitív is bizonyult.

Az összes izolátum magas szintű rezisztenciát mutatott ceftazidimmal, cefotaximmal és ciprofloxacinnal szemben, valamint a törzsek 76%-a gentamicinnel, 72%-a tetraciklinnel szemben volt *in vitro* rezisztens.

A PFGE vizsgálat 85%-os hasonlósági szinten összesen 3 PT-ba különítette el a 196 izolátumot: az N PT-ba (HEC) 129 izolátum 27 egészségügyi intézményből, R PT-ba 46 izolátum 9 egészségügyi intézményből, míg az S PT-ba 21 izolátum 4 egészségügyi intézményből tartozott (9. ábra).

A plazmid profil analízis alapján az izolátumok különböző méretű és számú plazmidot hordoztak. Az N PT-ra (HEC) két különböző nagyméretű plazmid volt jellemző: az FJ2 centrumban lezajlott járványból származó 45 izolátum mindegyike egy kb. 140 kb nagyságú plazmidot hordozott, hasonlóan a 2003-ban izolált HEC törzshöz, míg a BP18 centrumból származó 15 izolátumra és a BR1-ből származó 10 izolátumra egy kb. 90 kb nagyságú plazmid volt jellemző.

Az R PT-ba tartozó izolátumokra szintén egy kb. 90 kb nagyságú plazmid, míg az S PT-ba tartozó izolátumokra egy 50 kb nagyságú plazmid volt jellemző.

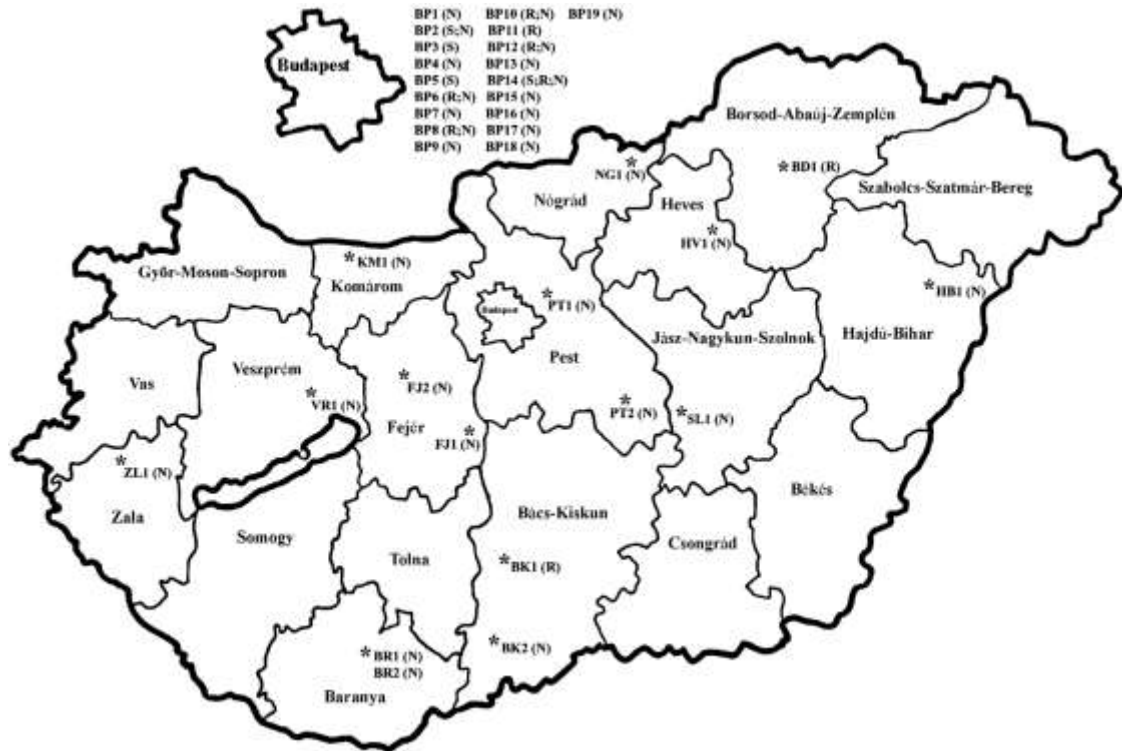
Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia genetikai hátterének jellemzésére 19 izolátumot választottunk ki: 3 HEC izolátumot a 140 kb plazmiddal, 9 HEC izolátumot a 90 kb plazmiddal, 4 R PT-ú és 3 S PT-ú izolátumot. Az S PT izolátumokból származó

50 kb nagyságú plazmidon kívül mindegyik konjugálható volt *E. coli* J53 recipiens törzsbe. A sikertelen konjugációs kísérlet után az 50 kb plazmidot elektroporációval jutattuk be az *E. coli* DH5 α recipiens törzsbe. Az azonos PT-ból származó plazmidok restriktációs mintázata is azonos vagy nagyon hasonló volt a PT-n belül, viszont különböztek a többi PT-ba tartozó izolátumok ESBL-gént hordozó plazmidjaitól (10. ábra).

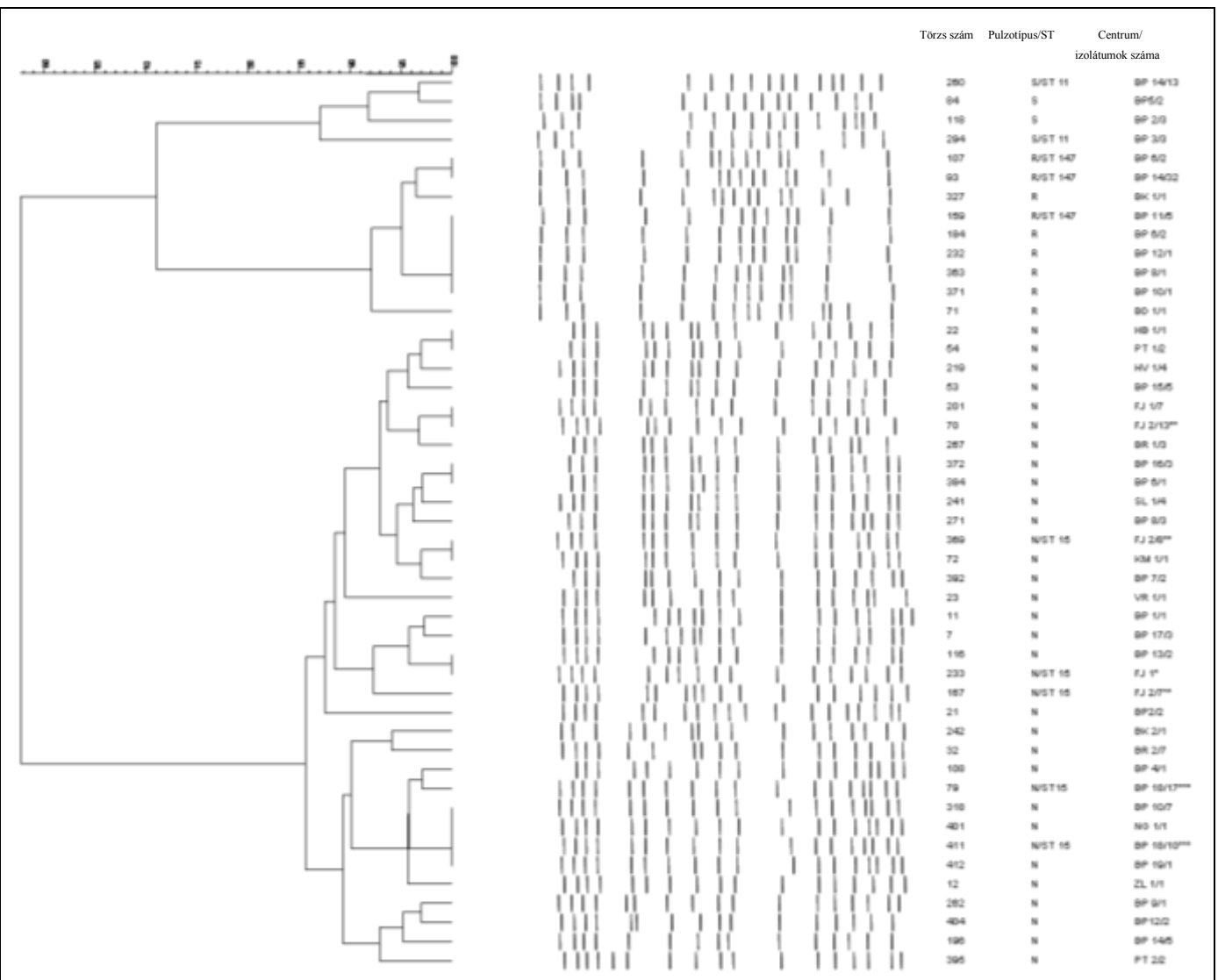
A TK- és EP-okban a cefotaxim és a tetraciklin MIC értékek hasonlóak voltak, mint a donor izolátumokban, a ciprofloxacin MIC értéke pedig enyhe emelkedést mutatott a recipiens törzsekhez képest (9. táblázat). Mind a három PT-ból származó plazmid hordozta a *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *aac(6')-Ib-cr* 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 *ISEcpI* elemet kimutatni a *bla*_{CTX-M-15} géntől 5' irányban. A HEC izolátumokból származó összes TK-ban – függetlenül a plazmid méretétől - azonosítottuk a *tet(A)* és a *tet(C)* tetraciklin rezisztenciáért felelős géneket is (10. táblázat).

A magas szintű kinolon rezisztencia vizsgálatához 10 kiválasztott eredeti izolátum *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 határoztunk meg (GyrA Ser83Ile, ParC Ser80Ile). A kiegészítő kinolon rezisztenciát okozó gének közül a *qnr* gének (*qnrA*, *qnrB* és *qnrS*) hiányoztak az izolátumokból, azonban az *aac(6')-Ib-cr* mindegyik vizsgált plazmidon megtalálható volt (10. táblázat).

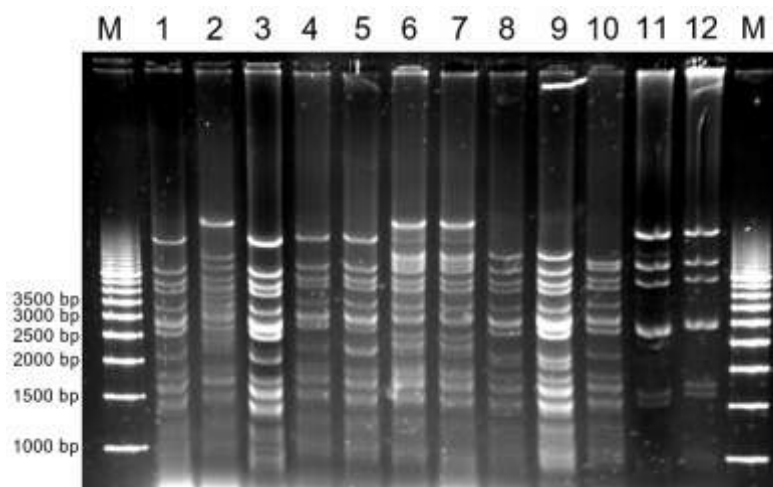
Az MLST vizsgálatokat a 3 PT-ból kiválasztott 10 izolátummal és a 2003-ban izolált HEC prototípus törzsével végeztük el. A három vizsgált PT három különböző szekvencia típusba tartozott: HEC (N PT) a ST15 (allélprofil: 1-1-1-1-1-1), a S PT a ST11 (allél profil: 1-3-1-1-1-3-4), a R PT pedig a ST147 (allél profil: 4-3-6-1-7-4-38) (10. táblázat).



8. ábra. A 35 érintett egészségügyi intézmény elhelyezkedése Magyarországon.
Zárójelben az egyes centrumokban azonosított pulzotípusok.



9. ábra. A 35 centumból származó 196 *K. pneumoniae* törzs makrorestrikciós profiljának cluster analízise. * HEC prototípusa 2003-ból. ** F12-ben lezajlott járványból származó törzsek (2005. április és október). *** B18 centumban lezajlott



10. ábra Különböző epidémiás klónok transzkonjugánsaiból és elektroporánsaiból származó plazmidok *Pst*I-emésztett restrikciós mintázatai. M, molekulásúly marker; Futtatási sorrend: **1**, TK79 (HEC, PT N/ST15); **2**, TK242 (HEC, PT N/ST15); **3**, TK411 (HEC, PT N/ST15); **4**, TK401 (HEC, PT N/ST15); lane 5, TK12 (HEC, PT N/ST15); **6**, TK280 (HEC, PT N/ST15); **7**, TK366 (HEC, PT N/ST15); **8**, TK93 (EC II, PT R/ST147); **9**, TK159 (EC II, PT R/ST147); **10**, TK107 (EC II, PT R/ST147); **11**, EP260 (EC III, PT S/ST 11); **12**, EP294 (EC III, PT S/ST 11).

9. táblázat. Multirezisztens CTX-M-15-termelő *K. pneumoniae* izolátumok (K), transzkonjugánsok (TK) és elektroporánsok (EP) jellemzői

Törzs száma	Izolálás helye	Kórházi osztály ^a	Minta ^b	Pulzotípus	MIC (mg/L) ^c										
					CAZ	CTX	FEP	GEN	TOB	AMK	CIP	TET	SXT	IPM	FOX
K83/5	BP18	belgyógy.	vizelet	N	64	>256	128	128	64	8	>32	>256	0.125	0.25	4
TK83/5					2	64	2	4	8	1	0.016	64	0.032	0.125	2
K79/5	BP18	ITO	HK	N	64	>256	64	32	64	8	>32	>256	1	0.25	16
TK79/5					2	>256	16	8	4	1	0.032	64	0.032	0.25	2
K106/5	BP18	ITO	HK	N	64	>256	32	128	64	4	>32	>256	0.5	0.25	16
TK106/5					2	>256	1	4	8	2	0.016	32	0.032	0.25	2
K109/5	BP18	ITO	HK	N	64	>256	32	64	64	4	>32	>256	1	0.25	16
TK109/5					2	>256	2	8	8	1	0.032	32	0.032	0.25	2
K114/5	BP18	ITO	HK	N	64	>256	32	64	64	4	>32	>256	0.5	0.25	16
TK114/5					2	>256	16	8	8	1	0.032	32	0.032	0.25	2
K113/5	BP18	sebészet	HK	N	128	>256	32	64	64	4	>32	>256	1	0.25	16
TK113/5					4	>256	32	8	8	1	0.016	32	0.032	0.125	2
K242/5	BK2	ITO	vizelet	N	64	>256	32	64	32	4	>32	256	32	0.25	8
TK242/5					2	64	1	8	8	2	0.032	32	0.032	0.125	2
K401/5	NG1	urológia	vizelet	N	64	>256	32	64	64	4	>32	>256	0.5	0.125	32
TK401/5					2	>256	1	8	8	2	0.032	32	0.032	0.125	2
K411/5	BP18	ITO	HK	N	128	>256	64	64	32	4	>32	>256	0.5	0.125	32
TK411/5					2	>256	8	8	4	1	0.032	32	0.032	0.25	2
K40518	ZL1	ITO	vizelet	N	64	>256	32	64	64	4	>32	>256	0.5	0.125	32
TK12/6					2	128	2	8	8	2	0.032	32	0.032	0.125	2
K70/5	FJ2	stroke	vizelet	N	64	>256	64	1	32	4	>32	>256	0.5	0.25	16
TK70/5					4	>256	4	0.125	8	1	0.016	64	0.032	0.125	2
K280/5	FJ2	ITO	AL	N	64	>256	32	1	32	4	>32	>256	0.5	0.25	32
TK280/5					4	>256	2	0.5	8	1	0.032	32	0.032	0.125	2
K366/5	FJ2	belgyógy.	HK	N	64	>256	32	0.5	32	4	>32	>256	1	0.25	32
TK366/5					4	>256	1	0.125	4	1	0.032	32	0.032	0.25	2
K93/5	BP14		HK	R	128	>256	>256	64	64	8	>32	8	0.125	0.25	8
TK93/5					2	32	1	4	4	2	0.016	1	0.032	0.125	2
K107/5	BP6	tüdőgyógy.	vizelet	R	256	>256	64	64	32	8	>32	8	32	0.125	4
TK107/5					2	64	2	8	8	2	0.032	1	0.032	0.125	2
K159/5	BP11	ITO	HK	R	64	>256	128	128	64	8	>32	8	32	0.25	4
TK159/5					4	>256	8	4	4	1	0.032	1	0.032	0.25	4
K260/5	BP14	belgyógy.	HK	S	64	>256	32	64	32	4	>32	1	32	0.25	8
EP260/5					8	32	2	8	4	2	0.032	0.5	0.016	0.125	4
K294/5	BP3	stroke	HK	S	32	>256	16	64	32	4	>32	1	0.125	0.25	4
EP294/5					8	64	4	8	4	2	0.032	0.5	0.016	0.125	4
J53	—	—	—	—	0.125	0.032	0.032	0.064	0.125	0.25	0.008	0.5	0.032	0.125	2
DH5α	—	—	—	—	0.125	0.032	0.032	0.25	0.5	1	0.016	0.5	0.016	0.125	4

^a ITO, Intenzív terápiás osztály; ^b HK, Hemokultúra; AL, Alsólégúti váladék; ^cCAZ, ceftazidim; CTX, cefotaxim; FEP, cefepim; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; AMK, amikacin; CIP, Ciprofloxacin; TET, tetraciklin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazol; IPM, imipenem; FOX, ceftoxitin.

10. táblázat Multirezisztens CTX-M-15-termelő *K. pneumoniae* epidémiás klónok antibiotikum rezisztenciájának genetikai háttere

Pulzotípus	Donor törzsek (kromoszómális)	TK vagy EP (plazmidok)
HEC/N/ST15	<i>gyrA</i> :3SER>PHE, 7ASP>ALA; <i>parC</i> : 80SER>ILE (ATC) <i>bla_{SHV-28}</i>	140 kb plazmid: <i>bla_{CTX-M-15} bla_{OXA-1}</i> <i>tetA, tetC, aac(6)-Ib</i> 90 kb: <i>bla_{CTX-M-15},</i> <i>bla_{OXA-1}, tetA, tetC,</i> <i>aac(6)-Ib, aac(3)-II</i>
ECII/R/ST147	<i>gyrA</i> : 83SER>ILE; <i>parC</i> : 80SER>ILE (ATT)	90 kb: <i>bla_{CTX-M-15}</i> <i>bla_{OXA-1}, aac(6)-Ib,</i> <i>aac(3)-II</i>
EC III/ S/ST11	<i>gyrA</i> :83SER>PHE, 87ASP>ALA; <i>parC</i> : 80SER>ILE (ATC)	50 kb <i>bla_{CTX-M-15} (ISEcp1),</i> <i>bla_{OXA-1}, bla_{TEM-1},</i> <i>aac(6)-Ib, aac(3)-II,</i>

6.3. ESBL-termelő *Klebsiella pneumoniae* molekuláris epidemiológiája 2006-2010 között

6.3.1. ESBL-termelő *Klebsiella pneumoniae* Nemzeti PFGE adatbázisa

A három epidémiás klón terjedését folyamatos monitorozással nyomon követtük, ennek kivitelezéséhez elkezdtük építeni a KP PFGE nemzeti tipizáló adatbázisát. Az évenként beküldött és megvizsgált izolátumok között a 2010. év végéig összesen 153, a HEC-hez tartozó (N/ST15) izolátumot azonosítottunk, melyek 35 kórházból és egy házi orvosi rendeléstől származtak. Ez a multirezisztens epidémiás klón további nozokomiális járványokat is okozott, 2006-ban egy Baranya megyei kórház intenzív terápiás osztályán és 2008-ban egy Győr-Moson-Sopron megyei kórház nefrológiai osztályán, ahol infúziós folyadékból és dializáló folyadékból is származtak izolátumok. Az R/ST147 és az S/ST11 CTX-M-15-termelő klónok járványokat már nem okoztak, viszont több halmozódásból és számos sporadikus esetből azonosítottuk. 2010 végén az R/ST147 klón 12 intézményből származó 76 izolátummal, az S klón pedig 10 kórházból származó 51 izolátummal szerepel adatbázisunkban.

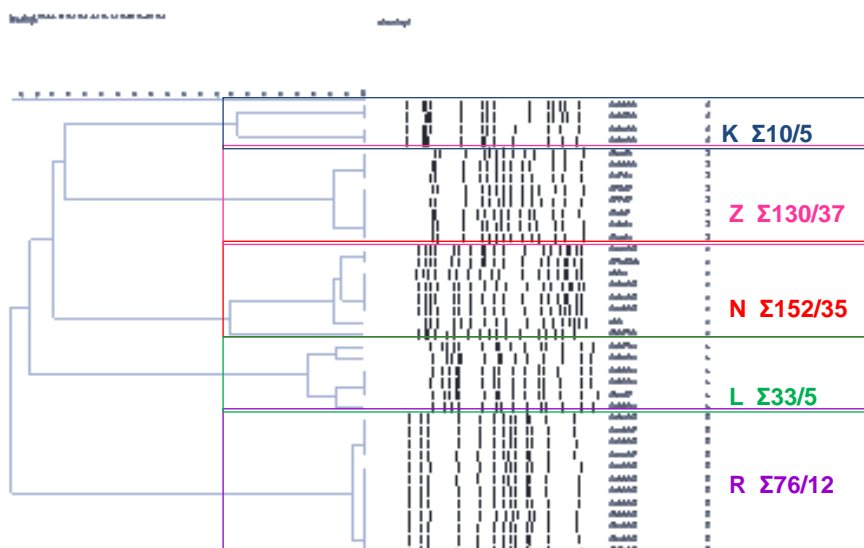
2006-ban egy negyedik ciprofloxacin rezisztens CTX-M-15-termelő epidémiás klón is megjelent, melyet Z pulzotípusként jelöltük. Az MLST vizsgálat egy új - ST525 - típust igazolt. Egy budapesti és egy Pest megyei kórház intenzív terápiás osztályain párhuzamosan nozokomiális járványokat okozott 2006. októberében. 2007-ben mindkét kórházban újabb halmozódásokat okozott, és további két budapesti, valamint egy Szabolcs-Szatmár-Bereg megyei kórházban ápolott betegek mintáiból is azonosítottuk. Az epidémiás klón tovább terjedt 2008-ban, felbukkant újabb budapesti egészségügyi intézményekben, Győr-Moson-Sopron, Nógrád, Heves, Zala, Veszprém, Vas, Hajdú-Bihar megyék egy-egy kórházában is. 2010 végéig 37 egészségügyi intézményben fordult elő összesen 130 izolátummal (11. ábra). 2008-ban Borsod megye egyik kórházának több osztályáról származó ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátum járványügyi tipizálása a K jelölésű genetikai klón jelenlétét igazolta, amelyet már korábban – 2007-ben – szintén ebben a kórházban azonosítottuk. A higiéniai mintákból (felmosó vödör, tubus összekötő harmonika, szívócső belseje, szélcső) származó izolátumok is a K genetikai klónhoz tartoztak. A K klón azóta endémiássá vált ebben a kórházban, az ország más egészségügyi intézményeiben nem azonosítottuk.

A 2004 és 2010 között további, PIC-ban lezajlott járványokból és halmozódásokból származó ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumok makrorestrikciós profilvizsgálatát végeztük el.

Döntően egy járványból vagy halmazódásból egy (ritkán kettő) genetikai klónt azonosítottunk. Ilyenek voltak az M és O klónok 2004-ben, a T klón 2005-ben, a W és X klónok 2006-ban, az U, Y és V 2007-ben, a KP025 2008-ban és a KP041 2009-ban.

A Q, H, P és L klónok egynél több intézményben fordultak elő, akár évekkel később is. A Q klón Békés megyében okozott járványt 2004-ben és Fejér megyében, 2007-ben. A H klónt Baranya megye egyik PIC-ban 2003 és 2004 között többször azonosítottuk járványokból és halmazódásokból, az L klón pedig egy budapesti és egy Pest megyei PIC-ban okozott járványt 2008-ban. A 2004-2008 közötti időszakban PIC-okból származó és vizsgált izolátumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája megegyezett a 2002-2003 között izolált törzsekével, és ezt igazolta az SHV-típusú (SHV-5 és SHV-2a) ESBL-gének kizárólagos hordozása is. A következő két évben azonban ciprofloxacin rezisztens CTX-M-15-termelő törzsek is megjelentek a koraszülött osztályokon. 2009-ben egy Szolnok megyei kórház PIC-ban nozokomiális járványt jelentettek 15 koraszülött érintettségével, 2010-ben egy Budapesti kórház PIC-ban másik nozokomiális járványt szintén 15 koraszülött érintettségével. Mindkét járványból származó izolátumok molekuláris tipizálása igazolta, hogy az összes izolátum a ciprofloxacin-rezisztens, CTX-M-15-termelő országosan elterjedt Z/ST525 epidémiás klónhoz tartozott.

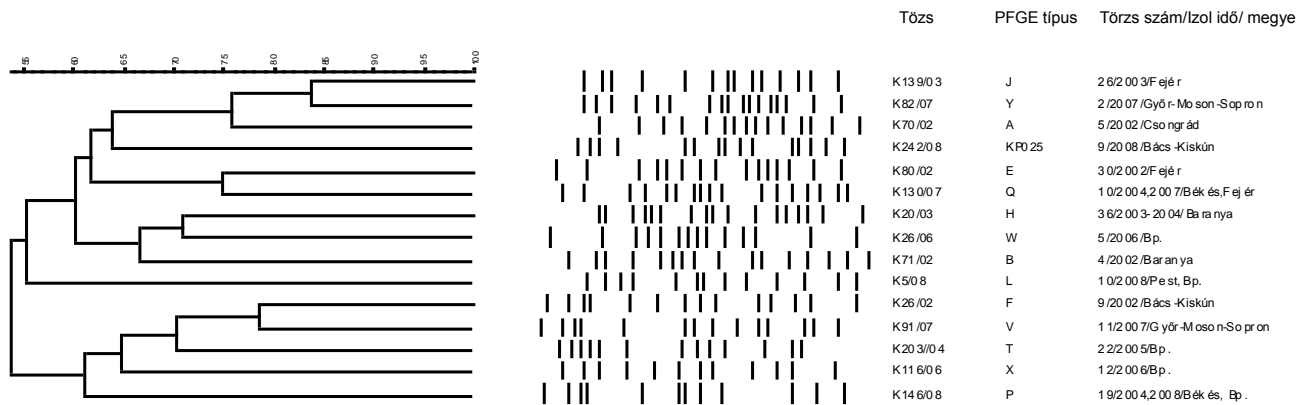
A koraszülött és gyermekosztályokból izolált jelentősebb SHV-termelő *K. pneumoniae* járvány törzseket (genetikai klónokat) egy-egy képviselőjük PFGE mintázata alapján készült családfa segítségével mutatjuk be a 12. ábrán.



11. ábra. Multirezisztens CTX-M-15 termelő epidémiás klónok makrorestrikciós mintázata
(Felnőtt ápolási osztályok, 2003–2010)

D:e(Cp:1.00%) (B:1.0%-20%) (H:00%S:00%) (00%1000%)
 Klebsiella

Klebsiella



12. ábra SHV-típusú ESBL-termelő *Klebsiella spp.* járvány törzsek makrorestrikciós mintázata (PIC-ok, 2002-2010)

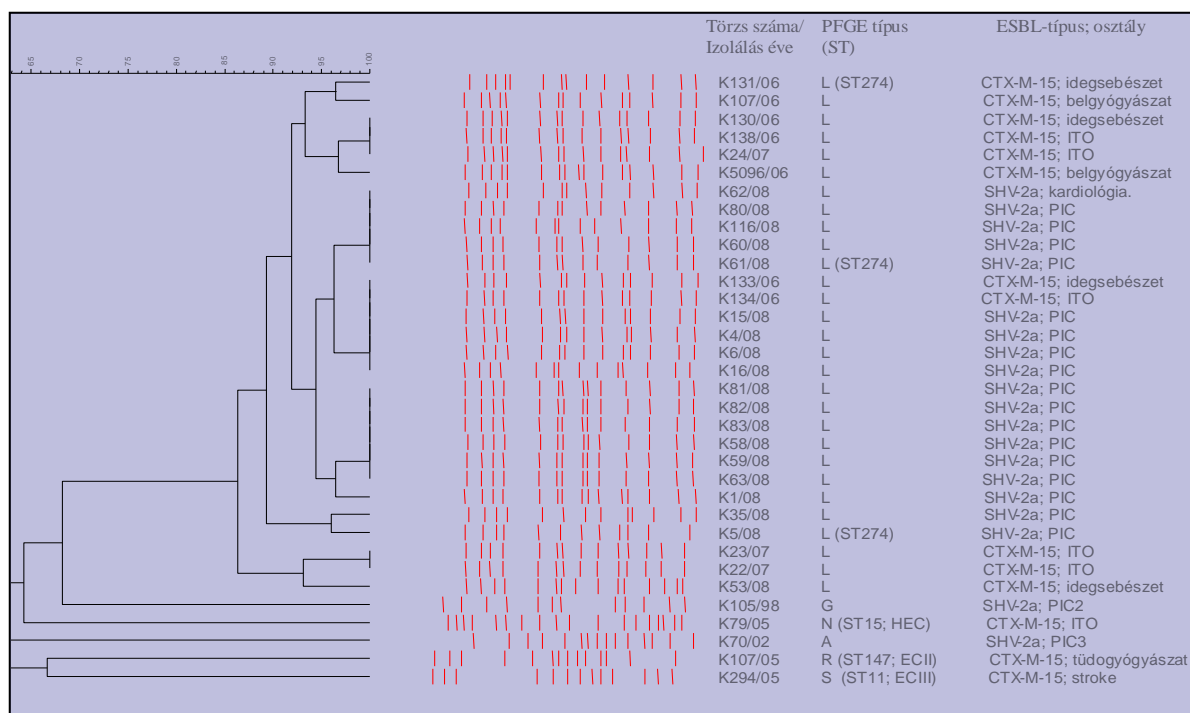
6.3.2. ESBL-termelő *Klebsiella pneumoniae* L epidémiás klón megjelenése és terjedése több kórház felnőtt és csecsemő osztályán

Ebben a vizsgálatban 27 ciprofloxacinnal szemben csökkent érzékenységet, ill. alacsony szintű rezisztenciát mutató (MIC: 0.5-8 mg/L), ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátum fenotípusos, genetikai és molekuláris epidemiológiai jellemzését végeztük el.

A 27 ESBL-KP törzs makrorestrikciós profilvizsgálata egyetlen genetikai klón – L klón - jelenlétét bizonyította mind a felnőtt, mind az újszülött osztályokon (13. ábra). Az MLST eredménye igazolta a makrorestrikciós profil vizsgálat eredményét, mivel mindhárom kiválasztott törzs azonos szekvencia típusba, az ST274-be tartozott.

Az agarhígításos MIC érték meghatározások során a ceftazidim esetében az izolátumok két jól elkülönülő csoportját azonosítottuk: a csecsemő osztályokról származó izolátumok MIC értéke 8 mg/L, míg a felnőtt osztályokról származó izolátumoké 64-128 mg/L-nek bizonyultak (11. táblázat). Az ESBL-gén típusok meghatározásával kiderült, hogy a csecsemő osztályokról származó izolátumok kizárólag SHV-2a típust, a felnőtt betegeket ápoló osztályokról származó izolátumok pedig kizárólag CTX-M-15 típust hordoztak. Valószínűleg az ESBL-gén típusok, illetve az ezeket hordozó plazmidok különbözősége okozhatta a MIC értékekben tapasztalt eltérést.

Az aminoglikozidok esetében a gentamicinnel szembeni rezisztencia mindkét csoport törzseinél magas volt, a felnőtt osztályokról származó izolátumok emellett amikacinnal szemben is rezisztensek voltak. Az aminoglikozid rezisztencia vizsgálatánál két különböző acetiltranszferázt (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 felelős. A koraszülött osztályokról származó izolátumok R-plazmidjai csak az *aac(3)-II-t* kódolták- ezért ezek az izolátumok csak gentamicinre voltak rezisztensek, míg a felnőtt osztályokról származó izolátumok R-plazmidjai mindkét gént hordozták – ennek következménye, hogy a törzsek mindkét vizsgált aminoglikozidra rezisztenseknek bizonyultak. (11. táblázat)



13. ábra. SHV-2a vagy CTX-M-15 típusú ESBL-termelő *Klebsiella pneumoniae* L klónhoz (ST274) tartozó izolátumok makrorestrikciós mintázata.

(PIC, felnőtt osztályok, n=27, 2006-2008)

A ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia vizsgálatok során a felnőtt osztályokról származó izolátumok 2-8 mg/L, a koraszülött osztályokról származó izolátumok, egy kivétellel (K61/8, MIC: 8mg/L), 0,5 mg/L MIC értékeket mértünk. Az efflux-pumpa inhibitor teszttel öt reprezentatív izolátum MIC érték változását vizsgáltuk. Aktív ciprofloxacinnal efflux-pumpa működését a K61/08 jelű koraszülött osztályról származó izolátum esetében tapasztaltuk, ahol az eredeti 8 mg/L MIC érték Phe-Arg- β -naphtylamid hozzáadása után 0,5 mg/L-re változott. Mivel a teszt alapján az emelkedett ciprofloxacinnal MIC értéket csak egy esetben lehetett efflux pumpa túltermelés hatásával magyarázni, a továbbiakban megvizsgáltuk a DNS replikációban résztvevő fehérjéket kódoló gének leggyakrabban leírt, kinolon rezisztenciát eredményező mutációit is. A *gyrA* és *parC* gének kinolon rezisztenciát meghatározó régióinak (QRDR) 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 (12. táblázat).

A transzkonjugánsokból és transzformánsokból izolált ~90 kb méretű *bla*_{SHV-2a} vagy *bla*_{CTX-M-15} géneket kódoló R-plazmidok restrikciós mintázatai lényegesen eltértek egymástól. Meglepő

volt azonban a korábban azonosított járvány és epidémiás ESBL-KP klónok R-plazmidjainak restrikciós mintázataival történt összehasonlítás eredménye. A felnőtt betegekből izolált CTX-M-15 típusú β -laktamáz gént hordozó plazmidok mintázata azonos volt a 2005-ben leírt CTX-M-15 termelő Magyar Epidémiás Klón Ib R-plazmidjainak mintázatával. Továbbá a koraszülött osztályokról származó SHV-2a termelő izolátumok R-plazmidjainak restrikciós mintázata teljesen megegyezett az 1998- és 2002-ben különböző Perinatalis Intenzív Centrumokban izolált SHV-2a-termelő járvány törzsek plazmidjainak mintázataival (14. ábra).

11. táblázat ESBL-termelő *K. pneumoniae* L/ST274 epidémiás klón reprezentáns törzseinek és ezek transzkonjugánsainak (TK) és elektroporánsainak (EP) tulajdonságai

Törzs száma	Beteg kora (év)	Minta*	Ellátás helye (város)	Betegellátó; osztály**	MIC (mg/L)***						
					CAZ	CTX	FEP	CN	AK	CIP	CIP+PAβN
K130/06	34	CSF	Budapest	BP1; Idegseb.	128	256	64	128	32	2	ND
K131/06	39	vér	Budapest	BP1; Idegseb.	128	256	64	128	32	2	1
K133/06	52	vér	Budapest	BP1; Idegseb.	128	128	64	128	32	2	ND
K24/07	73	vér	Budapest	BP1; ITO	128	256	64	128	32	2	ND
K80/08	0	vér	Budapest	BP2; PIC	8	8	2	128	2	0,5	ND
K1/08	0	széklet	Budapest	BP2; PIC	8	8	4	128	1	0,5	ND
K4/08	0	vér	Vác	P1; PIC	8	8	2	128	2	0,5	0,25
K5/08	0	vér	Vác	P1; PIC	8	8	2	128	2	0,5	ND
K6/08	0	vér	Vác	P1; PIC	8	8	4	128	4	0,5	ND
K35/08	0	torok	Székesfehérvár	F1; PIC	8	8	2	128	2	0,5	ND
K53/08	73	LRT	Debrecen	D1; Idegseb.	64	128	32	128	8	8	8
K61/08	0	vér	Budapest	BP2; PIC	8	8	4	128	1	8	0,5
K62/08	0	vér	Budapest	BP2; Kardiológia	64	128	128	128	2	0,5	0,5
K63/08	0	vér	Budapest	BP2; PIC	8	8	2	64	2	0,5	ND
TK130/06					4	64	4	16	0,5	≤0,064	ND
TK131/06					2	16	1	16	1	≤0,064	ND
TK133/06					8	64	2	32	1	≤0,064	ND
TK62/08					2	8	1	16	0,5	≤0,064	ND
TK63/08					2	8	1	16	0,5	≤0,064	ND
EP4/8					≤0,5	1	≤0,5	32	0,5	≤0,064	ND
EP5/8					≤0,5	1	≤0,5	32	0,5	≤0,064	ND
EP61/8					1	1	≤0,5	32	0,5	≤0,064	ND
J5-3					≤0,5	<0,5	≤0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,064	ND
DH5á					≤0,5	<0,5	≤0,5	≤0,25	≤0,5	≤0,064	ND

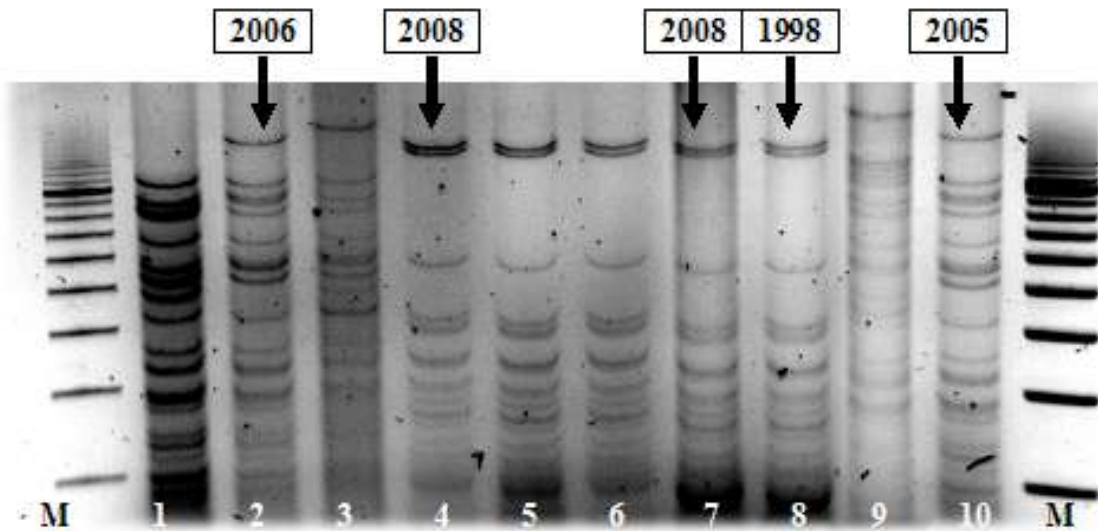
* CSF: cerebrospinális folyadék, LRT: alsólégúti minta

** ITO: Intenzív Terápiás Osztály, PIC: Perinatális Intenzív Centrum

*** CAZ: ceftazidim; CTX: cefotaxim; FEP: Cefepim; CN: Gentamicin; AK: Amikacin; CIP: Ciprofloxacin

12. táblázat. Az L/ST274 epidémiás klónhoz tartozó törzsek genetikai sajátosságai

	Donor törzsek	TK v. EP (plazmidok)
Felnőtt osztályról származó törzsek	<i>gyrA</i> : 83SER>TYR <i>parC</i> : vad típus	90 kb: <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>tetA</i> , <i>tetC</i> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>aac</i> (3)-II
Csecsemő osztályról származó törzsek	<i>gyrA</i> : 83SER>TYR; <i>parC</i> : vad típus	90 kb: <i>bla</i> _{SHV-2a} , <i>aac</i> (3)-II



14. ábra. Különböző epidémiás klónok transzkonjugánsaiból (TK) és transzformánsaiból (T) izolált R-plazmidok restrikciós mintázatai (*Pst*I emésztés). M, marker; 1, TK130/06 (CTX-M-15, L PT); 2, TK131/06 (CTX-M-15, L PT); 3, TK133/06 (CTX-M-15, L PT); 4, T4/08 (SHV-2a, L PT); 5, T5/08 (SHV-2a, L PT); 6, T61/08 (SHV-2a, L PT); 7, TK62/08 (SHV-2a, L PT); 8, TK105/98 (SHV-2a, G PT); 9, TK280/05 (CTX-M-15, HEC-Ia); 10, TK79/05 (CTX-M-15, HEC-Ib)

6.3.3. KPC -termelő *Klebsiella pneumoniae* megjelenése Magyarországon

Az első KPC- termelő izolátumot (K509/08) egy magyar beteg mintájából izolálták, akit egy görögországi kórházból a Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórházba szállították át 2008 októberében. Ezt a beteget kezdetben az idegsebészeti osztályon, majd az intenzív terápiás osztályon ápolták. A K120/09 és K168/09 izolátumokat 2009. elején tenyésztették ki egy olyan beteg mintáiból, akit az intenzív terápiás osztályon egy időben ápoltak az első beteggel. A K105/09 és K153/09 izolátumokat a harmadik, míg a K160/09 izolátumot a negyedik beteg

mintájából tenyésztették ki. Ezt a két beteget azon az idegsebészeti osztályon is ápták, ahol az első beteget, azonban egy hónappal később. A negyedik beteget később átszállították a MISEK Diósgyőri telephelyére, ahol három különböző osztályon is ápták. A negyedik és az ötödik beteget, akinek a mintájából a K167/09 izolátum kitenyészett, a MISEK Diósgyőr intenzív terápiás osztályán ápták egyidejűleg. A K97/09 és K132/09 KPC-termelő *K. pneumoniae* izolátumokat két olyan beteg mintájából tenyésztették ki, akiknek a kórházi tartózkodása alatt nem volt ismert kapcsolata a korábbi öt beteggel. Mindegyik beteg elhunyt a kórházi kezelés során, a boncolás eredménye alapján két eset volt összefüggésbe hozható a KPC-termelő *K. pneumoniae* okozta fertőzéssel.

A kilenc izolátum magas szintű rezisztenciát mutatott a széles-spektrumú cefalosporinokkal és ciprofloxacinnal szemben, továbbá mindegyik rezisztens volt ertapenemmel, imipenemmel és amikacinnal szemben. Meropenem esetében változó MIC értékeket mértünk (MIC 8->32 mg/L). Nyolc törzs tigeicyclinre mérsékelt érzékeny, míg egy (K105/09) rezisztens (MIC 4 mg/L) volt. Minden izolátum esetében a gentamicin MIC értékét is emelkedettnek találtuk. Ezek az MIC értékek nagyon hasonlóak voltak egy norvég és egy svéd KPC-termelő *K. pneumoniae* törzsekéhez, amelyeket összehasonlítás céljából kaptunk (Samuelsen és mtsai 2009). Ki kell emelni, hogy míg az első izolátum (K509/08) magas szinten rezisztens volt trimetoprim/sulfamethoxazollal szemben (MIC >32 mg/L) és colistinre érzékeny (MIC 0,5 mg/L), addig a további nyolc izolátum trimetoprim/sulfamethoxazol-ra volt érzékeny (MIC 0,25-0,5 mg/L) és magasszintű rezisztenciával rendelkező colistinnal szemben (MIC 16-32 mg/L) (13. táblázat).

A PFGE vizsgálatok igazolták, hogy a kilenc izolátum 89%-os hasonlóság alapján az S PT-ba tartozott, amelyet 2005-ben azonosítottunk, mint országosan elterjedt ciprofloxacinnal szemben rezisztens CTX-M-15-termelő epidémiás klón (15. ábra).

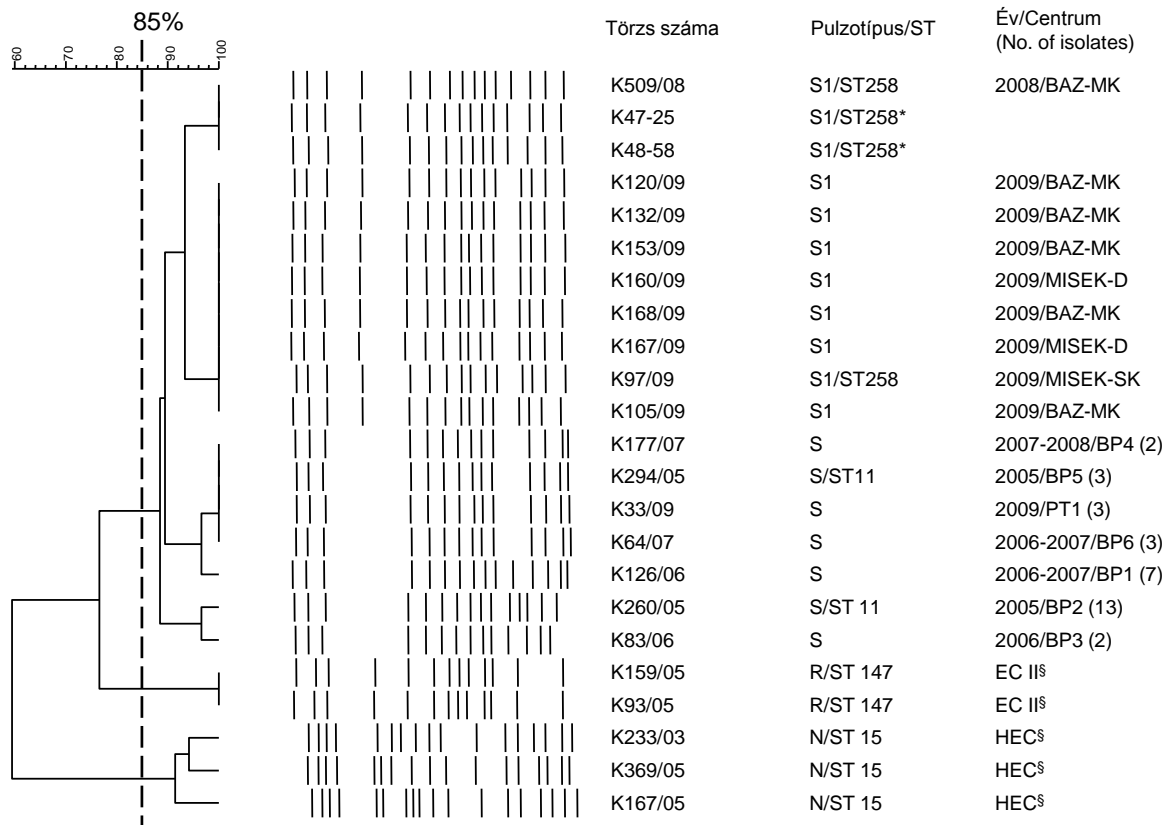
A *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} és *bla*_{SHV} génekre minden izolátum pozitív PCR eredményt adott, viszont egyik sem hordozott *bla*_{CTX-M} gént. Két kiválasztott izolátum (K509/08, K97/09) szekvenálási eredményei szerint az ST258 szekvencia típusához tartoztak és *bla*_{KPC-2}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-11} és *bla*_{SHV-12} géneket hordoztak.

13. táblázat KPC-2-termelő *K. pneumoniae* izolátumok klinikai jellemzői és antibiotikum érzékenysége

Izolátum	Páciens	Nem/kor ^a	Az izolálás helye ^b	Minta	MIC (mg/L) ^c											
					CAZ	CTX	ETP	IPM	MEM	TET	TGC	CIP	GEN	AMK	SXT	CST
K509/08	A	F/57	BAZ-MK	felső légúti	>256	256	8	16	8	16	2	>32	4	64	>32	0,5
K97/09	F	N/67	MISEK-SK	seb	>256	256	8	32	32	64	2	>32	4	64	0,5	16
K105/09	C	N/62	BAZ-MK	széklet	>256	256	16	>32	16	32	4	>32	4	64	0,25	16
K120/09	B	N/27	BAZ-MK	felső légúti	>256	32	16	>32	8	32	2	>32	2	64	0,5	32
K132/09	G	F/85	BAZ-MK	alsó légúti	>256	128	8	>32	32	16	2	>32	4	64	0,5	16
K153/09	C	N/62	BAZ-MK	seb	>256	256	32	>32	8	16	2	>32	2	64	0,5	16
K160/09	D	F/66	MISEK-D	CVK	>256	256	8	>32	32	16	2	>32	4	64	0,5	32
K167/09	E	F/81	MISEK-D	alsó légúti	>256	64	16	>32	8	16	2	>32	2	64	0,5	16
K168/09	B	N/27	BAZ-MK	széklet	>256	64	16	>32	>32	16	2	>32	2	64	0,5	32

^aF, férfi; N, nő.^bBAZ-MK, Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórház, Miskolc; MISEK-SK, Miskolc Egészségügyi Központ –Simmelweis Kórház, Miskolc; MISEK-D, Miskolc Egészségügyi Központ -Diósgyőr, Miskolc.^cCAZ, ceftazidim; CTX, cefotaxim; ETP: ertapenem; IPM, imipenem; MEM: meropenem; TET, tetracyclin; TGC: tigecyclin; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazol; CST: colistin.

Dice (Opt:1.00%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]



15. ábra Kilenc KPC-2-termelő és 33 CTX-M-15-termelő *K. pneumoniae* törzs makrorestrikciós profilon (MRP) alapuló dendrogramja, valamint a kiválasztott törzsek szekvencia típusa. ECII (R/ST147) és HEC (N/ST15) törzsek MRP-ja szintén látható az ábrán.

* Norvégiában izolált KPC-2-termelő *K. pneumoniae* törzsek (Samuelsen és mtsai 2009)

§ ECII, Epidémiás klón II; HEC (Hungarian Epidemic clone)

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

A megerősítő vizsgálatok alapján 2009-ben azonosítottuk az első hazai metallo- β -laktamáz-termelő *K. pneumoniae* izolátumot (KP3686), amely egy Budapesti kórházban ápolat beteg BAL mintájából származott

A KP3686 izolátum kromoszómáisan kódolt SHV-11 nem-ESBL típusú β -laktamázt termelt. Az izolátum által hordozott plazmidokon *bla*_{CTX-M-15} és *bla*_{TEM-1}, továbbá 1. osztályú integronon *bla*_{VIM-4} géneket azonosítottuk. Az integronon az első pozícióban az *aac(6')-Ib* aminoglikozid rezisztenciát kódoló gén, mögötte pedig a *bla*_{VIM-4} metallo- β -laktamáz kódoló gén jelenlétét igazoltuk. Az integron nukleotid szekvenciái a GenBank GU181265 számmal szerepelnek.

Az 1. osztályú integron lokalizációjának meghatározásához konjugációs és transzformációs kísérleteket végeztünk. A β -laktamáz géneket hordozó plazmidok transzformációja az *E. coli* DH5a recipiens törzsben sikeres volt. A transzformánsok PCR-termékeinek szekvenálása igazolta a *bla*_{CTX-M-15} ESBL és *bla*_{TEM-1} gének elhelyezkedését a ~50 kb méretű pKP3686/2 jelölésű plazmidon, illetve a *bla*_{VIM-4} gént a ~90 kb méretű pKP3686/1 jelölésű plazmidon.

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

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

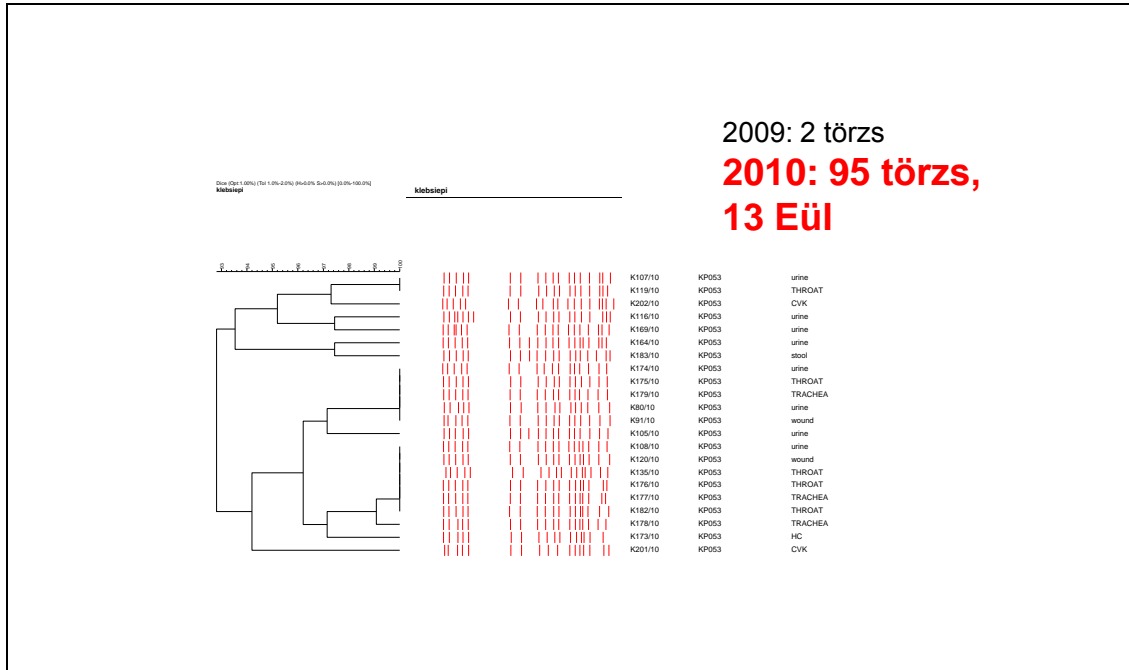
Az ESBL-termelés megerősítésre az Országos Epidemiológiai Központba beküldött *K. pneumoniae* izolátumok között 2009. év végén azonosítottuk az első CTX-M-típusú ESBL és indukálható, plazmidon-kódolt AmpC-termelő *K. pneumoniae* izolátumokat. A következő év során folyamatosan érkeztek ilyen izolátumok döntően egy Fővárosi intézményben zajló, több osztályt érintő nozokomiális járványból. Az év végére már 15 egészségügyi intézményből és három háziorvostól érkeztek hasonló izolátumok, melyek a cefalosporinok mellett aminoglikozidokkal, fluorokinolonokkal és sumetrolimmal szemben is rezisztensek voltak. Ki kell emelni, hogy az izolátumok 30%-a legalább egy karbapenemmel szemben is rezisztens volt (akár >32 mg/L imipenem MIC értékek is előfordultak).

2010. év végéig 117 *K. pneumoniae* izolátumot azonosítottunk, melyek plazmidon-kódolt, indukálható DHA-termelőknek bizonyultak. Ezek közül 108 CTX-M-típusú ESBL-termelő is volt. Az izolátumok molekuláris epidemiológiai tipizálása igazolta, hogy jelentős részük - 82,9%-a – a KP053 pulzotípushoz és az ST11-hez tartozott (14. táblázat, 16. ábra). 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.

14. táblázat *Klebsiella pneumoniae* izolátumok plazmidon-kódolt AmpC-típusú β -laktamáz (DHA-1) hordozása Magyarországon, 2009.01.01.-2010.12.31.

PFGE típusok	Izolátumok száma	CTX-M-típusú ESBL-t is termelők száma	Év	
			2009	2010
KP053	97	95	2 (A)*	95 (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M)
KP070	10	3	-	10 (A, C, J, N)
KP080	4	4	-	4 (A)
Z klón	1	1	-	1 (A)
S klón	1	1	-	1 (A)
KP055	1	1	-	1 (A)
KP071	1	1	-	1 (D)
KP073	1	1	-	1 (C)
KP079	1	1	-	1 (O)
Összesen	117	108	2	115

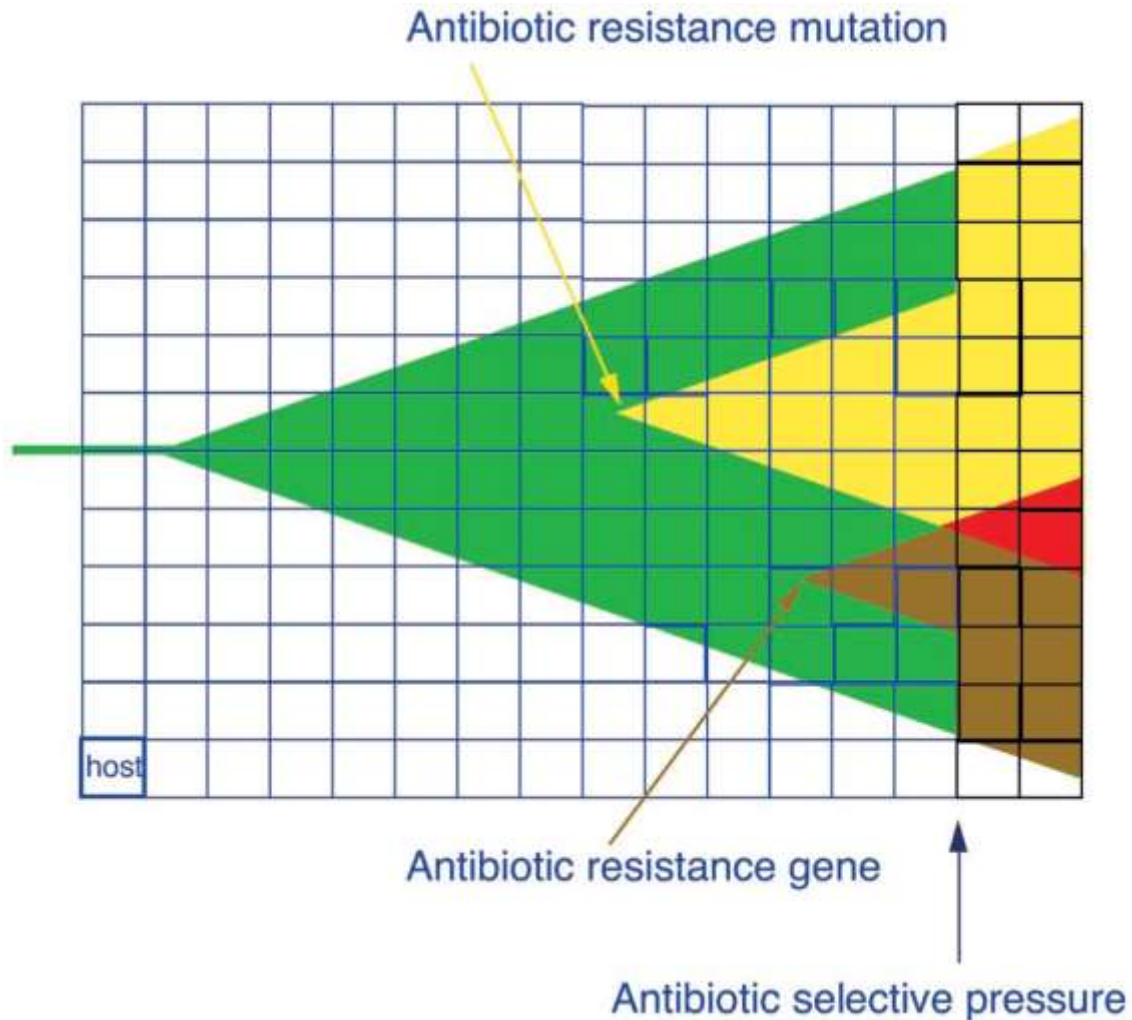
* Különböző egészségügyi intézmények, ahonnan az izolátumok származtak



16. ábra DHA-1 termelő KP053 PT multirezisztens *K. pneumoniae* epidémiás klón MRP dendrogramja.

7. Megbeszélés

Az a tény, hogy a környezeti mikroorganizmusok nem képesek egészséges gazdaszervezeteket megbetegíteni, viszont nagy gyakorisággal okoznak fertőzéseket immunokompromittált páciensekben azt jelzi, hogy számos szervezet ökológiailag kompatibilis az emberi test fiziko-kémiai viszonyaival. Így az emberi test olyan ökológiai tér, amelyet számos mikroorganizmus – gyakran környezeti eredetű - képes kolonizálni (Quinn 1998). Az egészséges szervezetben az immunrendszer megakadályozza, hogy az emberi testet kolonizáló opportunistá patogének infekciókat okozzanak. Főleg az immunokompromittált betegekben azonban az antibiotikum kezelés tart fenn kolonizálható teret az emberi testben (Martinez és Baquero 2002). Így elsődlegesen azok az egyedek – vagy klónok –, amelyek megfelelő eszközökkel (rezisztencia gének, mutációk) rendelkeznek az antibiotikumok kivédésére, lesznek képesek ezt a teret kolonizálni (17. ábra). Az antibiotikum kezelések erős szelektációs nyomásának köszönhetően az adott species rezisztens klónjai fognak dominálni, és epidémiás baktérium faj esetében széleskörű terjedést elérni.



17. ábra Az epidémiás baktérium klónok könnyen felvehetnek antibiotikum-rezisztencia géneket. Egy epidémiás klón (zöld) a gazdaszervezetek (minden egyes kék kocka) között terjedve növeli a populáció méretét, ezáltal elősegíti az antibiotikum-rezisztens mutációk megjelenését (sárga nyíl) és horizontálisan terjedő rezisztencia gének felvételét (barna nyíl). A klón epidémiás jellegéből adódik, hogy a megszerzett rezisztencia igen gyorsan elterjed a populációban, akár antibiotikum jelenléte nélkül is (rezisztens variánsok, sárga és barna). Számos kombináció létezhet a különböző rezisztencia mechanizmusok között, ami végül multirezisztens egyedek kialakulásához vezet (piros). Amennyiben az antibiotikumok állandóan jelen vannak a gazdaszervezetben, mint pl. az intenzív osztályokon (fekete kockák), az a rezisztens egyedek elterjedését segíti elő. (Martinez és Baquero, 2002 nyomán).

A *K.pneumoniae* populáció struktúrájáról igen kevés információval rendelkezünk. Brisse és mtsai (2009) eredményei szerint részben klonális lehet, mivel 235 humán, állati és környezeti mintákból izolált *K. pneumoniae* törzs alapján MLST módszerrel sikerült néhány virulens klónt – mint klonális komplexet (CC-t) - azonosítaniuk.

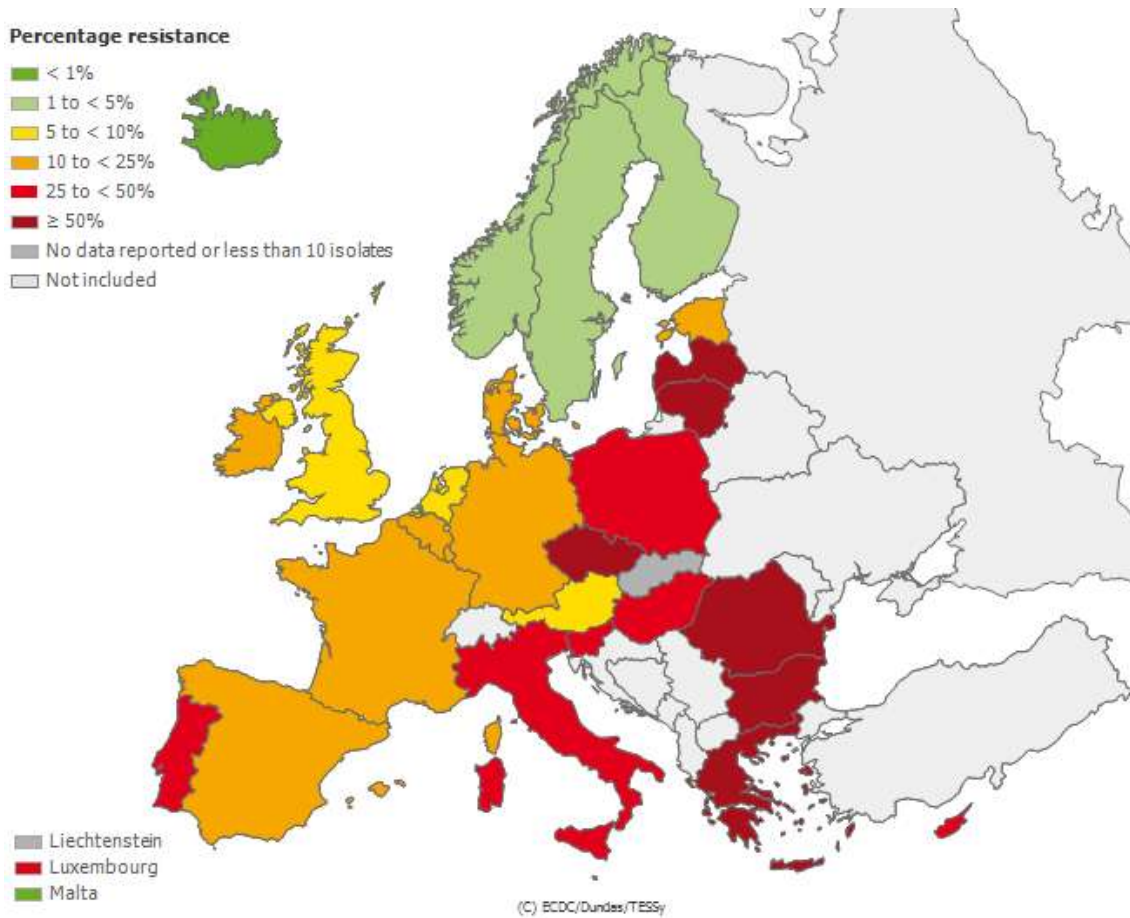
Figyelembe véve egyfelől a *K. pneumoniae* járványokozó képességét, másfelől a virulens klónok létezését, az immunokompromittált betegek antibiotikumokkal történő széleskörű kórházi kezelésének logikus következménye lehet rezisztens epidémiás klónok kiszelektálódása a *K. pneumoniae* populációkon belül.

A XXI. század egyik jelentős egészségügyi problémája a multirezisztens Gram-negatív baktériumok, és ezenbelül a számos rezisztencia mechanizmussal védekező *K. pneumoniae* pandémiás terjedése. Ennek okaira a fenti hipotézis részben magyarázatot adhat.

A 3. generációs cefalosporinok az 1980-as években kerültek bevezetésre, és rövid időn belül megjelentek az ESBL-termelő törzsek is. A nemzetközi irodalomban az ESBL-termelést először *K. pneumoniae* klinikai izolátumoknál írták le (Knothe és mtsai 1983), ahogy az első ESBL-termelő törzs által okozott nozokomiális járványt is Franciaországban, amely szintén egy *K. pneumoniae* járvány törzs volt (Buré és mtsai 1988).

Európa után az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek igen gyorsan – a 1990-es évek elején – „áthajóztak” Észak-Amerikába, ahol nagy kiterjedésű, súlyos nozokomiális járványokat okoztak (Meyer és mtsai 1993, Medeiros 1993).

Az utóbbi 10 évben az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek előfordulása drámaian megnőtt. A közelmúltban európai és interkontinentális surveillance tanulmányok készültek az ESBL-termelő *Enterobacteriaceae* és ezen belül az ESBL-termelő *K. pneumoniae* különböző földrajzi régiókban való elterjedtségéről. Az ESBL-KP törzsek arányát 2004 és 2006 között folytatott Tygecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST) keretein belül négy kontinensen vizsgálták (Reinert és mtsai 2007). A vizsgálat szerint az ESBL-KP aránya Európában (13.3%) és Észak Amerikában (13.3%) sokkal alacsonyabb Dél Amerikához (45%) és Ázsiához (25%) képest. Az EARSS-Net (the European Antimicrobial Resistance Surveillance System) 2009-es adatai szerint a hemokultúrából izolált 3. generációs cefalosporin rezisztens *K. pneumoniae* törzsek aránya a Skandináv országokban 5% alatti, Nyugat-Európában 10-25%, Kelet-Európában 25-50% közötti, és a Balkánon 50% fölött van (18. ábra).

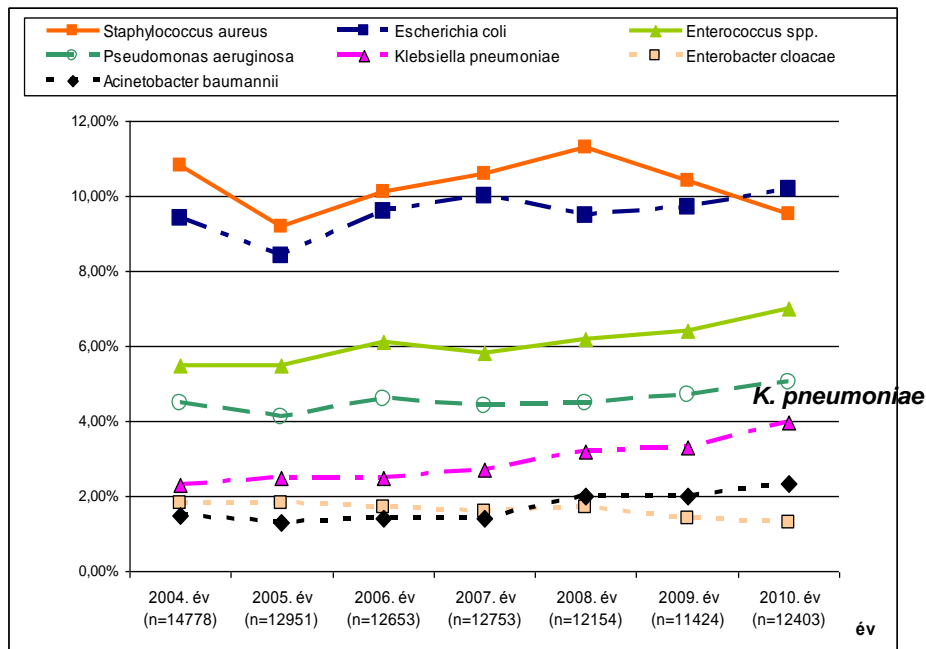


18. ábra Hemokulturából izolált *K. pneumoniae* izolátumok 3. generációs cefalosporin rezisztenciájának aránya a résztvevő országokban, EARSS 2009

Az OEK szervezésében működő hazai antibiotikum rezisztenciát monitorozó Nemzeti Bakteriológiai Surveillance (NBS) a bakteriális kórokozók antibiotikum rezisztencia adatainak gyűjtését és feldolgozását végzi. A hazai pozitív tenyésztési eredmények kb. 60-70%-a kerül évente az adatbázisba, és ebből a rendszerből származnak az európai antibiotikum rezisztencia surveillance rendszerbe (EARSS) (2010-től az Európai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (ECDC) Európai Antibiotikum Rezisztencia Surveillance Hálózatába (EARS-Net)) közölt adatok is.

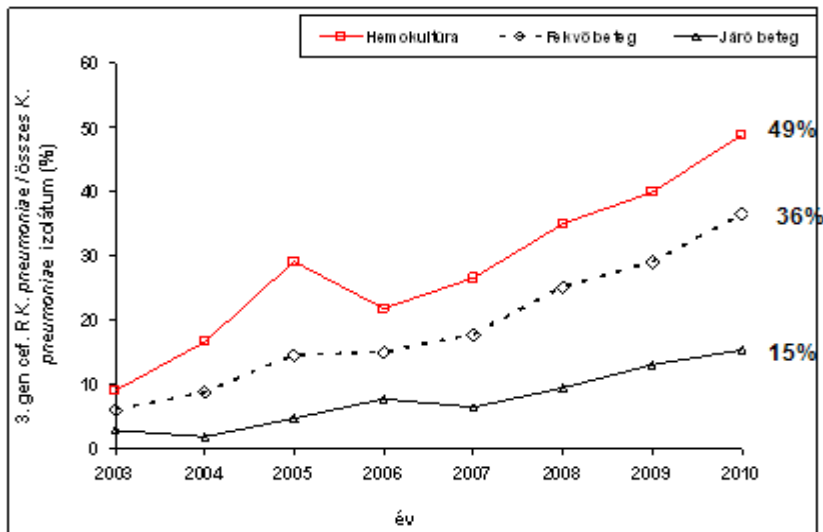
Az NBS adatai szerint Magyarországon a hemokulturából izolált *K. pneumoniae* aránya 2004-ben tapasztalt 2%-ról 4%-ra emelkedett 2010-ben (19. ábra). Ezenbelül a 3. generációs cefalosporin rezisztens *K. pneumoniae* izolátumok aránya is évről-évre folyamatosan emelkedik mind a noszokomiális, mind a területen szerzett infekciók

esetében (20. ábra). A hemokultúrából származó *K. pneumoniae* izolátumok közel fele ma már multirezisztens (egyszerre 3. generációs cefalosporin, fluorokinolon és aminoglikozid rezisztens): 2003-ban ilyen izolátumok még 1%-nál kisebb gyakorisággal fordultak elő, 2005-ben elérték a 15%-ot míg 2010-ben az összes *K. pneumoniae* izolátum 40%-t, a 3. generációs cefalosporin rezisztens *K. pneumoniae* izolátumoknak pedig több mint 70%-t adták (21. ábra). Dolgozatomban az ábrákról leolvasható trendek mögött húzódó kilenc évet felölelő populáció-dinamikai változások, a populációban cirkuláló rezisztencia gének meghatározása és aránya, a *K. pneumoniae* epidemicitásának, molekuláris epidemiológiájának vizsgálata kerül bemutatásra.

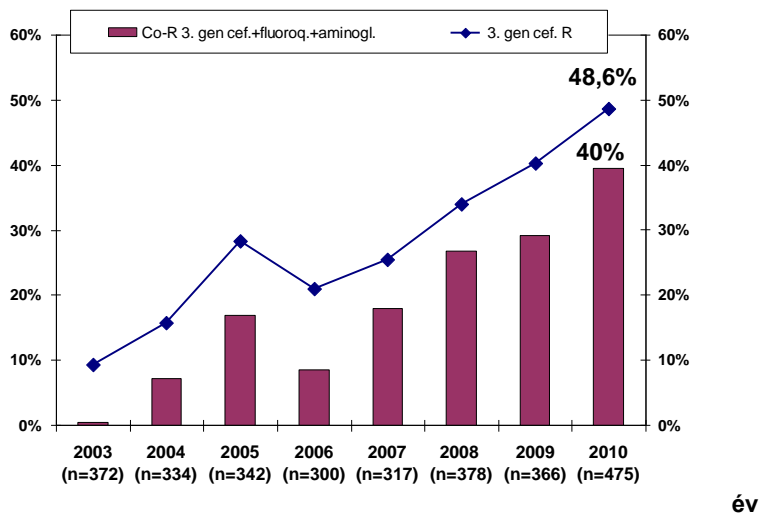


19. ábra Hemokultúrából izolált kórokozók aránya.

(NBS adatok alapján 2003-2010)



20. ábra *K. pneumoniae* izolátumok 3. generációs cefalosporin rezisztenciájának aránya.
(NBS adatok alapján 2003-2010)



21. ábra 3. gen. cefalosporinok, aminoglikozidok és fluorokinolonok korezisztenciája hemokultúrából származó *K. pneumoniae* izolátumokban.
(NBS adatai alapján, 2003-2010)

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

2002-2003 között Magyarországon ESBL-termelő *Klebsiella* spp. törzsek számos nozokomiális járványt okoztak különböző PIC-ban. Ennek okait keresve az OEK-be beküldött hét bejelentett nozokomiális járványból származó 126 törzs molekuláris epidemiológiai vizsgálatát végeztük el. Eredményeink igazolták, hogy az öt kórház PIC-iban lezajlott hét járványt tíz epidemiológiailag független genetikai klón okozta. Kórházak között terjedő, több járványban résztvevő epidémiás klónokat nem azonosítottunk.

Érdekes módon azokban a PIC-ban (PIC1, PIC2), ahol egynél több járvány fordult elő, egyetlen járvány törzs sem perzisztált hosszabb ideig ugyanazon az osztályon. Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy az SHV-termelő *Klebsiella* spp. klónok terjedése egy-egy kórházra korlátozódott és nem játszott kiemelkedő szerepet a széleskörű elterjedésben, amire viszont más tanulmányok utalnak. (Bauernfeind és mtsai 1993, Coque és mtsai 2002).

Annak ellenére, hogy a hét SHV-5-típusú β -laktamáz termelő járvány törzs (D, E, J PTK, PIC 1; F PT, PIC 2; B PT, PIC 3; I PT, PIC 4 és H PT PIC 5) egyenként akár 6 különböző méretű plazmidot is tartalmazott, egyedül a 94 kb méretű plazmid átvitele sikerült minden egyes törzsből. A 94 kb méretű plazmidok restrikciós vizsgálata két restrikciós enzimmel igazolta, hogy mindegyik plazmid nagyon hasonló, vagy azonos mintázattal rendelkezett. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy azonos *bla_{SHV-5}*-hordozó plazmidok terjedtek el a járványokat okozó *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* törzsekben az ország távolieső régióiban. Legjobb tudomásunk szerint ez volt az első leírása egy R-plazmid ilyen nagyméretű és gyors országos terjedésének, ahol 8 hónap alatt járványok sorozatát okozta több megye PIC-aiban.

Részben hasonló eredményekről számolnak be Prodinger és mtsai (1996), akik egy 80 kb körüli *bla_{SHV-5}*-hordozó R-plazmid epidémiás terjedését és három kórházi osztályon párhuzamos járványok kialakulásában játszott szerepét bizonyították be. Magyarországon Kristóf és mtsai 2001 és 2005 között izolált *Klebsiella* spp ESBL termelését vizsgálták egy budapesti kórház PIC osztályán. Az izolátumok 46%-ánál igazolták az ESBL-termelést (23 *K. pneumoniae* és 16 *K. oxytoca* izolátum). A vizsgálat

ideje alatt a 6 különböző PT-hoz tartozó törzsek csak néhány hónapig voltak jelen az osztályon. Az izolátumok 70%-a *bla_{SHV-5}* gént hordozott, valamint 9 *K. oxytoca* izolátumban *bla_{SHV-12}* gént azonosítottak. (Az általunk vizsgált járványoknál az utóbbi gént nem detektáltuk). Az izolátumok többségében a *bla_{SHV-5}* gén itt is egy ~90 kb méretű plazmidon helyezkedett el (Kristóf és mtsai 2007).

Vizsgálatunk időszakában még igen kevés tanulmányban írtak le SHV-2a-termelő patogéneket. Igen ritkán izolált β -laktamáz típus volt Európában (Bedenic és mtsai 2001, Perilli és mtsai 2002, Zarnayová és mtsai 2005), de érdekes módon a leggyakoribb Koreában (Kim 2002). Spanyolországban és Szlovákiában végzett vizsgálatok szerint az SHV-2a különböző klónokban való megjelenése nem R-plazmidok terjedésének következménye (Coque és mtsai 2002, Zarnayová és mtsai 2005). Ezzel szemben vizsgálatunkban a K105/98 (PIC 2, 1998) és K75/02 (PIC 3, 2002) izolátumokból származó SHV-2a enzimet kódoló konjugatív plazmidok restriktív mintázata teljesen megegyezett. A két plazmidot két különböző járvány törzsből izoláltuk, a törzsek pedig földrajzilag távoleső PIC-kban okoztak járványokat 4 év eltéréssel. Emellett a TK-nak ezek a plazmidok hasonló rezisztencia szintet közvetítettek cefotaximmal és gentamicinnel szemben. Ezt figyelembe véve úgy tűnik, hogy a *bla_{SHV-2a}* gén – a gentamicin rezisztenciával együtt - egyetlen konjugatív plazmid segítségével képes terjedni.

Glatz és mtsai 1998-ban PIC osztályokról gyűjtött *E. cloacae* izoátumokkal végeztek vizsgálatokat. A 142 vizsgált izolátum közül hétben egy ~90 kb nagyságú, *bla_{SHV-2a}* gént hordozó plazmidot izoláltak, amely emésztési képe nagyon hasonló volt a *K. pneumoniae*-ből származó plazmidhoz (Glatz és mtsai 2010). Ez az eredmény lehetséges magyarázattal szolgálhat az epidémiás plazmidok származására vagy perzisztálására, annál is inkább, mert az *E. cloacae* törzsek képesek ellenállni bizonyos fertőtlenítőszernek (Herson és mtsai 1987), és az intenzív terápiás osztályok környezetében hosszabb ideig életképesek (átlagosan 17,5 nap), mint a *K. pneumoniae* (átlagosan 7,5 nap) vagy az *E. coli* (átlagosan 2 nap) törzsek (Gastmeier és mtsai 2006). Ez alapján lehetséges, hogy az R-plazmidok rezervoárja a kórházi környezetben van, onnan pedig virulensebb, de antibiotikumokkal szemben érzékeny törzsek ezeket felvehetik.

Eredményeink bebizonyították, hogy a hazai PIC-kban 2002-2003 között lezajlott ESBL-termelő *Klebsiella* spp. törzsek által okozott járványok rezisztencia géneket hordozó plazmidok széles körű, hatékony terjedésének következménye. Ez alapján a PIC-ban az akkori ESBL-szituáció háttérében hasonló vagy azonos *bla*_{SHV-5}- vagy *bla*_{SHV-2a}-hordozó multirezisztens epidémiás R-plazmidok országos terjedése állt, amelyek a *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* populációk egyes tagjait potenciális járvány törzsekké tehettek. Baquero és mtsai (2002) az ESBL-termelő patogénekkal kapcsolatos megfigyeléseik definiálására bevezették a „allodémiás” (allos = más) elnevezést bizonyos poliklonális járványok leírására. Megfigyeléseik alapján amikor az epidemiológiai szituáció nem egyértelmű – sem járványok, sem endémiás terjedés nem bizonyítható egyértelműen – az „allodémiás szituáció” fogalma alkalmasabb a helyzet leírására. Fentieket figyelembe véve az akkori helyzetet kórházak közötti „allodémiás szituációként” írhatjuk le, amelyet SHV-típusú ESBL-gént kódoló, nagyon hasonló R-plazmidok *Klebsiella* spp. törzsekbe való többszöri bejutása okozott. Az ilyen típusú R-plazmidok elnevezésére az „allodémiás R-plazmidok” fogalmát ajánljuk.

7.2. CTX-M-termelő *K. pneumoniae* törzsek vizsgálata

A CTX-M-15-típusú β -laktamázok megjelenése *K. pneumoniae* törzsekben nem volt meglepő, tekintve széles körű elterjedésüket az *Enterobacteriaceae* család tagjai között Kelet Európában (Baraniak és mtsai 2002a, Edelstein és mtsai 2003). 2003-ban végzett vizsgálatunkban 17 ciprofloxacin rezisztens CTX-M-15-termelő *K. pneumoniae* izolátumot azonosítottunk, amelyeket 5 megye nyolc, földrajzilag távoleső kórházában, döntően sebészeti osztályain sebvádékokból izolálták. Érdekes módon az izolátumok különböző időpontokban vett mintákból származtak, akár több hónap eltéréssel. A makrorestrikciós profil vizsgálat alapján az izolátumok egy genetikai klónhoz – epidémiás kónhoz tartoztak. Az epidémiás klón elnevezésére a Magyar Epidémiás Klón (Hungarian Epidemic Clone, HEC) nevet ajánlottuk. Ez akkor nem csak Magyarországon, de a nemzetközi irodalomban is az első bizonyítottan epidémiás elterjedésű *K. pneumoniae* klón volt.

A HEC-hez tartozó 2003-ból származó izolátumokban a *bla*_{CTX-M-15} gén egy ~140 kb méretű konjugatív plazmidon helyezkedett el. Egy francia kórházban izolált *E. coli* izolátumokban a *bla*_{CTX-M-15} hasonlóan nagy, 120 kb méretű konjugatív plazmidon

helyezkedett el tetraciklin és aminoglikozid rezisztenciát kódoló géekkel együtt (Leflon-Guibout és mtsai 2004). Általánosságban elmondható, hogy a CTX-M-kódoló gének 7-160 kb nagyságú plazmidokon fordulhatnak elő és a plazmidok többsége *in vitro* konjugációval átvihető. Ezek a plazmidok igen gyakran más - aminoglikozidok, chloramphenicol, sulfonamidok, teraciklin - rezisztencia géneket is kódolnak (Bonnet 2004). A vizsgálatunk időszakában a CTX-M-15-termelő klónok epidémiás terjedését csak *E. coli* törzsekre írták le az Egyesült Királyságban és Franciaországban (Woodford és mtsai 2004, Leflon-Guibout és mtsai 2004).

A HEC azonosítása után folyamatos monitorozással figyeltük a hasonló antibiogrammal rendelkező izolátumok felbukkanását. 2004-ben az OEK-be beküldött 183 ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátum közül összesen négy volt ciprofloxacin rezisztens CTX-M-15 termelő. A következő évben azonban a ciprofloxacin rezisztens CTX-M-15 termelő *K. pneumoniae* robbanásszerű, széles körű elterjedését tapasztaltuk: 13 megye 35 kórházában, főleg intenzív terápiás osztályokról származó 196 izolátumot küldtek be további vizsgálatokra.

A makrorestrikciós profil vizsgálat a kizárólag felnőtt betegekben származó 196 izolátumot összesen három pulzotípusba sorolta, amelyeket epidémiás klónoknak neveztünk el: a már ismert HEC, valamint ECII (R PT) és ECIII (S PT). A HEC-t további három szubtípusba soroltuk, ami már a klón heterogenitását bizonyította. Ez nem meglepő, mivel 2003-ban történt első leírása után már két év telt el, és a klón már az egész országban elterjedt. A térben és időben történő terjedés pedig a baktériális klónok esetében a genetikai állomány kisebb-nagyobb változását eredményezheti, ahogy a szervezet kénytelen alkalmazkodni az újabb környezeti feltételekhez. Az S és az R epidémiás klónok viszonylag homogén struktúrával rendelkeztek, ami feltehetően az akkori kisebb elterjedtségüknek köszönhető.

A PFGE kiválóan alkalmas baktériumok molekuláris-epidemiológiai tipizálására, viszont térben és időben az epidemiológiailag nem összefüggő izolátumok összehasonlítására csak nagy, többszáz izolátum mintázatait tartalmazó adatbázisok segítségével alkalmazható. Ezzel szemben az MLST, amely a baktériumok háztartási gének genetikai változatosságán alapul, jól alkalmazható időben és térben hosszabb távot felölelő epidemiológiai összehasonlító és populáció-genetikai vizsgálatok elvégzésére (Maiden és mtsai 1998). A *K. pneumoniae* MLST sémáját éppen akkor

közölték Diancourt és mtsai (2005), és ezen a területen elsőként alkalmaztuk a három epidémiás klón tipizálására. Az MLST eredményei igazolták a makrorestrikciós profil szerinti csoportosítást, a törzsek valóban három különböző epidémiás klónhoz tartoztak: ST11 (S PT), ST15 (N PT), ST147 (R PT). Az ST11 és ST15 típusokhoz tartozó néhány törzs sporadikus izolálásáról Európában akkor már beszámoltak (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>, Diancourt és mtsai 2005), viszont az ST147 szekvenciatípust elsőként írtuk le.

Az MLST eredmények interpretációja új megvilágításban helyezte a *K.pneumoniae* populációról eddig alkotott elképzeléseinket. Bizonyítékot nyert, hogy a populáción belül néhány törzs stabil klonális struktúrával rendelkezik. Így a *K. pneumoniae* populációban elsőként írtunk le epidémiás klónok létezését. Vizsgálataink igazolták, hogy Magyarországon ezek az epidémiás klónok több egészségügyi intézményben jelen vannak, és akár több évig perzisztálhatnak ugyanabban a kórházban. Megállapíthatjuk, hogy a CTX-M-15-típusú ESBL 2005-ben tapasztalt ugrásszerű emelkedése a *K. pneumoniae* izolátumokban összesen három, ciprofloxacin rezisztens stabil epidémiás klón elképesztően gyors (12 hónap) országos elterjedésének köszönhető. Érdeemes kiemelni, hogy az OEK-be 2005-ben beküldött ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumok 70%-a, valamint az általuk okozott nozokomiális véráram fertőzések 36%-ában az izolátumok a három epidémiás klón valamelyikéhez tartozott.

Az izolátumok többsége legalább négy antibiotikum csoporttal szemben mutatott rezisztenciát. A három epidémiás klón TK-iből izolált ESBL-gént kódoló plazmidokon több rezisztencia gént azonosítottunk: a *bla*_{CTX-M-15} mellett *bla*_{OXA-1}, *aac(6')*-*Ib-cr* és *aac(3)-II* géneket is. A gentamicin érzékeny HEC izolátumok plazmidjai ezutóbbi gént nem hordozták. A tetraciklin rezisztencia gének - *tet(A)* és *tet(C)* - kizárólag a HEC izolátumokból származó plazmidokon fordultak elő. Az egy plazmidon előforduló hasonló rezisztencia gén kombinációt az Angliában területen elterjedt CTX-M-15 termelő *E. coli* A és D törzsek plazmidjainál mutattak ki (Karisik és mtsai 2006)

Mindhárom epidémiás klón magas szintű ciprofloxacin rezisztenciát mutatott. A vizsgált izolátumok *gyrA* és *parC* gének QRDR-eiben többszörös mutációkat igazoltunk. A magas szintű kinolon rezisztencia eléréséhez a Gram-negatív baktériumoknál mindkét gén szimultán mutációi szükségesek, ami azonban hosszú, lépésről-lépésre kialakuló folyamat (Brisse és mtsai 1999, Deguchi és mtsai 1997,

Woodford és Ellington 2007). A felnőtt ápolási osztályokon, ahol igen magas a kinolonok használata, a kinolonokkal szemben rezisztens törzs egyértelmű szelekciós előnyhöz jut. Mivel azonban a magas szintű kinolon rezisztencia elérése igen hosszadalmas a baktérium szempontjából, ez viszonylag kevés egyednek fog sikerülni. A populáció adott körülmények között (kinolonok folyamatos jelenléte) ezen egyedek szaporodását fogja preferálni, ez pedig elvezethet egy stabil rezisztens klón kialakulásához. Az egyedszám növekedésével a rezisztens klón nagyobb valószínűséggel vehet fel olyan mobilis genetikai elemeket, amelyek további rezisztenciákat kódolnak (pl. plazmidon hordozott ESBL-kódoló géneket). Ez magyarázattal szolgálhat a három epidémiás klón kialakulására, gyors és hatékony terjedésére.

A fenti hipotézistől kissé eltérő magyarázatot fogalmaznak Hawkey és Jones (2009). Az *aac(6')-Ib* aminoglikozid rezisztencia gén egyik variánsa – az *aac(6')-Ib-cr* – kismértékben hidrolizálja a ciprofloxacint és a norfloxacint. Mivel ez a gén gyakran az ESBL-gént hordozó plazmidon lokalizálódik az adott izolátum bizonyos ideig védve van a kinolonoktól, amíg a szükséges mutációk kialakulásával eléri a magas szintű ciprofloxacin rezisztenciát. Ez a rezisztencia gén változat mindhárom epidémiás klónból izolált plazmidokon jelen volt, és a TK-kban is megemelte kismértékben a ciprofloxacin MIC értékét.

Az előbbieken bemutatott vizsgálatunknál megállapítottuk, hogy a PIC-kban SHV-termelő *Klebsiella spp.* által okozott járvány sorozatok allodémiás R-plazmidok széles körű, hatékony terjedésének következménye. Ezzel szemben a cefotaximázok – és főleg a CTX-M-15 – robbanásszerű országos terjedésének hátterében csak három epidémiás klón gyors és hatékony térhódítása áll, amelyek meglepően hasonló „rezisztencia felszereléssel” rendelkeznek.

A 2005-ben bejelentett *K. pneumoniae* törzsek által okozott járványok közül hatot a három epidémiás klón okozott. Ez a tény kiemeli a három klón jelentős epidemicitását (ld korábban) és különleges alkalmazkodását a kórházi környezethez. A 2005-2008 között lezajlott, az előzőekben bemutatott ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek által okozott járványokat Szilágyi és mtsai elemezték epidemiológiai módszerekkel. Arra kerestek magyarázatot, hogy a PIC-eken miért csak SHV-típusú ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek, a felnőtt ITO-okon pedig csak CTX-M-termelő *K. pneumoniae*

törzsek okoztak nozokomiális fertőzéseket. Feltételezték, hogy a kétféle osztálytípus teljesen szeparált (a betegeket és az ápoló személyzetet is beleértve), és eltérők az antibiotikum felhasználási szokások is. Mivel az SHV-típusú törzsekkel ellentétben, a CTX-M-termelő *K. pneumoniae* törzsek szinte mindig rezisztensek fluorokinolonokkal szemben, így az ITO-n a fluorokinolon használat elősegítheti a CTX-M-termelő törzsek terjedését. A CTX-M-termelő törzsek megjelenése előtt a ciprofloxacinnal érzékeny, SHV-típusú ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek csak sporadikusan fordultak elő felnőtt ITO-okon, azonban az itt alkalmazott fluorokinolonok szelekciós előnyt jelentettek a CTX-M-termelő törzsekre. (Szilágyi és mtsai 2010).

Az 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 évekig perzisztál és cirkulál hazánk egészségügyi intézményeiben a *Staphylococcus aureus* (MRSA versus MSSA) populációban lezajlott eseményekhez hasonlóan (Musser és mtsai 1992) konvergens evolúciós folyamatokat feltételez. Enright és mtsai (2002) 912 MRSA és MSSA törzset tartalmazó nemzetközi gyűjtemény multilokus szekvencia tipizálását elvégezték és megállapították, hogy a nagy interkontinentális MRSA klónok kisszámú, ökológiailag sikeres epidémiás elterjedésű MSSA klónokból alakultak ki methicillin rezisztencia gének többszöri felvételével.

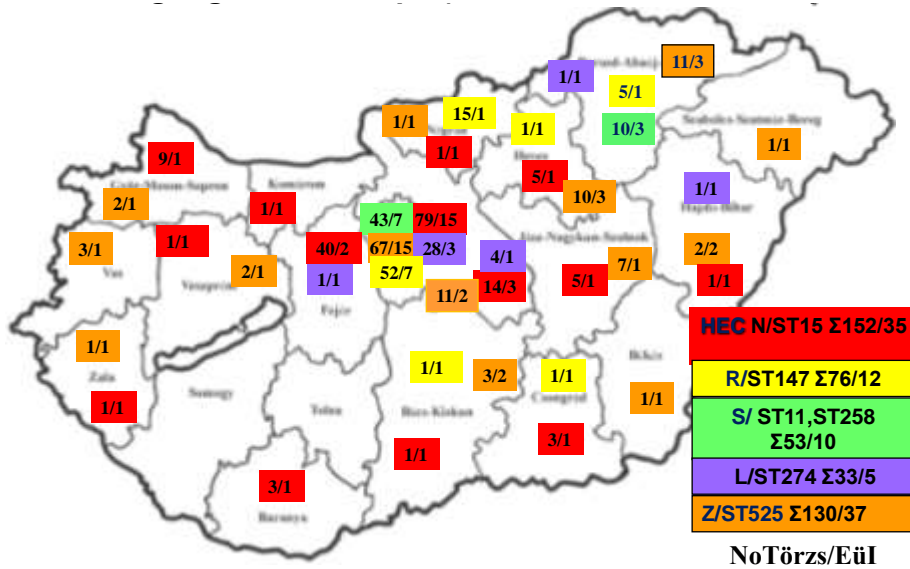
7.3. *Klebsiella* spp. nemzeti PFGE tipizáló adatbázis

Az elmúlt években számos nozokomiális járványból és halmazódásból, valamint sporadikus esetből származó több mint 1000 ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátum makrorestrikciós profilvizsgálatát (PFGE) végeztük el. Az adatbázisban felvett törzseket genetikai hasonlóságuk alapján betűvel, ill. 2008 óta species rövidítést és típuszámot tartalmazó PFGE típusokba soroltuk be. Ily módon az adatbázis komplex elemzésével nyomonkövethető egyes PFGE típusok – genetikai klónok - terjedése az ország egészségügyi intézményeiben évekre visszamenőleg, valamint új típusok megjelenése is.

Az adatbázis ezen kívül tartalmazza a törzsek azonosító adatait, minden epidemiológiai információt, ami rendelkezésünkre áll, valamint számos kiegészítő vizsgálat eredményeit is. A kiegészítő vizsgálatok magukban foglalhatják a fágtipizálást, a plazmidprofil meghatározást, a plazmid tipizálást, az ESBL-gén típusának, ill. más rezisztencia géntípusok meghatározását is. Választott törzsek esetében a szekvencia típust (MLST) is meghatározzuk, és a szekvencia alapú tipizálás eredményeit nemzetközi adatbázisokban is közzé tesszük.

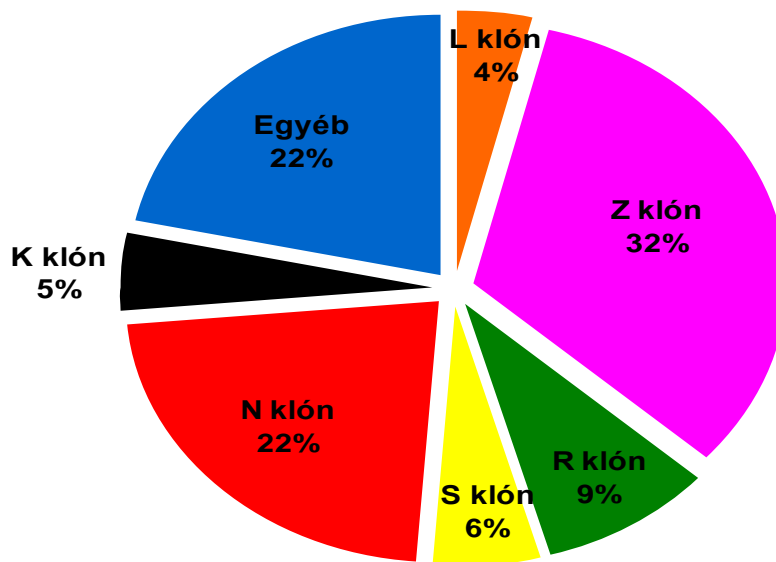
A 2006-óta tartó multirezisztens *K. pneumoniae* izolátumok molekuláris epidemiológiai vizsgálata igazolta a 2005-ben leírt három epidémiás klón genetikai stabilitását, továbbá széles körű elterjedését és epidemicitását (ld korábban) hazánk számos egészségügyi intézményében. 2005-2010 között összesen 444 izolátum tartozott a Magyarországon azonosított ciprofloxacín rezisztens főleg CTX-M-15-termelő *K. pneumoniae* epidémiás klónok valamelyikéhez (22. ábra). A 2010-es év végéig összesen 153, a HEC-hez tartozó (N/ST15) izolátumot azonosítottunk, melyeket 35 kórházból és egy házi orvosi rendelésről származó mintákból izoláltak. 12 intézményből származó 76 izolátum tartozott az R/ST147 epidémiás klónhoz, 10 kórházból származó 51 izolátum tartozott az S/ST11, ST258 epidémiás klónhoz és 130 izolátum 37 egészségügyi intézményből a Z/ST525 epidémiás klónhoz tartozott.

A 2006-ban egy Pest megyei kórházban azonosított Z/ST252 epidémiás klón négy év alatt dominánssá vált hazánkban, részben kiszorítva az N/ST15, az R/ST147 és az S/ST11 epidémiás klónokat.



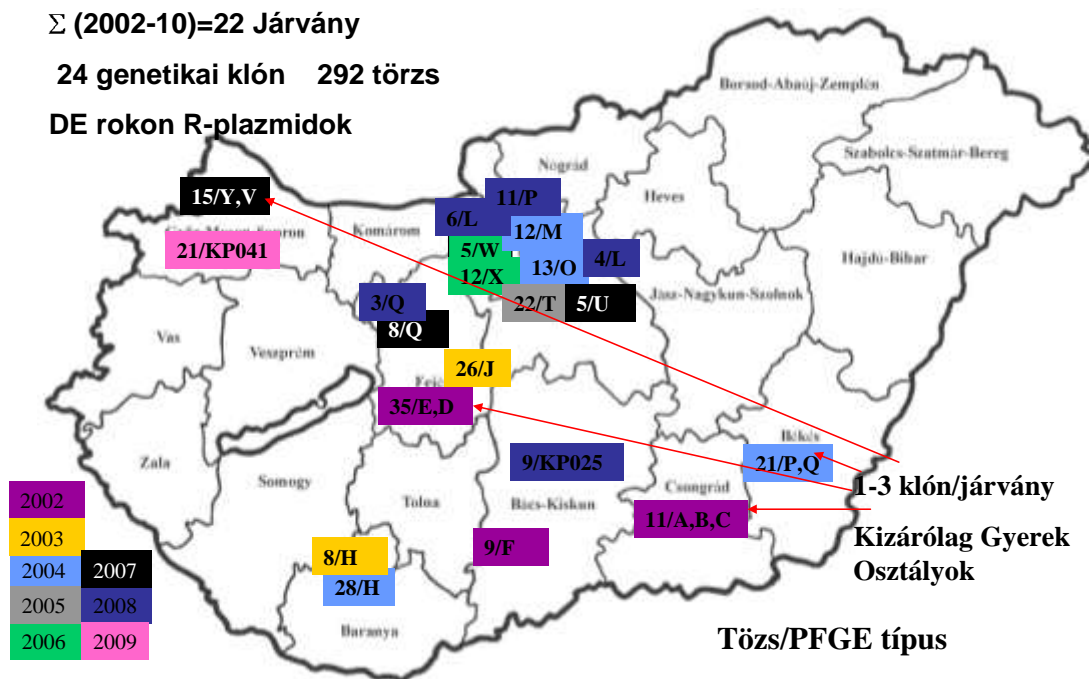
22. ábra *K. pneumoniae* multirezistens CTX-M-15-termelő epidémiás klónok filogeográfiai térképe a nemzeti tipizáló adatbázis adatai alapján (2005-2010, n=444)

2005-2010 összesített eredményei alapján az adatbázisban szereplő epidemiológiai adatok alapján az OEK-be beküldött az 5 epidémiás klón (N/ST15, S/ST11, R/ST147, L/ST274 és Z/ST525) 85%-át adta a felnőtt betegek invazív mintáiból származó izolátumoknak. A Z/ST525 epidémiás klónt az invazív mintákban 32%-ban azonosítottuk (23. ábra)



23. ábra ESBL+ *K.pneumoniae* epidémiás és endémiás klónok előfordulása invazív mintákban (n= 139, 2005-2010, felnőtt ápolási osztályok)

A 2004 és 2010 közötti időszakban a PIC-ből és csecsemő osztályokról származó ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumok jellemzése igazolta –a 2002-2003 időszakban végzett vizsgálatunkhoz hasonlóan –, hogy egy járványban egyetlen (ritkán kettő) genetikai klón vett részt, melyet általában sem korábban, sem később nem azonosítottunk más egészségügyi intézményben. Ezek a klónok rövid, „kérészetűnek” bizonyultak, azokat kizárólag egy járványból izolálták és nem perzisztáltak hosszabb ideig – hónapokig - az adott osztályon. Kivételt képeznek a Q, H és L klónok, amelyeket térben és időben többször azonosítottuk (24. ábra). A ciprofloxacin rezisztens Z/ST525 megjelenése egy PIC-ben 2009-ben bizonyítottan az első eset 2002 óta, amikor nem a „megszokott” SHV-termelő *K. pneumoniae* törzset azonosítottunk gyerek osztályon. Ez a klón 2010-ben egy második nozokomiális járványt is okozott egy másik PIC-ben. Hasonlóan aggodalomra ad okot a ciprofloxacin-rezisztens CTX-M-termelő KP046 PT is egy Fővárosi kórház koraszülött osztályán való megjelenése.



24. ábra 2002-2010 között izolált SHV-típusú ESBL-termelő *K. pneumoniae* járvány törzsek (n=292) filogeográfiai térképe.

7.4. CTX-M-15 vagy SHV-2a termelő *K. pneumoniae* L/ST274 epidémiás klón vizsgálata

A baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának számos típusát írták le. Az antibiotikum rezisztencia mechanizmusokat három fő csoportba lehet sorolni, attól függően, hogy a mikrobák milyen módon kerülnek el az antibiotikum hatását: i, antibiotikumot bontó/módosító enzim termelése (pl. β -laktamázok, aminoglikozid acetiltransferázok); ii, az antibiotikum célmolekulájának megváltoztatása (pl. DNS giráz, topoizomeráz megváltozása); iii, a célmolekulához való csökkent hozzáférés (pl. sejtfal áteresztőképességének megváltozása, porinvesztés, aktív efflux). Az antibiotikum rezisztencia megszerzése is többféle úton történhet: mutációkkal vagy rezisztencia gének felvételével (Mulvey és Simor 2009).

Hasonlóan a 2005-ben tapasztalt CTX-M-15-termelő *K. pneumoniae* epidémiás klónok megjelenéséhez és robbanászerű elterjedéséhez, egy újabb multirezisztens klón sikeres terjedését figyelhettük meg az ország több egészségügyi intézményében. A vizsgált klónhoz tartozó izolátumokban mindhárom típusú rezisztencia mechanizmus (antibiotikumot bontó/módosító enzim termelése; az antibiotikum célmolekulájának megváltoztatása; a célmolekulához való csökkent hozzáférés) előfordult (13. táblázat). A 3. generációs cefalosporinokkal és aminoglikozidokkal szemben különböző enzimek termelésével védekeztek, míg a ciprofloxacinnal szemben mindhárom típusú rezisztencia mechanizmus megjelent. A *gyrA* génben történt mutáció lehetett a rezisztencia kialakulásának első lépése, mely megemelte az antibiotikum MIC értékét (MIC: 0,5 mg/L a csecsemő osztályokról származó törzseknél). A *bla*_{CTXM-15} gént hordozó plazmidon található az *aac(6)-Ib-cr* gén is, amely által kódolt enzim képes kis mértékben bontani a kinolonokat, és ez a felnőtt osztályokról származó törzsek MIC értékét tovább emelte (MIC: 2 mg/L). Ezek az eredmények alátámasztják Hawkey és Jones hipotézisét a fluorokinolon rezisztencia kialakulásához (Hawkey és Jones 2009), miszerint plazmidon kódolt, bizonyos kinolonokat kis mértékben hidrolizáló enzimek az adott törzseket „megvédik”, amíg a magas szintű kinolon rezisztenciát eredményező kromozómális mutációk létrejönnek. A csecsemő osztályról származó K61/8 törzs esetében egy további rezisztencia mechanizmus is megjelent a GyrA mutáció mellett -

egy efflux pumpa hatása, mely magasabb szintű ciprofloxacinnal szembeni rezisztenciát eredményezett (MIC: 8 mg/L).

14. táblázat. Az L/ST274 epidémiás klónhoz köthető antibiotikum rezisztencia mechanizmusok

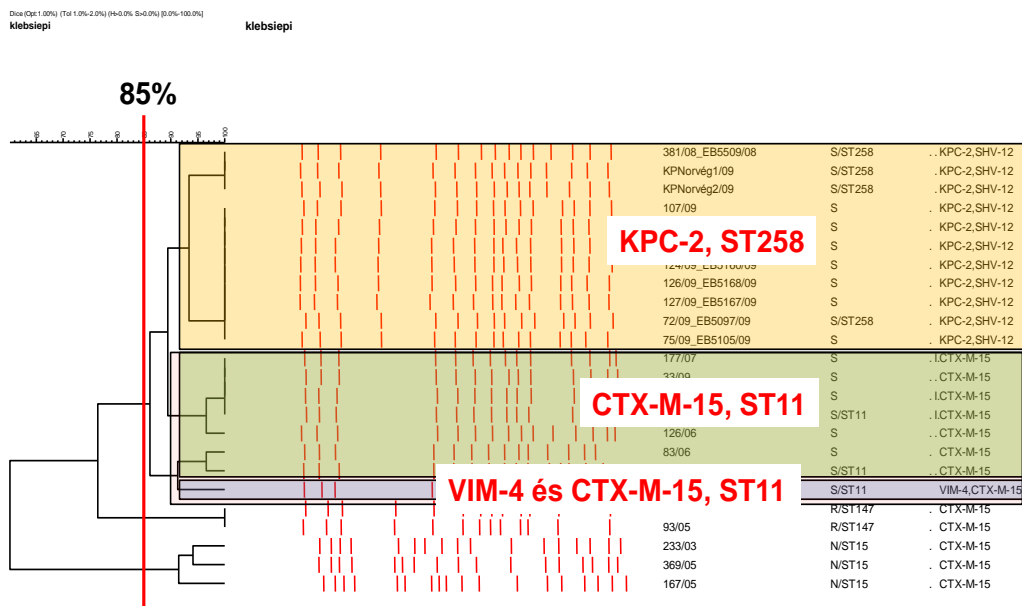
Mechanizmus	Molekuláris háttér	Érintett antibiotikum
I. Antib. inaktiváció		
I.a. β -laktamáz	CTX-M-15 SHV-2a	Cefalosporinok
I.b. Aminogl. inakt. enzimek	AAC(3)-II AAC(6')-Ib-cr	Gentamicin Amikacin+Kinolon
II. Target hely változás		
II.b.DNS giráz/topoizomeráz	GyrA: 83 Ser>Tyr	Ciprofloxacinnal, Levofloxacinnal
III. Csökkent hozzáférés a target helyhez		
III.b.Efflux pumpa	TetA,TetC ?	Tetracyclin Ciprofloxacinnal

Az ESBL-KP epidemiológiájával kapcsolatban a hazai tapasztalatok eddig azt mutatták, hogy a csecsemő és újszülött osztályokon döntően az egyes antibiotikum rezisztencia gének (poliklonális terjedés), míg felnőtt ápolási osztályokon a sikeres multirezisztens klónok terjedtek (monoklonális terjedés). Ebben a vizsgálatban egy olyan ESBL-termelő *K. pneumoniae* epidémiás klónt jellemeztünk (L klón, ST274), mely - a korábbiaktól eltérően - sikeresen terjedt el és okozott járványokat mind koraszülött, mind felnőtt osztályokon. Ehhez egy eddig ismeretlen stratégiát alkalmazva, a különböző kórházi osztályok környezetére jellemző, évekkel korábban azonosított és ismert epidémiás R-plazmidokat vett fel.

7.5. KPC-2-termelő *K. pneumoniae* S/ST258 klón vizsgálata

Az ST258 KPC-termelő klón megjelenése hazánkban várható volt, mivel Görögországban 2007-től a leggyakoribb karbapenemáz-termelő *K. pneumoniae* klón (Grundmann és mtsai, 2010). A különböző országokban leírt KPC-termelő ST258 izolátumok túlnyomó többsége érzékeny colistinre, amelynek használata újra előtérbe került súlyos betegek MDR vagy XDR Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzéseinek kezelésében (Li és mtsai 2006). Colistin rezisztens MDR *K. pneumoniae* törzsek megjelenésének okát Antoniadou és mtsai (2007) vizsgálták, és feltételezték, hogy a colistin rezisztencia a MDR *K. pneumoniae* törzsek körében a túlzott és nem megfelelő colistin használat szelekciós nyomására alakul ki. Ennek ellentmond, hogy a hazánkban kezelt betegeknél sem és az adott osztályokon sem alkalmaztak colistin kezelést, a colistin rezisztens törzsek mégis megjelentek.

A hazai és norvég KPC-termelő izolátumok, valamint a CTX-M-15 termelő S/ST11 hazai izolátumok (S pulstípus, epidémiás klón III (ECIII), 2005-2009) PFGE vizsgálatának eredménye igazolta, hogy 85%-os hasonlósági szinten mindegyik vizsgált izolátum azonos genotípus csoportba tartozott, melyet két fő alcsoportra lehetett osztani (25. ábra). Az S/ST11 közel öt éves hazai terjedése során meglepően homogén struktúrát mutatott –a makrorestrikciós profil vizsgálat eredményei szerint nagyobb méretű inszerciók vagy deleción események nem történtek. Ugyanilyen genetikai stabilitást lehet felfedezni az összes KPC-termelő ST258 izolátum esetében. A két norvég és az első magyar izolátum PFGE mintázata teljesen megegyezett annak ellenére, hogy az izolálások között több ezer kilométer földrajzi és egy év időbeli eltérés volt!

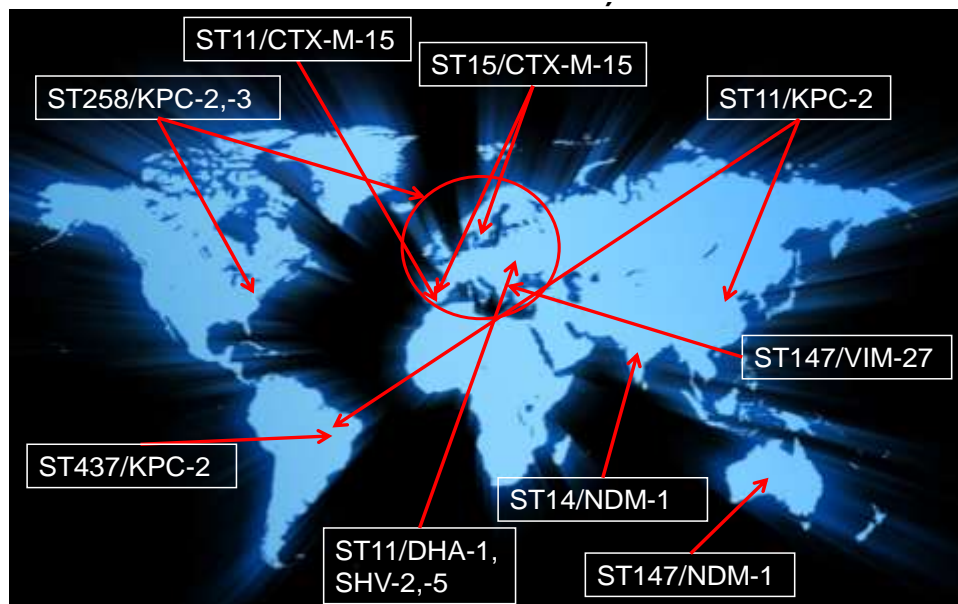


25. ábra KPC-2-, CTM-15- és VIM-4-termelő *K. pneumoniae* izolátumok makrorestrikciós profil vizsgálata (MRP) és szekvencia típusai (ST). Az összes izolátum az S PT-ba tartozik és a CC258/340 klonális komplexbe.

Az MLST adatbázis alapján Magyarországon történt első leírása után az ST11-t Koreában (Ko és mtsai 2010) és több Ázsiai országban (Lee és mtsai 2011) is azonosították. Az ST258-t, amely a hét vizsgált gén közül csak egyben tér el az ST11-től (SLV, Single Locus Variant), kimutatták Norvégiában, Svédországban (Samuelsen és mtsai 2009), Izraelben (Navon-Venezia és mtsai 2009), Görögországban (Grundmann és mtsai 2010), USA-ban (Kitchel és mtsai 2009), Lengyelországban (Baraniak és mtsai 2009) és Koreában (<http://www.pasteur.fr/mlst>). Tekintve, hogy az MLST alapján egy klonális komplexbe (clonal complex, CC) tartozónak tekintik azokat a törzseket, melyek szekvencia típusa maximum egy génben tér el az azonos csoportba tartozóktól, valamint a PFGE, az MLST tipizálás eredménye és az ST11 és ST258 törzsek SHV-11 hordozása alapján úgy tűnik ez az első azonosított hiperepidémiás klonális komplex a *K. pneumoniae* populációban, mely jelenleg a világ minden táján elterjedt. Mivel az MLST adatbázisban viszonylag kevés törzs adatai szerepelnek ezen klonális komplex nomenklatúrája/elnevezése még változhat. Ezt figyelembe véve a

CC258/340 jelölést javasoltuk. A legfrissebb közlések szerint 2011-ben azonosították az ST11 szekvencia típusba tartozó KPC-termelő *K. pneumoniae* klónt, mint domináns KPC-2 termelő klón Kínában (Qi és mtsai 2011), továbbá az ST437 (az ST11 SLV-a) szekvencia típusba tartozó KPC-termelő *K. pneumoniae* klónt, mint domináns KPC-2-termelő klón Braziliában (Andrade és mtsai 2011)(26. ábra).

Eredményeink - összhangban Samuelsen és mtsai (2009) megállapításával - arra utalnak, hogy az első hazai KPC-termelő *K. pneumoniae* valószínűleg Görögországból került Magyarországra, míg a további törzsek terjedésénél már helyi átvitel feltételezhető.



26. ábra Különböző rezisztencia géneket hordozó *K. pneumoniae* ST11 (SLV: ST340, ST258, ST437), ST15 (SLV: ST14) és ST147 epidémiás klónok azonosítása a világ számos országában a klónok magyarországi első leírása után.

7.6. VIM-4-termelő *K. pneumoniae* S/ST11 izolátum vizsgálata

A PFGE és az MLST eredményei egyöntetűen bebizonyították, hogy a KP3686 izolátum az S PT-ba és ST11 típusba tartozott. Ezt a típust 2005-ben azonosítottuk, mint országos elterjedésű CTX-M-15-termelő epidémiás klónt. Ennél az epidémiás klónnál, a többi magyar epidémiás klóntól eltérően, egy ~ 50 kb méretű, nem-konjugatív plazmid

hordozza a *bla*_{CTX-M-15} gént és mellette a *bla*_{TEM-1} gént is. Az ST11 szekvencia típushoz tartozó KP3686 izolátum esetén a *bla*_{CTX-M-15} gén szintén hasonló méretű plazmidon található. Az azonos szekvencia típus és a *bla*_{CTX-M-15} gént hordozó plazmid mintázata alapján valószínűsíthető, hogy a KP3686 izolátum esetében a ciprofloxacín rezisztens CTX-M-15-termelő S/ST11 epidémiás klón egy *bla*_{VIM-4} gént hordozó plazmid felvételével tovább növelte szelekciós esélyeit. Tudomásunk szerint a nemzetközi irodalomban ez az első közlés, ahol egy országosan elterjedt ESBL-termelő *K. pneumoniae* epidémiás klón bizonyíthatóan metallo- β -laktamáz gént hordozó integron felvételével még sikeresebb klónná vált, továbbá először írtuk le a hiperepidémiás klón VIM-termelését.

A VIM-termelő törzsek dinamikájának megértéséhez a molekuláris epidemiológiai vizsgálatok kulcs szerepet játszanak. A KP3686 izolátumban azonosított 1. osztályú integron kazetta szerkezete azonos volt Libisch és mtsai (2008a, 2008b) által *Pseudomonas aeruginosa* és *Aeromonas hydrophila* törzseknél leírt integronok szerkezetével. Ez a tény az integronok közös eredetére utalhat (Libisch és mtsai, 2008a; Libisch és mtsai, 2008b) és az *A. hydrophila* – mint környezeti baktérium – feltehetően jelentős szerepet játszik a rezisztencia gének horizontális átvitelében. Az *Aeromonas* fajok számos élőterben megtalálhatók (szennyvizek, tenger-, édesvizek), de humán fertőzéseket is okozhatnak (Libisch és mtsai 2008b; Libisch és mtsai, 2008c). Mivel a *bla*_{VIM} géneket hordozó integronok döntően konjugatív plazmidokon helyezkednek el, a rezisztencia terjedése nagyon gyors és hatékony lehet, akár több species között is.

7.7. DHA-1-termelő *K. pneumoniae* izolátumok vizsgálata

Annak ellenére, hogy az antibiotikum terápia szempontjából nem igazán fontos az AmpC-gének különböző elhelyezkedése (kromoszómálisan vagy plazmidon-kódoltak), az infekciókontroll és kórházhygiénés szempontból azonban jelentős különbség van. Míg a kromoszómális AmpC-túltermelő törzsek általában a terápia során mutációval alakulnak ki, és klonálisan terjedhetnek, addig a plazmidon-kódolt AmpC β -laktamázok mobilis genetikai elemeken kódolva horizontálisan is terjedhetnek, akár speciesek

között is, és döntően más rezisztencia géneket is kódoló plazmidokon lokalizálódnak (Jacoby 2009).

A DHA-1-termelő *K. pneumoniae* robbanásszerű terjedése Magyarországon a szemünk előtt zajlott le 12 hónap alatt. A terjedés folyamata az előző vizsgálatainkban tapasztaltakkal megegyezik: egyfelől a bla_{DHA-1} kódoló plazmidok a már megismert epidémiás klónok (S/ST11, Z/ST525) egy-egy izolátumában előfordultak és a horizontális génátvitelt bizonyítják, másfelől a KP053/ST11 azonosításával a klonális terjedést is figyelemmel kísérhettük. Az izolátumok egy része CTX-M-15 termelő is volt. A KP053/ST11 (97 izolátum, 13 egészségügyi intézmény) az első DHA-1-termelő országos elterjedésű epidémiás klón Magyarországon.

A nemzetközi publikációk szintén a bla_{DHA-1} gén kétirányú terjedési útjairól számolnak be. A Csehországban izolált DHA-1-termelő *K. pneumoniae* törzsek mindegyike – a Magyarorszgi klónhoz hasonlóan - az ST11 szekvencia típusba tartozott, egyes izolátumok SHV-5-típusú ESBL-t is termeltek (Empel és mtsai 2010, Chudácková és mtsai 2010). Ezzel szemben a Spanyolországban izolált 26 *K. pneumoniae* törzs viszont 8 különböző szekvencia típusba volt sorolható (ezek közül 3 törzs CTX-M-15-típusú ESBL-pozitív is volt, szekvencia típusuk ST326) (Diestra és mtsai 2010). Cuzon és mtsai, valamint Chudácková és mtsai olyan DHA-1-termelő *K. pneumoniae* izolátumokról számoltak be (ezek közül több ESBL-termelő is volt), melyeknél az OmpK36 porin elvesztése karbapenem rezisztenciát is okozott (Cuzon és mtsai 2010a, Chudácková és mtsai 2010).

8. Zárókövetkeztések, új eredmények

A kiterjedt-spektrumú β -laktamáz termelő *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-KP) törzsek világszerte a multirezisztens Gram-negatív baktériumok egyik legnagyobb csoportját alkotják. Ezek az oportunistá patogének felelősek az elsősorban intenzív terápiás osztályokon előforduló nozokomiális fertőzésekért és hatalmas kockázatot jelentenek az ezeken az osztályokon ápolat immunkompromittált betegeknek. Hatalmas járványkocó képességgel rendelkeznek, és jelentős forrásai a horizontálisan terjedő antibiotikum rezisztenciának.

A Nemzeti ESBL-termelő Gram-negatív kórokozók Nemzeti Referencia Laboratóriumának adatai alapján az 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.

Az ESBL-termelő *K. pneumoniae* epidemiológiájának megértéséhez, a populációban végbemenő változások nyomon követéséhez komplex molekuláris epidemiológiai vizsgálatokat végeztünk el.

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 lezajlott hét járványból származott. A hét járványból származó 126 izolátum 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 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 azonos allodémiás R-plazmidok gyors, hatékony és széles körű elterjedésének következménye. Megállapítottuk, hogy Magyarországon ebben az időszakban a *K. pneumoniae* populációban az SHV-típusú ESBL-gének poliklonális terjedést mutattak. Az azóta tartó monitorozás szintén ezt 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, 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 nozokomiális járványokat. A molekuláris epidemiológiai vizsgálatok eredményei alapján többségük HEC-hez tartozott (129 izolátum, 27 egészségügyi intézmény). A CTX-M-termelő izolátumok 2005-ben történt robbanásszerű terjedésében két további multirezisztens epidémiás klón is szerepet játszott – az R/ST147 (46 izolátum, 9 egészségügyi intézmény) és az S/ST11 (21 izolátum, 4 egészségügyi intézmény). Az epidémiás klónok rezisztenciájának hátterében igen hasonló mutációkat és rezisztencia gén hordozást állapítottuk meg. A három epidémiás klón 2005-ben öt nozokomiális járványt okozott. Világviszonylatban elsőként írtunk le térben és időben stabil multirezisztens genetikai klónokat a *K. pneumoniae* populációban és ennek bizonyítására először alkalmaztunk MLST-t. A közlemény megjelenése után a módszert a kutatók azonnal elkezdték alkalmazni *K. pneumoniae* izolátumok tipizálására, és az eltelt két év alatt megállapításaink beigazolódtak. Valóban léteznek olyan térben és időben stabil, a legveszélyesebb

rezisztencia mechanizmusokkal rendelkező epidémiás 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 és endémiás multirezisztens *K. pneumoniae* klónok folyamatos monitorozására felépítettük, és működtetjük a Nemzeti *K. pneumoniae* PFGE adatbázist. Az N/ST15 (152 izolátum, 35 egészségügyi intézmény), az R/ST147 (76 izolátum, 12 egészségügyi intézmény) és az S/ST11 (53 izolátum, 10 egészségügyi intézmény) mellett két további epidémiás klón kiszelektálódását és országos terjedését figyelhettük meg: a Z/ST525 (130 izolátum, 37 egészségügyi intézmény) és az L/ST274 (33 izolátum, 5 egészségügyi intézmény). A szintén ciprofloxacin rezisztens CTX-M-15-termelő Z/ST525 epidémiás klón országos térhódításának 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-termelők voltak, a felnőtt osztályokról származó izolátumoknál viszont CTX-M-15 típusú ESBL-termelést igazoltuk. Az L/ST274 epidémiás klón a különböző kórházi osztályok környezetére jellemző, évekkorábban azonosított és ismert allodémiás 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

A mobilis genetikai 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.

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 pulzotípus) 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 a világ minden táján elterjedt. Mivel az MLST adatbázisban még viszonylag kevés törzs adatai szerepelnek a klonális komplex nomenklatúrája/elnevezése még 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 hiperepidémiás klónhoz tartozott, és közel öt éves országos cirkulációja alatt feltehetően a környezetéből egy ismert integront vett fel, ezáltal tovább növelve szelekciós esélyeit. A nemzetközi irodalomban elsőként írtuk le az ST11 hiperepidémiás klón VIM-4 termelését.

9. Összefoglalás

A kiterjedt-spektrumú β -laktamáz (ESBL) termelő *Klebsiella pneumoniae* (KP) törzsek világszerte a multirezisztens Gram-negatív baktériumok egyik legnagyobb csoportját alkotják. Mint opportunistá patogének felelősek az elsősorban intenzív terápiás osztályokon előforduló nozokomiális fertőzésekért és komoly kockázatot jelentenek az ezeken az osztályokon ápolat immunkompromittált betegeknek. Hatalmas járványokozó képességgel rendelkeznek, és jelentős forrásai a horizontálisan terjedő antibiotikum rezisztenciának.

A Nemzeti ESBL-termelő Gram-negatív kórokozók Nemzeti Referencia Laboratóriumának adatai alapján az ESBL-termelő *K. pneumoniae* (ESBL-KP) a leggyakoribb ESBL-termelő patogén Magyarországon. A Nemzeti Bakteriológiai Surveillance alapján a hemokultúrákból izolált 3. gen. cephalosporin rezisztens KP 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.

Az ESBL-termelő *K. pneumoniae* epidemiológiájának megértéséhez, a populációban végbemenő változások nyomon követéséhez komplex molekuláris epidemiológiai vizsgálatokat végeztünk el.

A 2002-2010 között végzett vizsgálatok eredményei, valamint a Nemzeti *Klebsiella* PFGE Adatbázis elemzése alapján az ESBL gének kétirányú terjedése figyelhető meg a KP populációban Magyarországon. Az SHV-típusú ESBL-k országos jelenléte poliklonális, azonos vagy hasonló *bla*_{SHV-5} vagy *bla*_{SHV-2a} hordozó multirezisztens allodémiás R-plazmidok terjedésének következménye. Ezzel szemben a CTX-M-15 típusú ESBL-k szélekorú elterjedése monoklonális, csupán néhány multirezisztens epidémiás klón gyors és hatékony terjedésével és évekig tartó országos perzisztálásával magyarázható, melyek nagyon hasonló 'rezisztencia génkészlettel' rendelkeznek. Elsőként írtunk le térben és időben stabil multirezisztens genetikai klónokat (N/ST15, S/ST11, R/ST147) a *K. pneumoniae* populációban.

Magyarországon elsőként azonosítottunk karbapenemáz-termelő (KPC, VIM) izolátumokat. A KPC-2 termelő ST258 izolátumok, valamint a CTX-M-15 termelő ST11 hazai izolátumok azonos genotípus csoportba (S pulzotípus) tartoztak. Az

összesített eredmények alapján a *K. pneumoniae* populációban az első hiperepidémiás klonális komplexet, a CC258/340-t írtuk le. A VIM-4-termelő izolátum jellemzése alátámasztotta a KP populációra vonatkozó megfigyeléseinket, az izolátum az általunk először leírt sikeres interkontinentális elterjedésű S/ST11 hiperepidémiás klónhoz tartozott, amely közel öt éves országos cirkulációja alatt feltehetően a környezetéből egy ismert integront vett fel, ezáltal tovább növelve szelekciós esélyeit.

10. Summary

The extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-KP) constitute one of the most common Gram-negative bacteria showing multiple antibiotic resistance worldwide. These opportunistic pathogens are responsible for nosocomial infections primarily in intensive care units (ICUs) and pose a major risk especially to immunocompromised patients treated in these wards.

The ESBL-KP is the most important nosocomial pathogen in our country. According to data of National Bacteriological Surveillance (NBS) the proportion of 3rd generation cephalosporin-resistant KP from blood rose from 9% in 2003 to 49% in 2010. Additionally the proportion of combined fluoroquinolone and aminoglycoside resistant ESBL-KP became more than thirty-fold during the past eight years.

The main purpose of my work is understanding molecular epidemiology of 3rd generation cephalosporin resistant KP, monitoring and possible explanation of changes within ESBL-KP population in Hungary.

According to our National Typing Database, it was found that molecular epidemiology of nosocomial ESBL-KP substantially changed during the past eight years. Between 2002 and 2004 the predominant ESBL-type in Hungary proved SHV (-2a,-5) which was the consequence of polyclonal extensive and effective dissemination of similar allodemic R-plasmids causing nosocomial outbreaks in Neonatal Intensive Care Units throughout country. In 2005 a major shift in ESBL-type was observed among ESBL-KP nosocomial isolates in Hungary. It was found that the nationwide dissemination of cefotaximases and especially those of CTX-M-15 type is monoclonal and can be explained with the rapid and efficient expansion of a few multidrug resistant CTX-M-15-producing KP epidemic clones (ECs) with surprisingly similar 'resistance equipment'. We described for the first time in the international literature that there are spatially and temporally stable multidrug resistant KP-ECs (N/ST15, S/ST11, R/ST147) within KP population showed worldwide distribution and carried the most important resistance mechanisms.

We identified and characterized the first carbapenemase-producing (KPC and VIM) KP isolates in Hungary. The KPC-2-producing ST258 isolates and the CTX-M-15-producing ST11 Hungarian isolates belonged to the same genetic cluster (S PT).

Considering the overall results we described in the international literature the first hyperepidemic clonal complex in KP population and proposed the CC258/CC340 designation. Molecular epidemiological typing and genetic characterization of the VIM-4-producing isolate confirmed our observations on structure and dynamics of KP population. The isolate belonged to the intercontinental S/ST11 pandemic clone and during five years of its countrywide persistence acquired an previously described integron, probably from the environmental genetic pool. We described for the first time in the international literature the existence of an successful hyperepidemic clone - the ST11 - within KP population and its VIM-4-type MBL-production.

11. Irodalomjegyzék

1. Adegbola RA, Old DC. (1985) Fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins in *Enterobacter aerogenes*. J Med Microbiol, 19:35-43.
2. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. (2006) First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. Clin Microbiol Infect. 7:695-6.
3. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM. (2011) Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. Antimicrob Agents Chemother, 55:3579-83.
4. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, Kopterides P, Souli M, Armaganidis A, Giamarellou H. (2007) Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. J Antimicrob Chemother, 59:786-90.
5. Arlet G, Rouveau M, Casin I, Bouvet P J M, Lagrange PH, Philippon A. (1994) Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 β -lactamase and which were isolated in 14 french hospitals. J Clin Microbiol, 32:2553–2558.
6. Athamna A, Ofek I, Keisari Y, Markowitz S, Dutton GG, Sharon N. (1991) Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* mediated by

- surface lectins of guinea pig alveolar macrophages. *Infect Immun*, 59: 1673-1682
7. Aumeran C, Poincloux L, Souweine B, Robin F, Laurichesse H, Baud O, Bommelaer G, Traoré O. (2010) Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak after endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Endoscopy*. 42:895-9.
 8. Ayling-Smith B, Pitt TL. (1990). State of the art in typing: *Klebsiella* spp. *J Hosp Infect*. 16:287–295.
 9. Bach SA, de Almeida A, Carniel E. (2000). The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett*, 183:289-294
 10. Baerthlein K. (1918) Ueber bakterielle variabilitat insbesondere sogenannte Bakterienmutationem. *Zbl Bakteriol I Abt Orig*, 81:369-435
 11. Baquero F, Coque TM, Cantón R. (2002) Allodemics. *Lancet Infect Dis*. 2:591-2.
 12. Baraniak A, Fielt J, Sulikowska A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. (2002a) Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase-producing microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* in Poland. *Antimicrob Agents Chemother*, 46:151-9
 13. Baraniak A, Fielt J, Hryniewicz W, Nordmann P, Gniadkowski M (2002b) Ceftazidime-hydrolysing CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase (ESBL) in Poland. *J Antimicrob Chemother*, 50:393–396
 14. Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fielt J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Kern-Zdanowicz I, Filczak K, Łopaciuk U. (2009) Emergence of *Klebsiella*

- pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:4565-7.
15. Bauernfeind A. (1984) Epidemiological typing of *Klebsiella* by bacteriocins. *Methods Microbiol*, 16:213–224.
 16. Bauernfeind A. (1990) Perspectives of beta-lactamases inhibitors in therapy of infections caused by *Escherichia coli* or *Klebsiella* with plasmidic resistance to third generation cephalosporins. *Infection*, 18:48-52
 17. Bauernfeind A, Rosenthal E, Eberlein E, Holley M, Schweighart S. (1993) Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase among hospitalized patients. *Infection*, 21:18–22.
 18. Bedenic B, Randegger CC, Stobberingh E, Hachler H. (2001) Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Zagreb, Croatia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 20: 505–508.
 19. Ben-Hamouda T, Foulon T, Ben-Cheikh-Masmoudi A, Fendri C, Belhadj O, Ben-Mahrez K (2003) Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *J Med Microbiol.* 52:427-33.
 20. Bingen EH, Desjardins P, Arlet G, Bourgeois F, Marianikurdjian P, Lambertzechovsky NY, E. Denamur, A. Philippon, and J. Elion. (1993) Molecular epidemiology of plasmid spread among extended broad-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital. *J Clin Microbiol*, 31:179–184.
 21. Bingen E H, Denamur E, Elion J. (1994). Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clin Microbiol Rev*, 7: 311–327.

22. Birnboim HC, Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7:1513-23.
23. Bonnet R, Dutour C, Sampaio JLM, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Sirot J. (2001) Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240->Gly. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 2269–2275.
24. Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Sirot J. (2003) Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *J Antimicrob Chemother*, 52: 29–35.
25. Bonnet R (2004) Growing group of extended-spectrum β - lactamases: the CTX-M enzymes. Minireview. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1–14
26. Bradford PA. (2001) Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, 14: 933-951.
27. Braman SK, Eberhart RJ, Asbury MA, Hermann GJ. (1973) Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* associated with bovine mastitis. *J Am Vet Med Assoc*, 162:109-11
28. Brisse S, Milatovic D, Fluit AC, Verhoef J, Martin N, Scheuring S, Köhrer K, Schmitz FJ. (1999) Comparative in vitro activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, and *Enterobacter aerogenes* clinical isolates with alterations in GyrA and ParC proteins. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 2051-2055.

29. Brisse S, Milatovic D, Fluit AC, Verhoef J, Schmitz FJ. (2000) Epidemiology of quinolone resistance of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 19:64-8.
30. Brisse S, Grimont F, Grimont PAD. (2006) The genus *Klebsiella*. In: *The Prokaryotes*. Sixth Edition, Ed by Dworkin M. Springer Science New York 6:159-196
31. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, Grimont P. (2009) Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One* 4(3):e4982.
32. Brown C, Seidler RJ. (1973). Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Appl Microbiol*, 25:900–904.
33. Buffenmeyer CL, Rychek RR, Yee RB. (1976) Bacteriocin (klebocin) sensitivity typing of *Klebsiella*. *J Clin Microbiol*, 4:239–244.
34. Bullen JJ, Rogers H J, Griffiths E. (1978) Role of iron in bacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 80:1–35
35. Buré A, Legrand P, Arlet G, Jarlier V, Paul G, Philippon A. (1988) Dissemination in five French hospitals of *Klebsiella pneumoniae* serotype K25 harbouring a new transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins and aztreonam. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 7:780-782.
36. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. (1995) A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 1211–1233.

37. Canton R, Coque TM. (2006) The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*, 9: 466–75.
38. Canton R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. (2008) Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*, 14: S144–53.
39. Caplenas NR, Kanarek MS, Dufour AP. (1981) Source and extent of *Klebsiella pneumoniae* in the paper industry. *Appl Environ Microbiol*, 42:779-85.
40. Carle GF, Frank M, Olson MV. (1986) Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science*, 232:65-68
41. Carpenter JL. (1990) *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev Infect Dis*, 12:672-82.
42. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. (2008) Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(8): 2950-4.
43. Cartelle M, del Mar TM, Molina F, Moure R, Villanueva R, Bou G (2004) High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 2308–2313.
44. Castanheira M, Mendes RE, Rhomberg PR, Jones RN. (2008) Rapid emergence of *bla*_{CTX-M} among *Enterobacteriaceae* in U.S. Medical Centers: molecular evaluation from the MYSTIC Program. *Microb Drug Resist*, 14: 211–6.

45. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. (2009) *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrobial Agents Chemother*, 53: 603-8.
46. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM. (2002) Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother*, 46: 630–637.
47. Chang SC, Fang CT, Hsueh PR, Chen YC, Luh KT. (2000) *Klebsiella pneumoniae* isolates causing liver abscess in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 37:279-84
48. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanés C. (2001) SHV-1 β -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45:2856-2861.
49. Chelius MK, Triplett EW. (2000) Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays L.* *Appl Environ Microbiol*, 66:783-7.
50. Chmelnitsky I, Carmeli Y, Leavitt A, Schwaber MJ, Navon-Venezia S. (2005) CTX-M-2 and a new CTX-M-39 enzyme are the major extended-spectrum β -lactamases in multiple *Escherichia coli* clones isolated in Tel Aviv, Israel. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 4745-4750.
51. Chudácková E, Bergerová T, Fajfrlík K, Cervená D, Urbásková P, Empel J, Gniadkowski M, Hrabák J. (2010) Carbapenem-nonsusceptible strains of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 and/or DHA-1 beta-lactamases in a Czech hospital. *FEMS Microbiol Lett*, 309:62-70.

52. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement M100-S19. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
53. Combe ML, Pons JL, Sesboue R, Martin JP. (1994) Electrophoretic transfer from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: a new method to characterize multilocus enzyme genotypes of *Klebsiella* strains. *Appl Environ Microbiol*, 60:26–30.
54. Coovadia YM, Johnson AP, Bhana RH, Hutchinson G R, George RC, Hafferjee IE. (1992) Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal nursery: the importance of maintenance of infection control policies and procedures in the prevention of outbreaks. *J Hosp Infect* 22:197–205.
55. Coque TM, Oliver A, Pérez-Díaz JC, Baquero F, Cantón R. (2002) Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother*, 46:500-10.
56. Cowan ST, Steel KJ, Shaw C, Duguid JP. (1960) A classification of the *Klebsiella* group. *J Gen Microbiol*. 23:601-12.
57. Cryz Jr.SJ, Fürer E, Germanier R. (1984) Experimental *Klebsiella pneumoniae* burn wound sepsis: Role of capsular polysaccharide. *Infect Immun*, 37:327-335
58. Cryz Jr.SJ, Mortimer PM, Mansfield V, Germanier R. (1986) Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* bacteremic isolates and implications for vaccine development. *J Clin Microbiol*, 23:687-690.

59. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang TD, Nordmann P. (2008) Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing β -lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother*, 52:3463-4.
60. Cuzon G, Naas T, Guibert M, Nordmann P. (2010a) In vivo selection of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and plasmid-encoded DHA-1 cephalosporinase. *Int J Antimicrob Agents*, 35:265-8.
61. Cuzon G, Naas T, Lesenne A, Benhamou M, Nordmann P. (2010b) Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents*, 36:91-3.
62. Czirók Éva főszerkesztő: (1999) Klinikai és járványügyi bakteriológia. Kézikönyv., Melánia Kft, Budapest
63. Daly M, Fanning S. (2000) Characterization and chromosomal mapping of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Appl Environ Microbiol*, 66: 4842-4848.
64. Daoud Z, Hobeika E, Choucair A, Rohban R. (2008) Isolation of the first metallo-beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in Lebanon. *Rev Esp Quimioter*, 21:123-6.
65. Darfeuille-Michaud A, Jallat C, Aubel D, Sirot D, Rich C, Sirot J, Joly B. (1992) R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. *Infect Immun*, 60:44-55
66. Deguchi T, Fukuoka A, Yasuda M, Nakano M, Ozeki S, Kanematsu E, Nishino Y, Ishihara S, Ban Y, Kawada Y. (1997) Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-

- resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 699–701.
67. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. (2005) Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*, 43: 4178-4182.
68. Diestra K, Miró E, Martí C, Navarro D, Cuquet J, Coll P, Navarro F. (2010) Multiclonal epidemic of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing DHA-1 in a Spanish hospital. *Clin Microbiol Infect*. Jul 29.
69. Dijkshoorn L., K. J. Towner, M. Struelens (2001) New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Elsevier ISBN: 0-444-50740-x: 159-176.
70. Dillon RJ, Vennard CT, Charnley AK. (2002) A note: gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone. *J Appl Microbiol*, 92:759-63.
71. Di Martino P, Cafferini N, Joly B, Darfeuille-Michaud A. (2003) *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res Microbiol*, 154:9-16
72. Domenico P, Johanson WG, Straus DC. (1982) Lobar pneumonia in rats produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 37:327-335
73. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. (2001) Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51:925-32.

74. EARSS Management Team. (2010) Annual report 2009. <http://www.rivm.nl/earss/>
75. Eckert C, Gautier V, Saladin-Allard M, Hidri N, Verdet C, Ould-Hocine Z, Barnaud G, Delisle F, Rossier A, Lambert T, Philippon A, Arlet G. (2004) Dissemination of CTX-M-type β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 1249-1255.
76. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L (2003) Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, 47:3724–3732
77. Edmondson AS, Cooke EM. (1979) The development and assessment of a bacteriocin typing method for *Klebsiella*. *J Hyg Camb*, 82:207–233.
78. Edmondson AS, Cooke EM, Wilcock APD, Shinebaum R. (1980) A comparison of the properties of *Klebsiella* strains isolated from different sources. *J Med Microbiol*, 13:541–550.
79. Edwards PR. (1928) The relation of encapsulated bacilli found in metritis in mares to encapsulated bacilli from human sources. *J Bacteriol*, 15:245-266
80. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. (2007) Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*, 59:321-2.
81. Empel J, Hrabák J, Kozińska A, Bergerová T, Urbášková P, Kern-Zdanowicz I, Gniadkowski M. (2010) DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in the Czech Republic. *Microb Drug Resist*, 16:291-5.

82. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. (2002) The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(11):7687-92.
83. Fader RC, Gondesén K, Tolley B, Ritchie DG, Møller P. (1988) Evidence that in vitro adherence of *Klebsiella pneumoniae* to ciliated hamster tracheal cells is mediated by type 1 fimbriae. *Infect Immun*, 56:3011-3
84. Feldman C, Ross S, Mahomed AG, Omar J, Smith C. (1995) The aetiology of severe community-acquired pneumonia and its impact on initial, empiric, antimicrobial chemotherapy. *Respir Med*, 89:187-92
85. Ford PJ, Avison MB. (2004) Evolutionary mapping of the SHV β -lactamase and evidence for two separate IS26-dependent *bla*_{SHV} mobilization events from *Klebsiella pneumoniae* chromosome. *J Antimicrob Chemother*, 54: 69–75.
86. Fox JG, Rohovsky MW. (1975) Meningitis caused by *Klebsiella spp* in two rhesus monkeys. *J Am Vet Med Assoc*, 167:634-6.
87. Fuentes FA, Hazen TC, López-Torres AJ, Rechani P. (1985) *Klebsiella pneumoniae* in orange juice concentrate. *Appl Environ Microbiol*, 49:1527-9.
88. Fukigai S, Alba J, Kimura S, Iida T, Nishikura N, Ishii Y, Yamaguchi K. (2007) Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1 β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan. *Int J Antimicrob Agents*, 3:306-10.
89. Fung CP, Hu BS, Chang FY, Lee SC, Kuo BI, Ho M, Siu LK, Liu CY. (2000) A 5-year study of the seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae*: High prevalence of capsular serotype K1 in Taiwan and implication for vaccine efficacy. *J Infect Dis*, 181: 2075-2079

90. Gaillot O, Maruéjols C, Abachin E, Lecuru F, Arlet G, Simonet M, Berche P. (1998) Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. *J Clin Microbiol*, 36:1357-60.
91. Gastmeier P, Schwab F, Bärwolff S, Rüdén H, Grundmann H. (2006) Correlation between the genetic diversity of nosocomial pathogens and their survival time in intensive care unit. *J Hosp Infect*, 62:181-6.
92. 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*, 17:1254-61.
93. Gordon DM, FitzGibbon F (1999) The distribution of enteric bacteria from Australian mammals: host and geographical effects. *Microbiology*, 145:2663-71.
94. Gori A, Espinasse F, Deplano A, Nonhoff C, Nicolas MH, Struelens MJ. (1996) Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and randomly amplified DNA polymorphism analysis for typing extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*, 34:2448-53.
95. Gouby A, Neuwirth C, Bourg G, Bouziges N, Carlesnurit MJ, Despaux E, Ramuz M. (1994). Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital. *J Clin Microbiol*, 32: 301–305.
96. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Tóth Á, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y, the CNSE Working Group. (2010) Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Eurosurv*, 46. 2010. november 18.

97. Gruteke P, Goessens W, Van Gils J, Peerbooms P, Lemmens-Den Toom N, Van Santen-Verheuevel M, Van Belkum A, Verbrugh H. (2003) Patterns of resistance associated with integrons, the extended-spectrum β -lactamase SHV-5 gene, and a multidrug efflux pump of *Klebsiella pneumoniae* causing a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol*, 41: 1161-1166.
98. Guardabassi L, Dijkshoorn L, Collard Jm, Olsen Je, Dalsgaard A. (2000) Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol*, 49: 929-936.
99. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. (2007) *Clin Microbiol Infect*, 13 (Suppl. 3): 1-46
100. Gutmann L, Ferre B, Goldstein FW, Rizk N, Pinto-Schuster E, Acar JF, Collatz E. (1995) SHV-5, a novel SHV-type β -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. *Antimicrob Agents Chemother*, 33: 951-956.
101. Haeggman S, Löfdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S. (2004) Diversity and evolution of the class A chromosomal β -lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:2400-2408.
102. Hall FA. (1971) Bacteriocine typing of *Klebsiella spp.* *J Clin Pathol*, 24:712-716.
103. Hall BG, Barlow M. (2004) Evolution of the serine β -lactamases: past, present and future. *Drug Resist Updat*, 7: 111-123.
104. Hamon Y, Péron Y (1963) Individualisation de quelques nouvelles familles d'entérobactériocines. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences (Paris)* 257:309-311

105. Hansen DS, Mestre F, Alberti S, Hernandez-Alles S, Alvarez D, Domenech-Sanchez A, Gil J, Merino S, Tomas JM, Benedi VJ. (1999) *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: Revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *J Clin Microbiol*, 37:56-62
106. Hartstein AI, Morthland VH, Rourke JW, Sykes R, Rashad AL. (1993) Plasmid DNA analysis, biotyping, and antimicrobial susceptibility as subtyping tests for *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 16:35–41.
107. Hawkey PM. (2008) Prevalence and clonality of extended-spectrum β -lactamases in Asia. *Clin Microbiol Infect*, 14 (Suppl. 1): 159–165.
108. Hawkey PM, Jones AM. (2009) The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother*, 64 (Suppl 1): i3-i10.
109. Herson DS, McGonigle B, Payer MA, Baker KH. (1987) Attachment as a factor in the protection of *Enterobacter cloacae* from chlorination. *Appl Environ Microbiol*, 53: 1178–1180.
110. Hornick DB, Allen BL, Horn MA, Clegg S. (1992) Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infect Immun*, 60:1577-88.
111. Hornick DB, Thommandru J, Smits W, Clegg S. (1995) Adherence properties of an mrkD-negative mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 63:2026-32
112. Huang WM. (1996) Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annu Rev Genet*, 30:79-107.

113. Ishida T, Hashimoto T, Arita M, Ito I, Osawa M. (1998) Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients: a 3-year prospective study in Japan. *Chest*, 114:1588-1593.
114. Jacoby GA. (2005) Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*, 41:120-6.
115. Jacoby GA. (2009) AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 22: 161-182.
116. Jong GM, Hsiue TR, Chen CR, Chang HY, Chen CW. (1995) Rapidly fatal outcome of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in alcoholics. *Chest*, 107:214-7.
117. Kado CI, Liu ST. (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol*, 145: 1365–1373.
118. Kauffmann F. (1949) On the serology of the *Klebsiella* group. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 26:381-406
119. Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P. (2001) Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*. *FEMS Microbiol Lett*, 201: 237–241.
120. Karisik E, Ellington MJ, Pike R, Warren RE, Livermore DM, Woodford N. (2006) Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 β -lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*, 58: 665-668.
121. Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A, Michael GB, Schwarz S. (2006) Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J Antimicrob Chemother*, 58:18-22

122. Kim J, Shin HS, Seol SY, Cho DT. (2002) Relationship between *bla*_{SHV-12} and *bla*_{SHV-2a} in Korea. *J Antimicrob Chemother*, 49: 261-267.
123. Kinkler RJ Jr, Wagner JE, Doyle RE, Owens DR. (1976) Bacterial mastitis in guinea pigs. *Lab Anim Sci*, 26:214-7.
124. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. (2009) Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother*, 53:3365-3370.
125. Khimji PL, Miles AA. (1978) Microbial iron-chelators and their action on *Klebsiella* infections in the skin of guinea-pigs. *Br J Exp Pathol*, 59:137–147.122.
126. Knittel MD, Seidler RJ, Eby C, Cabe LM. (1977) Colonization of the botanical environment by *Klebsiella* isolates of pathogenic origin. *Appl Environ Microbiol*, 34:557-63.
127. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. (1983) Transferable resistance to cefotaxime, ceftaxime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11:315-7.
128. Ko KS, Lee JY, Baek JY, Suh JY, Lee MY, Choi JY, Yeom JS, Kim YS, Jung SI, Shin SY, Heo ST, Kwon KT, Son JS, Kim SW, Chang HH, Ki HK, Chung DR, Peck KR, Song JH. (2010) Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *J Med Microbiol*, 59:822-8
129. Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, McCormack JG, Yu VL. (2002) Community-acquired *Klebsiella*

- pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis*, 8:160-6.
130. Koczura R, Kaznowski A. (2002) Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Pathogen*, 35 197-202
131. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. (1994) The *Enterobacteriaceae*. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Introduction to diagnostic microbiology*. Philadelphia: J.B. Lippincott, p. 63.
132. Kristóf K, Szabó D, Marsh JW, Cser V, Janik L, Rozgonyi F, Nobilis A, Nagy K, Paterson DL. (2007) Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella* spp. in a neonatal intensive care unit: risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 26: 563-570.
133. Krone WJA, Königstein G, de Graaf FK, Oudega B. (1985) Plasmid-determined clacin DF13-susceptibility in *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella edwardsii*. Identification of the cloacin DF13/aerobactin outer membrane receptor proteins. *Ant v Leeweunhoek*, 51: 203-218
134. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. (2010) Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 10:597-602.

135. Langstraat J, Bohse M, Clegg S. (2001) Type 3 fimbrial shaft (MrkD) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infect Immun*, 69:5805-5812
136. Lartigue MF, Poirel L, Nordmann P. (2004) Diversity of genetic environment of *bla*_{CTX-M} genes. *FEMS Microbiol Letter*, 234: 201-207.
137. Lebessi E, Dellagrammaticas H, Tassios PT, Tzouveleakis LS, Ioannidou S, Foustoukou M, Legakis NJ. (2002) Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit in the high-prevalence area of Athens, Greece. *J Clin Microbiol*, 40:799-804.
138. Lee YH, Cho B, Bae IK, Chang CL, Jeong SH. (2006) *Klebsiella pneumoniae* strains carrying the chromosomal SHV-11 β -lactamase gene produce the plasmid-mediated SHV-12 extended-spectrum β -lactamase more frequently than those carrying the chromosomal SHV-1 β -lactamase gene. *J Antimicrob Chemother*, 57:1259-61.
139. Lee MY, Ko KS, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Song JH. (2011) High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *Int J Antimicrob Agents*, 38:160-3.
140. Leflon-Guibout V, Jurand C, Bonacorsi S, Espinasse F, Guelfi MC, Duportail F et al (2004) Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:3736–3742
141. Levast M, Poirel L, Carrer A, Deiber M, Decroisette E, Mallaval FO, Lecomte C, Nordmann P. (2011) Transfer of OXA-48-positive carbapenem-

- resistant *Klebsiella pneumoniae* from Turkey to France. J Antimicrob Chemother, 66:944-5
142. Lhopital S, Bonacorsi S, Meis D, Brahimi N, Mathy S, Navarro J, Aigrain Y, Bingen E. (1997) Molecular markers for differentiation of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 18:743-8.
143. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL. (2006) Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet Infect Dis, 6:589-601.
144. Liam CK, Lim KH, Wong CM. (2001) Community-acquired pneumonia in patients requiring hospitalization. Respirology, 6:259-264.
145. Libisch B, Gacs M, Csiszár K, Muzslay M, Rókusz L, Füzi M. (2004): Isolation of an integron-borne blaVIM-4 type metallo- β -lactamase gene from a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Hungary. Antimicrob Agents Chemother. 48(9):3576-8.
146. Libisch B, Watine J, Balogh B, Gacs M, Muzslay M, Szabó G, Füzi M. (2008a) Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary. Res Microbiol, 159:162-8
147. Libisch B, Giske CG, Kovács B, Tóth TG, Füzi M. (2008b): Identification of the first VIM metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. J Clin Microbiol, 46:1878-80.
148. Libisch B., Balogh B., Füzi M. (2008c) „A mobilis genetikai elemek szerepe az antibiotikum rezisztencia terjedésében” c. DRESP FP6 projekt

keretében az Országos Epidemiológiai Központban végzett vizsgálatok eddigi eredményei. Mikrobiológiai Körlevél, VIII évfolyam, 3. szám

149. Line AM, Loutit WM. (1971) Non-symbiotic nitrogen-fixing organisms from some New-Zealand Tussock-grassland soil. *J Gen Microbiol*, 66: 309-318
150. Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. (2005) First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol*, 43:516-9.
151. Livermore DM. (1995) β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*, 8: 557-584.
152. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*, 59: 165-174.
153. Liu W, Chen L, Li H et al. (2009) Novel CTX-M β -lactamase genotype distribution and spread into multiple species of *Enterobacteriaceae* in Changsha, Southern China. *J Antimicrob Chemother*; 63:895–900.
154. Luzzaro F, Docquier JD, Colinon C, Endimiani A, Lombardi G, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. (2004) Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:648-50
155. Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers DJ, McCowen SM. (1978) A multiple plasmidcontaining *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid*, 1: 417–420.

156. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 3140–3145.
157. Martin CM, Ikari NS, Zimmerman J, Waitz JA. (1971) A virulent nosocomial *Klebsiella* with a transferable R factor for gentamicin: emergence and suppression. *J Infect Dis*, 124(Suppl.):S24–S29.
158. Martínez JL, Baquero F. (2002) Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*. 15:647-79.
159. Maslow JN, Brecher SM, Adams KS, Durbin A, Loring S, Arbeit RD. (1993) Relationship between indole production and differentiation of *Klebsiella* species: indole-positive and -negative isolates of *Klebsiella* determined to be clonal. *J Clin Microbiol*, 31:2000-3.
160. Matar GM, Dandache I, Carrër A, Khairallah MT, Nordmann P, Sabra A, Araj GF. (2010) Spread of OXA-48-mediated resistance to carbapenems in Lebanese *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* that produce extended spectrum β -lactamase. *Ann Trop Med Parasitol*, 104:271-4.
161. Matsen JM, Spindler JA, Blosser RO. (1974) Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. *Appl. Microbiol*, 28:672–678.
162. Mayer LW. (1988) Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*, 1:228-43.

163. Medeiros AA. (1993) Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria—extended-spectrum β -lactamases have arrived in North America. *Ann Intern Med*, 119:428–430.
164. Merino S, Altarriba M, Izquierdo L, Nogueras MM, Regué M, Tomás JM. (2000) Cloning and sequencing of the *Klebsiella pneumoniae* O5 wb gene cluster and its role in pathogenesis. *Infect Immun* 68:2435-40.
165. Meyer KS, Urban C, Eagan JA, Berger BJ, Rahal JJ. (1993) Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann Intern Med*, 119:353-8.
166. Milch H, Deak S. (1964-1965) Studies on *Klebsiella* infections by phage detection and phage typing. *Acta Microbiol Acad Sci Hung*, 11: 251-61.
167. Milch H, Deak S. (1966) Phage typing of *Klebsiella* strains. *Annales Immunol Hung*, 8: 143-150.
168. Milch H, Deak S. (1968) Phage sensitivity and lysogenity of *Klebsiella* strains. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 16: 288-94.
169. Miller GH, Sabatelli FJ, Hare RS, Glupczynski Y, Mackey P, Shlaes D, Shimizu K, Shaw KJ. (1997) The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms—changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? *Clin Infect Dis*, 24(Suppl. 1):S46-S62
170. Mizuta LG, Ohta M, Mori M, Hasegawa T, Nakashima I. (1983) Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: Relationship to their capsular (K) types. *Infect Immun*, 40:56-61
171. Monnet DL, Biddle JW, Edwards JR, Culver DH, Tolson JS, Martone WJ, Tenover FC, Gaynes RP. (1997) Evidence of interhospital transmission of extended-spectrum β -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United

- States, 1986 to 1993. The National Nosocomial Infections Surveillance System. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 18:492-8.
172. Montgomerie JZ, John JF, Atkins LM, Gilmore DS, Ashley MA. (1993) Increased frequency of large R-plasmids in *Klebsiella pneumoniae* colonizing patients with spinal cord injury. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 16:25–29.
173. Mulvey MR, Simor AE. (2009) Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? *CMAJ*, 180: 409-415
174. Musser JM, Kapur V. (1992) Clonal analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J Clin Microbiol*, 30: 2058–2063.
175. Nagy E, Prágai Z, Koczián Z, Hajdú E, Fodor E. (1998) Investigation of the presence of different broad-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 45: 433–446.
176. Nassif X, Sansonetti PJ. (1986) Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect Immun*, 54:603-608
177. Nassif X, Honoré N, Vasselon T, Cole ST, Sansonetti PJ. (1989). Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Molec Microbiol*, 3:1349-1359
178. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, Carmeli Y; Israeli KPC Kpn Study Group. (2009) First report on a hyperendemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel

- genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 53:818-20.
179. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR. (2008) Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*, 61: 273-281.
180. Niederman MS. (2001) Impact of antibiotic resistance on clinical outcomes and the cost of care. *Crit Care Med*, 29:114–120.
181. Noriega ER, Leibowitz RE, Richmond AS, Rubinstein E, Schaefer S, Simberkoff MS, Rahal JJ. (1975) Nosocomial infection caused by gentamicin-resistant, streptomycin-sensitive *Klebsiella*. *J Infect Dis*, 131(Suppl):S45–S50.
182. Nouvellon M, Pons JL, Sirot D, Combe ML, Lemeland JF. (1994) Clonal outbreaks of extended-spectrum β -lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* demonstrated by antibiotic susceptibility testing, β -lactamase typing, and multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 32:2625–2627.
183. Nunez WJ, Colmer AR. (1968) Differentiation of *Aerobacter-Klebsiella* isolated from sugarcane. *Appl Microbiol*, 16:1875-81.
184. Nüesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hächler H. (1997) Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 943–949.
185. Ofek I, Kabha K, Athamna A, Frankel G, Wozniak DJ, Hasty DL, Ohman DE. (1993) Genetic exchange of determinants for capsular polysaccharide biosynthesis between *Klebsiella pneumoniae* strains expressing serotypes K2 and K21a. *Infect Immun*, 61:4208-4216

186. Ofek I, Doyle RJ. 1994. Bacterial adhesion to cells and tissues. Chapman & Hall, Ltd., London, United Kingdom.
187. Ofek I, Goldhar J, Keisari Y, Sharon N. (1995) Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol*, 49:239-76.
188. Olive MD, Bean P. (1999) Principles and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms.. *J Clin Microbiol*, 37:1661.
189. Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, Daneman N, Mulvey MR. (2005) Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extend-spectrum β -lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 2112–2115.
190. Ørskov I and Fife-Asbury MA. (1977) New *Klebsiella* antigen, K82, and the deletion of five of those previously assigned. *Int J SystBacteriol*, 27:386–387.
191. Ørskov I and Ørskov F. (1984) Serotyping of *Klebsiella*. *Methods Microbiol*, 14:143–164
192. Over U, Gur D, Unal S, Miller GH. (2001) The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. *Clin Microbiol Infect*, 7:470-478
193. Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa H, Gotuzzo E, Kronvall G, Paradisi F, Rossolini GM. (2007) Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum β -lactamase genes in commensal *Escherichia coli* from healthy children from low-resource settings of Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 2720–2725.

194. Palus JA, Borneman J, Ludden PW, Triplett EW. (1996) A diazotrophic bacterial endophyte isolated from stems of *Zea mays* L. and *Zea luxurians* Itlis and Dobley. *Plant Soil*, 186: 135-142
195. Paterson DL, Bonomo RA. (2005) Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 18: 657-686.
196. Pedersen WL, Chakrabarty K, Klucas RV, Vidaver AK. (1978) Nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with roots of winter wheat and sorghum in Nebraska. *Appl Environ Microbiol*, 35:129-35.
197. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW (2005) Dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP-4} among Gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis*, 41:1549-56..
198. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 40: 2153-2162.
199. Perichon B, Courvalin P, Galimand M. (2007) Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemother*, 51: 2464-2469.
200. Perilli M, Dell'Amico E, Segatore B, de Massis MR, Bianchi C, Luzzaro F, Rossolini GM, Toniolo A, Nicoletti G, Amicosante G. (2002) Molecular characterization of extended- spectrum β -lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from Italian Nationwide Survey. *J Clin Microbiol*, 40: 611–614.

201. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. (2010): Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, 300:371-379.
202. Philippon A, Labia R, Jacoby G. (1989) Extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 33: 1131-6.
203. Platt H, Atherton JG, Orskov I. (1976) *Klebsiella* and *Enterobacter* organisms isolated from horses. *J Hyg (Lond)*, 77:401-8.
204. Podbieski A, Schönling J, Melzer B, Warnatz K, Leusch HG. (1991) Molecular characterization of a new plasmid-encoded SHV-types β -lactamase (SHV-2 variant) conferring high-level cefotaxime resistance upon *Klebsiella pneumoniae*. *J Gen Microbiol*, 137: 569–578.
205. Podschun R, Heineken P, Ullmann U, Sonntag HG. (1986) Comparative investigations of *Klebsiella* species of clinical origin: plasmid patterns, biochemical reactions, antibiotic resistances and serotypes. *Zentbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Ser*, 262:335–345.
206. Podschun R. (1990) Phenotypic properties of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. *Zentbl Hyg Umweltmed*, 189: 527–535.
207. Podschun R, Sahly H. (1991) Hemagglutinins of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, 191:46-52.
208. Podschun R, Ullmann U. (1992) *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J Med Microbiol*, 36:250-254.

209. Poh CL, Yap SC, Yeo M. (1993). Pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae*. J Hosp Infect, 24:123–128.
210. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. (2002) Biochemical analysis of the ceftazidime hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. J Antimicrob Chemother, 50: 1031–1034.
211. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. (2004) Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 48:15-22.
212. Poirel L, Naas T, Nordmann P. (2008) Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. Clin Microbiol Infect, 14 (Suppl. 1): 75–81.
213. Prágai Z, Koczián Z, and Nagy E. (1998) Characterization of the extended-spectrum β -lactamases and determination of the antibiotic susceptibilities of *Klebsiella pneumoniae* isolates in Hungary. J Antimicrob Chemother, 42: 401–403.
214. Prodinger WM, Fille M, Bauernfeind A, Stemplinger I, Amann S, Pfausler B, Lass-Florl C, Dierich MP. (1996) Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 β -lactamase: parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. J Clin Microbiol, 34:564–8.
215. Przondo-Hessek A. (1966). Bacteriophages of *Klebsiella* bacilli. Isolation properties and use in typing. Arch Immunol Ther Exp, 14: 413–435.
216. Przondo Hessek A, Pulverer G. (1983) Hemagglutinins of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg, 255: 472-8.

217. Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. (2011) ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother*, 66:307-12.
218. Queenan AM, Bush K. (2007): Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 20: 440-58.
219. Quinn JP. (1998) Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis*, 27: S117–S124.
220. Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang X, Wattal C, Dowzicky MJ. (2007) Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother*, 60:1018-29.
221. Reish O, Ashkenazi S, Naor N, Samra Z, Merlob P. (1993) An outbreak of multiresistant *Klebsiella* in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect*, 25:287–291.
222. Rennie RP, Duncan IBR. (1974). Combined biochemical and serological typing of clinical isolates of *Klebsiella*. *Appl Microbiol*, 28:534–539.
223. Rennie RJ. (1982) Isolation and identification of N_2 –fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum sp.*). *Can J Microbiol*, 28: 462-467
224. Roberts DE, McClain HM, Hansen DS, Currin P, Howerth EW. (2000) An outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection in dogs with severe enteritis and septicemia. *J Vet Diagn Invest*, 12:168-73.
225. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. (2006a)The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis*, 6:629-40.

226. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. (2006b) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*, 12:83-8.
227. Rodriguez MM, Power P, Radice M, Vay C, Famiglietti A, Galleni M, Ayala JA, Gutkind G. (2004) Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 4895–4897.
228. Rubin SJ. (1985) *Klebsiella* marker systems. *Infect Control*, 6:59–63.
229. Sader HS, Jones RN, Gales AC, Winokur P, Kugler KC, Pfaller MA, Doern GV. (1998) Antimicrobial susceptibility patterns for pathogens isolated from patients in Latin American medical centers with a diagnosis of pneumonia: analysis of results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997). SENTRY Latin America Study Group. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 32:289-301.
230. Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, Sundsfjord A, Giske CG. (2009) Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother*, 63:654-658
231. Sechi LA, Spanu T, Sanguinetti M, Duprè I, Masucci L, Siddu A, Tortorolo G, Vento G, Maggio L, Cambieri A, Zanetti S, Fadda G. (2001) Molecular analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in pediatric wards by ribotyping, pulsed field gel electrophoresis and antimicrobial susceptibilities. *New Microbiol*, 24:35-45.

232. Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. (2004) Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Res Microbiol*, 155:409-421
233. Shannon K, Fung K, Stapleton P, Anthony R, Power E, French G. (1998) A hospital outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* investigated by RAPD typing and analysis of the genetics and mechanisms of resistance. *J Hosp Infect*. 39:291-300
234. Shin KS, Son BR, Hong SB, Kim J. (2008) Dipicolinic acid-based disk methods for detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 62:102–105
235. Simoons-Smit AM, Verweij-van Vught AMJJ, Kanis IYR, MacLaren DM. (1984) Virulence of *Klebsiella* strains in experimentally induced skin lesions in the mouse. *J Med Microbiol*, 17:67-77
236. Simoons-Smit AM, Verweij-van Vught AMJJ, Kanis IYR, MacLaren DM. (1985) Biochemical and serological investigations on clinical isolates of klebsiella. *J Hyg Camb*, 95:265–276.
237. Slopek S, Przondo-Hessek A, Milch H, Deak S. (1967) A working scheme for bacteriophage typing of *Klebsiella* bacilli. *Arch Immunol Ther Exp*, 15:589–599.
238. Slopek S. (1978) Phage typing of *Klebsiella*. *Methods Microbiol*. **11**:193–222.
239. Souli M, Galani I, Giamarellou H. (2008) Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill*. 13(47). pii: 19045.

240. Strahilevitz J, Engelstein D, Adler A, Temper V, Moses AE, Block C, Robicsek A. (2007) Changes in qnr prevalence and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter spp.* collected from 1990 to 2005. *Antimicrobial Agents Chemother*, 51: 3001-3003.
241. Straus DC, Atkisson DL, Garner CW. (1985) Importance of lipopolysaccharide-containing extracellular toxic complex in infections produced by *klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 50:787-795
242. Struelens, M. (2001) Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing. In „New approaches for the generation and analysis of microbial typing data”. Elsevier
243. Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, Santos O'Connor F, Giesecke J, European NDM-1 Survey Participants (2010) New Delhi metallo- β -lactamase 1-producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. *Euro Surveill*, 15(46).
244. Stürenburg E, Mack D. (2003) Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J Infect*, 47: 273-295.
245. Szabó D, Filetóth Z, Szentandrassy J, Némedi M, Tóth E, Jeney Cs, Kispál Gy, Rozgonyi F. (1999) Molecular epidemiology of a cluster of cases due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase in the premature intensive care unit of a Hungarian hospital. *J Clin Microbiol*, 37: 4167– 4169.
246. Swartz DC, Saffran W, Welsh J, Haas R, Goldenberg M, Cantor CR. (1983). New techniques for purifying large DNA's and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harbor symp. Quant Biol* 47:189-195

247. Takahashi M, Yoshida K, San Clemente CL. (1977) Relation of colonial morphologies in soft agar to morphological and biological properties of the K-9 strain of *Klebsiella pneumoniae* and its variants. *Can J Microbiol*, 23:448-451
248. Tarkkanen AM, Allen BL, Westerlund B, Holthöfer H, Kuusela P, Risteli L, Clegg S, Korhonen TK. (1990) Type V collagen as the target for type-3 fimbriae, enterobacterial adherence organelles. *Mol Microbiol*, 4:1353-61
249. Tarkkanen AM, Virkola R, Clegg S, Korhonen TK. (1997) Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infect Immun*, 65:1546-1549.
250. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33:2233-2239
251. Tóth Á, Gacs M, Márialigeti K, Cech G, Füzi M. (2005) Occurrence and regional distribution of SHV-type extended-spectrum β -lactamases in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 24: 284-287
252. Tran JH, Jacoby GA. (2002) Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:5638-42.
253. Turner PJ. (2005) Extended-spectrum β -lactamases. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 4: S273-275
254. Vahaboglu H, Füzi M, Cetin S, Gundes S, Ujhelyi E, Coskuncan F, Tansel O. (2001) Characterization of extended-spectrum β -lactamase (TEM-52)-producing strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with diverse resistance phenotypes. *J Clin Microbiol*, 39: 791-793.

255. Vakulenko SB, Mobashery S. (2003) Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev*, 16: 430–50.
256. Walia S, Madhavan T, Reuman P, Tewari R, Duckworth D. (1988) Plasmid profiles and klebocin types in epidemiologic studies of infections by *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 7:279–284.
257. Walsh TR. (2005) The emergence and implications of metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect. Suppl* 6:2-9.
258. Walsh TR. (2008) Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis*. 21:367-71.
259. Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, Hooper DC, Wang M. (2009) New plasmid-mediated quinolone resistance, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrobial Agents Chemother*, 53:1892-7.
260. Wang S, Li D, Chu YZ, Zhu LY, Liu FZ. (2009) Determination of oropharyngeal pathogenic colonization in the elderly community. *Chin Med J (Engl)*, 122:315-8.
261. Weigel LM, Steward CD, Tenover FC. (1998) *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 42: 2661-2667.
262. Williams P, Chart H, Griffiths E, Stevenson P. (1987) Expression of high affinity iron uptake systems by clinical isolates of *Klebsiella*. *FEMS Microbiol Lett*, 44:407-412
263. Williams P, Tomas JM. (1990) The pathogeniety of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Med Microbiol*, 1:196-204

264. Wilson RB. (1994) Hepatic hemosiderosis and *Klebsiella* bacteremia in a green aracari (*Pteroglossus viridis*). Avian Dis, 38:679-81.
265. Wong NA, Linton CJ, Jalal H, Millar MR. (1994) Randomly amplified polymorphic DNA typing: a useful tool for rapid epidemiological typing of *Klebsiella pneumoniae*. Epidemiol Infect. 113(3):445-54
266. Woodford N, Ellington MJ. (2007) The emergence of antibiotic resistance by mutation. Clin Microbiol Infect, 13: 5-18.
267. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Hagan EJ, James D et al (2004) Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. J Antimicrob Chemother, 54:735–743
268. Würker M, Beuth J, Ko HL, Przondo-Mordarska A, Pulverer G. (1990) Type of fimbriation determines adherence of *Klebsiella* bacteria to human epithelial cells. Zentralbl Bakteriol, 274:239-45.
269. Wyand DS, Hayden DW. (1973) *Klebsiella* infection in muskrats. J Am Vet Med Assoc, 163:589-91.
270. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. (2007) New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother, 51:3354-60.
271. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. (2001) Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 45:1151-61.

272. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y (2002) Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol, 40: 3798–3801.
273. Zarnayová M, Siebor E, Péchinot A, Duez JM, Bujdánková H, Labia R, Neuwirth C. (2005) Survey of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases in a Slovak hospital: dominance of SHV-2a and characterization of TEM-132. Antimicrob Agents Chemother, 49:3066-3069.

12. Saját publikációk jegyzéke

12.1. 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, Pászti 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, Pászti 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, Pászti 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 ‘MRSA’s? J Antimicrob Chemother., 62: 978-985. **IF: 4,328**

Hajdu Á, Böröcz K, Dandárné Csabai Cs, Bauer E, Tirczka T, Tóth Á, **Damjanova I**, Pászti 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.

12.2. A disszertáció témájához nem kapcsolódó publikációk jegyzéke

Erdősi Tímea, **Damjanova Ivelina**, Milch Hedda, Pásztai Judit. 2002. Nosocomialis fertőzéseket okozó gyakoribb baktérium fajok fenó- és genotipizálása. 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 Microbiol. 150:95-102. **IF(2010): 3.143**

13. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Füzi Miklósnak, hogy munkámat támogatta és mindvégig tanácsokkal látott el.

Köszönöm dr. Tóth Ákosnak, hogy együtt dolgozhattunk, és sikeres csapatot alkothattunk az elmúlt években, továbbá hogy mindig számíthattam rá a “vadhajtások” megnyírbálásában.

Köszönöm Dr Milch Heddának, hogy észrevételeivel, tapasztalatával és tanácsaival bevezetett a “fágok” világában és átalakította az élőszervezetekről alkotott nézeteimet.

Köszönöm Pásztai Juditnak, hogy mindig támogatta munkámat, és az együttműködést a Bakteriológiai és a Fágtipizálási és Molekuláris Epidemiológiai Osztály között.

Köszönöm az Országos Epidemiológiai Központ Fágtipizálási és Molekuláris Epidemiológiai Osztály minden munkatársának a munkámhoz nyújtott segítséget, és különösen Jakab Melindának, aki minden szituációban és minden kérdésben tudott egy jó megoldást. Továbbá köszönöm Hajbel-Vékony Gabriellának a sokoldalú segítséget. Munkatársaim hatékonysága nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el.

Köszönöm az Országos Epidemiológiai Központ Bakteriológiai I. osztály dolgozóinak, és különösen Topfné Juliának és Torma Andreának, akik szintén segítettek munkámat.

Köszönöm az Országos Epidemiológiai Központnak, hogy biztosította a feltételeket a laboratóriumi munkákhoz, és támogatta tanulmányaimat.

Köszönöm a hazai klinikai mikrobiológiai laboratóriumokban dolgozó kollégáknak és minden kórházhigiénikus kollégának a törzsküldésben való részvételt.

Hálával tartozom szüleimnek és hugomnak, hogy kitartottak mellettem és messziről támogattak végig a tanulmányaim és a munkám során.

És végül, de nem utolsó sorban, köszönöm páromnak és gyerekeimnek, hogy szeretnek és támogatnak minden elrugaszkodott elképzelésem, rendetlenségem és szórakozottságom ellenére.