

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Multirezisztencia mechanizmusainak vizsgálata Gram
negatív kórokozók körében: karbapenem rezisztens
Acinetobacter baumannii genomi epidemiológiája**

Balázs Bence

Témavezető: Dr. Kardos Gábor



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2022

Multirezisztencia mechanizmusainak vizsgálata Gram negatív kórokozók körében: karbapenem rezisztens *Acinetobacter baumannii* genomi epidemiológiája

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta: Balázs Bence okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Mikrobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Kardos Gábor, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Gesztelyi Rudolf, PhD
Prof. Dr. Pál Tibor, MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó Katalin, PhD

tagok: Dr. Gesztelyi Rudolf, PhD
Prof. Dr. Pál Tibor, MTA doktora
Dr. Fehér Enikő, PhD
Prof. Dr. Bácsi Attila, MTA doktora

Az értekezés védésének helye és időpontja:

Debreceni Egyetem, ÁOK, Sürgősségi Orvostani Tanszék tanterme
2023. január 12., 13 óra

Bevezetés

A nozokomiális vagy egészségügyi ellátással összefüggő fertőzések világszerte súlyos problémát jelentenek. Kórházi ellátás során minden száz betegből a fejlett országokban 7, fejlődő országokban 10 fertőződik meg valamilyen kórokozóval. Természetesen a különböző kórházi osztályoknál például intenzív terápiás osztályok (ITO), égési osztályok, neonatális osztályok, a fertőződés aránya eltérhet. A leggyakrabban és a legsúlyosabb infekciók a ITO-kon alakulnak ki, csak ezen osztályokat tekintve a fertőzés aránya elérheti a 20,6%-ot is. A magas előfordulási arány megnövekedett mortalitással is jár. Az Egészségügyi Világszervezet szerint, csak a legszegényebb régiókban (Délkelet Ázsia, szubszaharai Afrika) eléri a 75%-ot a halálesetek száma a csecsemőosztályokon. Ez az arány azonban a leggazdagabb régiókban is 3,5 és 12,0% közé esik. A nozokomiális kórokozók terjedése és a járványok kialakulása több tényezős folyamat. A kórokozó akár a beteg normál flórájának tagja is lehet, opportunista patogénként az immunrendszer legyengülése esetén okozhat súlyos fertőzést. Másik forrást maga a kórházi környezet jelent. Transzmissziójuk történhet kórházi személyzettel, eszközökkel, illetve másik fertőzött beteggel való direkt kontaktussal. Továbbá a kórokozók ott lehetnek a vízhálózatban is, ami növeli a terjedés lehetőségét, amely csökkenthető a megfelelő higiéniai intézkedések betartásával (kézfertőtlenítés, szájmascok megfelelő használata és így tovább).

A problémát tovább súlyosbítja a multirezisztens (MDR – multidrug resistant) kórokozók jelenléte. Ezek a kórházi környezetben megtalálható baktériumok képesek ellenállni az antibiotikumok széles spektrumának vagy akár fertőtlenítő szereknek is. Sokan közülük abiotikus felületeken is hosszú ideig (>100 nap) túlélnek, illetve ellenállnak a kiszáradásnak is. A nozokomiális fertőzések döntő részéért az úgynevezett ESKAPE kórokozók (az *Enterococcus* fajok, a *Staphylococcus aureus*, a *Klebsiella pneumoniae*, az *Acinetobacter baumannii*, a *Pseudomonas aeruginosa* és az *Enterobacter* fajok) a felelősek. Mindezen kórokozók közül az elmúlt évtizedekben a nem fermentáló, aerob, Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzések klinikai szempontból jelentős kihívássá váltak.

Célkitűzés

Munkacsoportunk 2010 óta végzi a multirezisztens *A. baumannii* rezisztenciájának molekuláris epidemiológiai vizsgálatát, kiegészítve az antibiotikum felhasználás elemzésével. Jelen tanulmány a 2012 után időszak eredményeit mutatja be, illetve a székletmintákból származó *A. baumannii* izolátumokat hasonlítja össze az azonos időszakból származó klinikai izolátumokkal. Előzetes vizsgálataink alapján felmerült, hogy a Debreceni Egyetem Klinikai Központjának osztályain új, karbapenem rezisztens *Acinetobacter baumannii* törzs jelent meg. Ezért, szerettünk volna választ keresni arra, hogy:

- Történt-e törzsváltás?
- Az új törzs rezisztenciája eltér-e a korábban domináns klónokétól, akár genomi akár fenotípusos jellegben?
- Mi állhat a törzsváltás hátterében?
- Az antibiotikum felhasználásnak van-e szerepe a törzsváltásban?
- Az új és régi törzsek mennyire térnek el egymástól?
- Megjelenhetnek-e tünetmentes hordozók?

Anyagok és módszerek

Acinetobacter baumannii klinikai izolátumok

A vizsgált klinikai *Acinetobacter baumannii* izolátumokat a Debreceni Egyetem Klinikai Központjának klinikáiról gyűjtöttük össze 2012 és 2017 között. Összesen 521 izolátumot vizsgáltunk: 2012-ben 74; 2013-ban 118; 2014-ben 128; 2016-ban 136 és 2017 áprilisáig 65 izolátumot gyűjtöttünk. Az izolátumokat úgy válogattuk össze, hogy minden betegről az adott vizsgálati évben csak egy izolátum szerepeljen. A minták, melyekből a baktériumot izoláltuk a klinikák fekvőbeteg, illetve intenzív osztályairól származtak. Mintamegoszlást tekintve az izolátumok 44,7%-a (233/521) bronchus mintákból származott, emellett a leggyakrabban seb (38/521), trachea (33/521), vizelet (36/521) és a vér (37/521) mintákból tenyésztett ki *A. baumannii*. Az klinikai eredetű izolátumok identifikálása MALDI-TOF-MS (Matrix-Associated-Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry) módszerrel, MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) készülékkel történt. A 2012-ben, 2013-ban, 2014-ben, 2016-ban és 2017-ben gyűjtött és vizsgált *A. baumannii* törzsek rezisztencia profilját (genotípus és fenotípus) a munkacsoport 2010/2011-es évben végzett kutatása során vizsgált *A. baumannii* izolátumok eredményeivel is összehasonlítottuk.

Széklelet eredetű *A. baumannii* izolátumok

A kutatócsoport másik tanulmánya során a rutin diagnosztikai tenyésztésre érkező széklelet mintákat 2 mg/L cefotaxim tartalmú eozin-metilénkék táptalajra is kioltottuk kiterjedt multirezisztens Gram-negatív baktériumok keresése céljából. A táptalajon kitenyésztett baktérium telepeket MALDI-TOF-MS segítségével identifikáltuk, majd az *A. baumannii* telepeket izoláltuk. A vizsgálat 2017 januárja és 2019 áprilisa között zajlott. Összesen 7806 mintát vizsgáltunk, melyek a Debreceni Egyetem Klinikai Központjának különböző fekvő beteg osztályairól érkeztek.

Antibiotikum érzékenység meghatározás

Mind a klinikai mind a széklelet eredetű *A. baumannii* izolátumok antibiotikum érzékenységének vizsgálata Kirby-Bauer féle korongdiffúziós módszerrel történt az European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) aktuális évi ajánlása alapján az alábbi antibiotikumokkal szemben: imipenem, meropenem, ciprofloxacin, amikacin,

tobramycin, gentamicin. A colistin érzékenység meghatározása minden esetben mikrodilúciós vizsgálattal történt (Merlin Diagnostics, Germany).

Antibiotikum felhasználás és töréspont analízis

A havi antibiotikum fogyási adatokat és a fertőzések incidencia denzitásait 2005 és 2017 között gyűjtöttük havi bontásban. A fogyási adatokat definiált napi dózisban (DDD – defined daily dose) számoltuk, a DDD-k számát 100 ápolási napra (OBD – occupied bed-days) vonatkoztatva adtuk meg. A fertőzések incidencia denzitását a fekvőbetegekben jelentkező fertőzések 100 ápolási napra vonatkoztatott számával jellemeztük. Az így kapott idősorokban Mann-Kendall teszttel kerestük a trend meglétét. A karbapenem érzékeny, illetve karbapenem rezisztens törzsek incidencia denzitásának idősoraiban valamint a karbapenemek fogyási adatainak idősoraiban, az idősorok jelentős változásait töréspont (changepoint) analízissel vizsgáltuk. Összehasonlítva az egyes idősorokban talált töréspontokat, összefüggéseket kerestünk az antibiotikum használat és a karbapenem érzékeny, illetve karbapenem rezisztens *Acinetobacter baumannii* (CRAb) incidenciája között.

A töréspont analízis esetében az egyes idősorokban kerestünk töréspontokat és a különböző idősorokban talált töréspontok időbeli távolságát elemeztük. A töréspont analízis esetében az átlag eltéréseit kerestük, a changepoint R csomagban a `cpt.mean` paranccsal a Pruned Exact Linear Time (PELT) módszerrel. Először megkerestük azt a penalty értéket, ahol az adott idősorban a töréspontok számának növekedése már nem exponenciális (Changepoints for a Range of Penalties (CROPS) módszer), majd ezzel a penalty értékkel meghatároztuk a töréspontokat. A tesztet úgy paramétereztük, hogy hat hónapnál rövidebb periódusok (két töréspont közé eső időszakok) létrejöttét szupprimáltuk. Amennyiben két idősor töréspontjai időben közel estek egymáshoz, közöttük kapcsolat meglétét feltételeztük. A töréspont analízis témavezetői segítségével történt.

Granger oksági vizsgálat

A tünetmentes hordozás és a klinikai mintákból származó *A. baumannii* izolátumok közötti oksági összefüggés vizsgálata Granger oksági teszttel történt. A Granger-féle oksági vizsgálat előrejelzési minőség összehasonlításán alapul, ahol egy idősort önmagában, majd egy másik idősor bevonásával vizsgálunk. Ha az előrejelzés minősége az utóbbi esetben jobb, akkor az első idősort a másikat Granger-okozza, ami lehetséges ok-okozati összefüggést jelez.

A Granger oksági tesztet Anil és mtsai. nyomán végeztük el az alapadatok felhasználásával (differenciálás és Box-Cox transzformáció nélkül).

A Granger oksági teszthez összegyűjtöttük a fekvőbetegek székletmintáiból, valamint a nozokomiális fertőzésekből származó karbapenemre érzékeny és a rezisztens *A. baumannii* előfordulását havi bontásban 100 ápolási napra vonatkoztatva 2017 és 2019 között. A Granger-kausalitást az infekcióból származó és fekális eredetű *A. baumannii* incidencia-idősortpárok között teszteltük.

A Granger oksági teszt elvégzése témavezetői segítséggel történt.

Rezisztencia gének

A karbapenem rezisztenciát biztosító *bla_{OXA-23-like}*, *bla_{OXA-40-like}* és *bla_{OXA-51-like}* géneket, valamint a *IS_{Aba-1}* inszerciós szekvenciát Woodford és mtsai. illetve Turton és mtsai által leírt metodikával kerestük polimeráz láncreakció (PCR) segítségével. Az *aac(6')-Ib*, az *aph(3')-Ia* és az *armA* aminoglikozid rezisztencia háttérben álló gének előfordulását Frana és mtsai., Vila és mtsai., valamint Bogaerts és mtsai. által leírt módszerrel vizsgáltuk PCR segítségével. A reakciókat korábbi munkák során optimalizáltuk.

Teljes genom szekvenálás (WGS – Whole genome sequencing)

A teljes genom szekvenálásához a 2010/11-es vizsgálatból 9, az *A. baumannii* összes pulzotípusát (A1; A2; B; C1; C2; D) és az egyedi izolátumokat képviselő izolátumokat választottunk. Egy pulzotípusba tartozónak tekintettük a pulzáló mezejű gélelektroforézis során >90% hasonlóságot mutató izolátumokat. A 2017-es klinikai izolátumok közül 14, a széklet eredetűek közül 15 izolátumot választottunk ki a rezisztencia fenotípusban mutatkozó különbségek (érzékenyek az összes vizsgált antibiotikumra; amikacin rezisztensek, de tobramycinre érzékenyek; csak gentamicinre és colistinre érzékenyek; csak ciprofloxacinnal és colistinre érzékenyek; a colistint kivéve minden vizsgált antibiotikumra rezisztensek), illetve a génhordozás eredményei (karbapenemázok illetve az *armA* gén jelenléte) alapján teljes genom analízisre.

Az összes izolátum genomiális DNS-ét a DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével extraháltuk. A könyvtárakat Nextera DNA Flex könyvtár-előkészítő készlettel (Illumina, San Diego, USA) hoztuk létre, és MiSeq platformon (Illumina) a MiSeq Reagent Kit v2 (300 ciklus) (Illumina) segítségével szekvenáltuk, a gyártó utasításainak megfelelően. Az eredményül kapott FASTQ fájlok felhasználásával, majd a

Ridom SeqSphere+ szoftverbe integrált Velvet assemblerrel (Ridom GmbH, München, Németország) *de novo* összeszereltük a draft genomokat. A cgMLST analízist SeqSphere+ szoftverrel (Ridom) hajtottuk végre az *A. baumannii* cgMLST 1.0 verziójú séma alapján. Az antibiotikum rezisztencia géneket a ResFinder v3.9 (cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/) és a Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) v3.1.0 (card.mcmaster.ca/analyze) segítségével azonosítottuk. A nyers szekvenciákat feltöltöttük az NCBI BioProject adatbázisba (BioProject ID: PRJNA671692).

A teljes genom szekvenálást a Nemzeti Népegészségügyi Központ munkatársainak segítségével (Dr. Tóth Ákos és kollégái) végeztük el.

Time-kill assay

Time-kill vizsgálatok során a meropenem, az imipenem és a colistin hatását vizsgáltuk mind a klinikai, mind a széklet eredetű izolátumokkal szemben. A kiindulási baktérium inokulum 10^6 CFU/ml volt, a gyógyszerkoncentrációk 16 és 128-1024 mg/l karbapenemek (imipenem, meropenem) és 2-32 mg/L colistin esetében, Mueller-Hinton táplevesben (Lab M Limited, Heywood, UK.). Mindegyik kísérlet tartalmazott egy pozitív (antibiotikum mentes) és egy negatív (antibiotikum és baktérium mentes) kontrollt is. A reakció térfogata 5 mL volt, a baktérium inokulumot és az antibiotikumot tartalmazó folyékony médiumokat 37 °C-on inkubáltuk, és 2; 4; 6; 8; 10; 12 és 24 óra időpontban szilárd Mueller-Hinton táptalajra (Lab M Limited, Heywood, Egyesült Királyság) oltottuk le. A táptalajokon kinőtt telepeket 24 órás, 37 °C-on történő inkubálás után megszámloltuk. Meghatároztuk az ölési rátát (k): $N_t = N_0 \times e^{-kt}$, ahol N_t az életképes baktérium telepek száma t időpontban, N_0 az életképes baktérium telepek száma a kezdeti médiumban, k az ölési ráta és t az inkubációs idő. A negatív és a pozitív k értékek növekedést, illetve pusztulást jeleznek. Baktericid hatásnak tekintettük, ha a kiindulási élőcsíraszámhoz képest >99,9%-os csökkenést találtunk. Minden vizsgálatot legalább két párhuzamos kísérletben végeztünk.

Eredmények

Antibiotikum fogyási eredmények:

A karbapenem fogyasztása egyenletesen nőtt 2005 és 2018 között ($p < 0,001$), a meropenem használat négyszeresére nőtt a két végpont között. Az átlagos felhasználás 0.64 DDD/100 OBD 2007-ben, míg 2.69 DDD/100 OBD 2017-ben. Az imipenem fogyasztás a meropenemhez hasonló volt 2007-ben (átlagos felhasználás 0.48 DDD/100 OBD), de nem változott drasztikusan a vizsgált időszak alatt (2017-ben az átlagos fogyás 0.80 DDD/100 OBD). A meropenem felhasználás jelentősen meghaladta az imipenem fogyasztást.

Töréspont analízis

A vizsgálat során hat olyan pontot találtunk, amikor a CRAB törzsek előfordulása jelentősen változott (az idősor adott szakaszának megváltozott az átlaga). A megnövekedett CRAB prevalencia és a karbapenem használat között két esetben találtunk időbeli összefüggést: 2009 februárja és júniusa, illetve 2014 októbere és decembere között.

Granger-okozati vizsgálat

A CRAB fekális hordozását a fekvőbetegeknél a klinikai CRAB megnövekedett prevalenciája okozta ($F = 15,84$; $p < 0,001$), de a fekvőbetegeknél a CRAB székletben való megjelenése nem fokozta a CRAB előfordulását ($F = 0,03$, $p = 0,855$) a klinikai mintákban. Ezzel szemben sem a karbapenemre érzékeny *A. baumannii* tünetmentes hordozása nem állt okozati összefüggésben a klinikai mintákból származó karbapenem érzékeny *A. baumannii* prevalenciájával ($F = 2,15$, $p = 0,155$), sem pedig fordítva ($F = 0,13$, $p = 0,726$).

Klinikai izolátumok

A klinikai izolátumok antibiotikum érzékenysége

A rezisztencia 75% feletti volt az összes vizsgált antibiotikum esetében, kivéve a colistint. A karbapenem rezisztencia folyamatosan nőtt a vizsgálat során ($p < 0,001$). Az izolátumok több mint 90%-a CRAB volt. A ciprofloxacín és gentamicin rezisztencia nagyon magas maradt a vizsgálat során, míg az amikacin és tobramycin rezisztencia 2016-17 között szignifikánsan csökkent ($p < 0,001$). A colistin rezisztencia mindvégig sporadikus volt.

Klinikai izolátumok rezisztencia gén megoszlása

Az aminoglikozid rezisztencia gének prevalenciája a vizsgált időszakban csökkent. A domináns *aph(3')-VIa* foszfortranszferáz gén prevalenciája 90,6%-ról 6,2%-ra csökkent ($p < 0,001$). Az *aac(6')-Ib* acetil-transzferáz esetében szintén hasonló mintázat figyelhető meg a vizsgálat végpontjai között szignifikáns csökkenés volt (56,9% vs. 27,7%). A metil-transzferáz *armA* gyakoriság a két végpont között nem mutatott szignifikáns eltérést, viszont a 2014 és 2016 között a gén prevalenciája szignifikánsan csökkent. ($p < 0,001$).

Az összes izolátum tartalmazta a *bla_{OXA-51-like}* géneket, ami azt bizonyítja, hogy minden vizsgált izolátum *A. baumannii* volt. A domináns karbapenemáz gén 2010 és 2014 között a *bla_{OXA-23-like}* volt, de a géncsalád előfordulása 2016-ban és 2017-ben szignifikánsan csökkent ($p < 0,001$). A *bla_{OXA-40-like}* karbapenemázok prevalenciája ezzel ellentétes tendenciát mutatott, míg a vizsgálati időszak elején a géncsalád szinte teljesen hiányzott, prevalenciája 2016-ban szignifikánsan emelkedett ($p < 0,001$), 2017-ben pedig még magasabb volt ($p < 0,001$).

Klinikai izolátumok teljes genom szekvenálása

2010-ben a *bla_{OXA-23-like}* géncsaládba tartozó karbapenemázok *bla_{OXA-23}* génnek bizonyultak az összes szekvenált törzsben, amely az összes főbb pulzotípust reprezentálta, szekvenciatípusokat tekintve (ST) ST1, ST2 és ST45 fordult elő.

A 2017-ből származó összes csak *bla_{OXA-23-like}* szerzett karbapenemáz gént hordozó izolátum, a ST2-be tartozott. A nagyobb prevalenciájú *bla_{OXA-40-like}* géncsaládot hordozó (75,0% 2016-ban és 92,3% 2017-ben) izolátumok az ST636-hoz és az ST492-hez tartoztak, amelyek mindegyike *bla_{OXA-72}* gént, illetve három ST636 törzs esetében az a *bla_{OXA-72}* és a *bla_{OXA-23}* gént együtt kódolta. A *bla_{OXA-23}* gén környezetében elhelyezkedő gének ezekben az izolátumokban megegyeztek a 2010-ből származó ST1 és ST45 törzsekével (például az *aph(3')-VIa* gén). Más típusú szerzett karbapenemáz géneket nem találtunk a szekvenált genomokban.

Az ST636 izolátumok genetikailag igen egységesek voltak, a távolság ≤ 4 allél volt, míg az ST2 törzsek sokkal diverzebbnek bizonyultak, egyes törzsek között 20 allél különbséget is detektáltunk, így elkülönülő alcsoportokba voltak sorolhatóak.

Klinikai izolátumok idő-ölés vizsgálata

A vizsgált izolátumok klinikai szempontból rezisztensek voltak mind meropenemmel, mind imipenemmel szemben, a minimális inhibitor koncentráció (MIC) >32 mg/L volt, kivéve a csak *bla_{OXA-51-like}* gént kódoló két izolátumot (MIC=2 mg/l mindkét esetben). A csak

bla_{OXA-23} hordozókkal (ST2) szemben a meropenem koncentrációfüggő baktericid hatást mutatott 128-1024 mg/L között (átlag $k=0,48$; 0,13-0,59), míg a *bla_{OXA-72}* hordozók (ST636; ST492) nem pusztultak el 256 mg/l-nél (átlag $k=-0,27$; -0,49 és -0,01 között), csak 512-1024 mg/L koncentráció között volt baktericid hatás (átlag $k=0,14$; 0,00 - 0,28), sőt a mindkét karbapenemázt, *bla_{OXA-23}* és *bla_{OXA-72}*, hordozó izolátumok ellen csak bakteriosztatikus hatást figyeltünk meg a legmagasabb 1024 mg/L koncentráción (átlag $k=-0,14$; 0,00 - -0,25) is. A meropenem 32 mg/L koncentráción baktericid volt a csak kromoszómálisan kódolt *bla_{OXA-51-like}* gént hordozó (átlag $k=0,08$; 0,05-0,10) izolátumokkal szemben.

Az imipenem koncentráció-független baktericid hatást mutatott 16 és 128 mg/L között, a *bla_{OXA-72}* (átlag $k=0,17$; 0,05-0,31) és a *bla_{OXA-23}* (átlag $k=0,36$; 0,19-0,57) karbapenemázt kódoló törzsek ellen is. A mindkét karbapenemázt együtt kódoló törzseknél (ST636) a baktericid koncentráció 128 mg/L volt (átlag $k=0,43$; 0,16-0,71). Hasonlóképpen a meropenemhez, az alacsonyabb koncentráció (16-32 mg/L) hatástalan volt, de az imipenem valamivel hatékonyabbnak bizonyult 16 mg/L-nél a csak *bla_{OXA-72}* hordozókkal (ST636; ST492) szemben.

A colistin hatása inkább izolátum, mint törzsfüggő volt, de mind *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-72}* illetve *bla_{OXA-23}/bla_{OXA-72}* kódoló törzsekkel szemben a colistin baktericid hatást mutatott <2 mg/L koncentráción.

Széketlet izolátumok

Széketlet izolátumok megoszlása és fenotípusos rezisztenciája

Az első vizsgálati időszakban (2011-2013) csak egy *A. baumannii* izolátumot találtunk (0,02%) a székletmintákban ($n=4067$). 2017 januárja és 2019 áprilisa között 7806 székletmintát vizsgáltunk, amiből 55 (0,15%) *A. baumannii* izolátum (24 db 2017-ben; 25 db 2018-ban; 6 db 2019-ben). Ezek az izolátumok olyan betegekből származtak, akiknek más mintáiból nem tenyésztett ki *A. baumannii*. Ebből az 55 izolátumból 30 gyermekgyógyászatról, 15 belgyógyászatról, 10 pedig különböző más klinikákról (pl. tüdőgyógyászat, idegsebészet) származott. Az *A. baumannii* izolátumok közül 15 volt CRAB (imipenem és meropenem rezisztens), 17 ciprofloxacinnal, 9 amikacinnal és tobramycinnel, 13 pedig gentamicinnel szemben mutatott rezisztenciát.

A széklet izolátumok teljes genom szekvenálása

A teljesgenom analízishez 16 széklet izolátumot választottunk ki az antibiotikum érzékenységi és PCR vizsgálatok alapján. A szekvenált izolátumok közül 15 legalább egy karbapenemázra pozitív volt, egy esetben pedig nem találtunk sem *bla_{OXA-23-like}* sem *bla_{OXA-40-like}* gént, de fenotípusosan rezisztens volt a vizsgált karbapenemekkel szemben.

A 16 szekvenált izolátum közül csak az *bla_{OXA-72}*-t hordozó ST636-ot (n=9) és az ST492-t (n=2) mutattunk ki. Két esetben találtunk *bla_{OXA-72/bla_{OXA-23}}* hordozó ST636 izolátumot. A két ST492 törzs az *armA* aminoglikozid rezisztencia gént is hordozta. A *bla_{OXA-72}* gén környezetének további vizsgálata során kiderült, hogy az ST636 és ST492 izolátumok pMAL-1-like és pA105-2-like plazmidokat hordoznak. Csak három izolátum nem tartozott az újonnan megjelent szekvenciatípusok (ST492, ST636) közé, az *aac(6')-Ib-cr* és csak a *bla_{OXA-120}* hordozó ST132, valamint a *bla_{OXA-20}* gént hordozó az ST45. Egy esetben találtunk egy új, *bla_{OXA-106}* gént hordozó szekvenciatípust.

A WGS megerősítette, hogy hasonlóan a klinikai eredetű ST636 CRAB izolátumokhoz, a fekális ST636 törzsek is genetikailag nagyon közel vannak egymáshoz, ebben a filogenetikai csoportban mindössze 4 allél távolságot észleltünk.

A klinikai és széklet izolátumok összehasonlítása

A klinikai izolátumok rezisztencia aránya 2017-től szignifikánsan magasabb volt az imipenem (95,4% vs. 27,3%; $p < 0,001$), a meropenem (95,4% vs. 27,3%; $p < 0,001$), a ciprofloxacin (96,9% vs. 30,9%; $p < 0,001$) és a gentamicin (96,9% vs. 23,6%; $p < 0,001$) esetében is. Ez a különbség nem volt szignifikáns az amikacin és a tobramycin esetében, de ezeknél az antibiotikumoknál is magasabb volt a rezisztencia aránya a klinikai izolátumok körében.

Az imipenem és a meropenem minimális gátló koncentrációja (MIC) minden esetben >32 mg/l volt. Az idő-ölés analízis kimutatta, hogy nincs különbség a széklet és a klinikai törzsek között a karbapenemek jelenlétében történő növekedés kinetikájában. A meropenem 128 mg/l-ben baktericid volt az ST492 izolátumok esetében, de az ST636 ellen soha nem találtunk baktericid hatást; sem *bla_{OXA-40-like}*, sem *bla_{OXA-40-like}* és *bla_{OXA-23-like}* karbapenemázt hordozó izolátumok ellen. Az imipenem 256 mg/l dózisban baktericid volt minden vizsgált izolátummal szemben.

A *bla_{OXA-40-like}* karbapenemáz gének prevalenciája szignifikánsan magasabb volt a klinikai *A. baumannii* izolátumokban (76,9% vs. 36,4; $p < 0,001$), két izolátum csak a *bla_{OXA-23-like}* gént hordozta, míg a székletben nem voltak olyan törzsek, amelyek csak a *bla_{OXA-23-like}* karbapenemázt hordozták. A két karbapenemázt egyszerre hordozó izolátumok

aránya szintén szignifikánsan magasabb volt a klinikai izolátumok között (15,4% vs 3,6%; $p < 0,05$). Az *armA* aminoglikozid rezisztencia gén esetében nem volt szignifikáns különbség (9-2% vs. 3,6%).

Mind a klinikai mind a fekális ST636 és ST492 izolátumokban a *bla_{OXA-72}* karbapenemáz gént pMAL-1-like plazmidon hordozzák, egy klinikai izolátumban megtaláltunk teljes pMAL-1 plazmidot 99,99%-os azonosság mellett egy kontigban (GeneBank ID: KX230793.1). A *bla_{OXA-23}* gén minden esetben a *Tn2008* (GeneBank ID: LN877214.1) transzpozonhoz kapcsolódott.

Megbeszélés

Jelen tanulmányban a teljes genom analízis alátámasztotta, hogy az *A. baumannii* esetében törzsváltás történt, amely során a korábban domináns *bla_{OXA-23-like}* hordozó ST2 és ST45 szekvenciatípusba tartozó izolátumokat felváltották az ST636 és ST492 törzsek, melyek *bla_{OXA-40-like}* karbapenemázt kódoltak, azonban teljesen nem tudták a korábbi törzseket kiszorítani. Az antibiotikumok használatával összefüggő evolúció, mely az egyre rezisztensebb baktérium törzsek felé halad, egy jól ismert folyamat. Az *A. baumannii* esetében az újonnan megjelent törzsek világszerte egyre nagyobb prevalenciát mutatnak, melyek összhangban vannak a fentebb említett evolúciós folyamatokkal, hiszen az önmagában gyenge hidrolitikus képességekkel rendelkező *bla_{OXA-51-like}* génnek által kódolt enzimeket először a *bla_{OXA-23-like}*, illetve *bla_{OXA-58-like}* pozitív klónok váltották, majd megjelentek a karbapenemeket leghatékonyabban hidrolizálni képes *bla_{OXA-40-like}* karbapenemázokat hordozó klónok.

A kórházi környezethez való alkalmazkodás nem csak rezisztencia formájában jelenhet meg, bár tény, hogy az antibiotikumokkal szembeni gyors és hatékony rezisztencia az egyik legfőbb mozgatója ennek a változásnak. Egy koreai tanulmányban összefüggést találtak a megnövekedett fluorokinolon használat és a III. generációs cefalosporin, illetve ciprofloxacín rezisztens *E. coli* és *K. pneumoniae* előfordulása között. Hasonló eredményre jutottak Mamoon és mtsai. a fluorokinolon használat és az ESBL termelő *E. coli* prevalenciája esetén. Bár egy-egy rezisztencia mechanizmus megszerzésének komoly fitness költsége lehet, amíg az antibiotikum használat elkerülése túlélési előnyt biztosít, addig az antibiotikumok használata miatti szelekciós nyomás egyre rezisztensebb baktériumok megjelenését, terjedését és fennmaradását fogja eredményezni. Az említett rezisztencia megszerzése mellett a virulencia és transzmissziós tényezők is fontos hatással vannak a törzsek térbeli (osztályok közötti) és időbeli kicserélődésében.

Az egyre rezisztensebb *A. baumannii* terjedése a szakirodalom által már jól dokumentált folyamat, mely összefügg a III. generációs cefalosporinok és karbapenemek használatának növekedésével. Utóbbi kapcsolatot a jelen tanulmányban bemutatott töréspont analízis is alátámasztja. Ez a folyamat rezisztencia spirál része, a karbapenem felhasználás növekedése az ESBL termelő baktériumok elterjedésével és az emiatti növekvő karbapenem felhasználással lehet összefüggésben, amit munkacsoportunk hazai adatokon statisztikailag is megerősített. Ezenkívül a CRAb izolátumok 2012 előtti vizsgálata is rámutatott a karbapenemek használata és a rezisztens törzsek megemelkedett prevalenciája közti kapcsolatra.

A jelen tanulmány idő-ölési kísérletei rámutattak arra, hogy a fentebb említett folyamat esetében az antibiotikum csoporton belül az egyes szerek iránti rezisztencia, ha kismértékben is, de eltérhet. A meropenem és imipenem ölési kinetikája eltérő volt; a meropenem kisebb hatékonyságot mutatott az újonnan megjelent ST636 és ST492 izolátumokkal szemben, mint az imipenem. Ez a különbség jelenthetett szelekciós előnyt az új *bla_{OXA-72}* törzsek számára, hiszen az antibiotikum fogyási adatokból kiderül, hogy a klinikák osztályain a meropenem használat a négyszeresére nőtt a vizsgált 2007 és 2017 közötti időszakban, míg az imipenemnél a fogyási adatok jelentősen nem változtak.

Fontos megemlíteni, hogy az ST636 és ST492 izolátumok előnye klinikailag elérhető koncentrációkon nem kimutatható, azonban mégis fontos tényező lehet a törzsek közötti szelekciós versenyben. Hasonlóan magyarázható például a H30Rx *E. coli* pandémiás klónok sikere a más fluorokinolon rezisztens *E. coli* ST131 szubklónokkal szemben. Ebben az esetben is a klinikailag rezisztens, de eltérő szintű rezisztenciával rendelkező kládok közötti kompetíció során a legmagasabb szintű rezisztenciát mutató szubklón bizonyult a legsikeresebbnek. Az előbbi, illetve a jelen tanulmányban bemutatott eredmények is rámutatnak a helyes antibiotikum használat fontosságára, mely nem csak a kórokozóval szemben hatásos antibakteriális szer használatát jelenti, de egy csoport spektrumukban kis különbségeket mutató tagjainak kiegyensúlyozott használatát is. Így még a klinikai szempontból is magas szintű rezisztenciával rendelkező törzseket is felválthatják rezisztensebb, új klónok nagy szelekciós nyomás alatt, mert a magasabb rezisztenciaszint elérése evolúciós szempontból előnyös lehet.

A megnövekedett fekális hordozás egybeesett a törzsváltással, a *bla_{OXA-72}* karbapenemáz gént hordozó ST636 és ST492 szekvenciatípusokat találtuk a széklet CRAB izolátumok esetében, míg a korábban a klinikai izolátumoknál domináns csak *bla_{OXA-23}* gént hordozó ST2 izolátumok hiányoztak.

Fontos kiemelni, hogy a vizsgált széklet eredetű CRAB izolátumok mindegyike, olyan betegről származott, akiknek más klinikai mintájában nem jelent meg sem karbapenem rezisztens sem érzékeny *A. baumannii*. (Sajnos a fertőzöttek széklet kolonizációjának szisztematikus vizsgálatára nem volt lehetőség.) Korábbi tanulmányok már vizsgálták a karbapenem rezisztens *A. baumannii* törzsekkel való kolonizációt, de a vizsgálatok intenzív osztályokon történtek, és a betegeknél súlyos *A. baumannii* által okozott fertőzést mutattak ki. Az előfordulást érintő eredményeink egybevágnak Dijkshoorn és mtsai. által végzett kísérletekben, ahol az *A. baumannii* egészséges felnőtt populációban való előfordulását 0,8 és 1,0 % közé teszik, azonban kevés adat áll rendelkezésre a korábban CRAB-al nem fertőzött

betegekről. Li és mtsai. hasonló, 1,48%-os (74/5000) széklet prevalenciáról számoltak be kórházi betegek nyomonkövetéses vizsgálatában, de a kéziratból nem derült ki, hogy a betegek *A. baumannii* fertőzésben szenvedtek, vagy tünetmentes kolonizációról volt szó.

Mindezek alapján az újonnan megjelent törzsek esetében nemcsak a fertőzések száma nőtt meg, de megnövekedett azoknak a száma is, akik betegség kialakulása nélkül kolonizálódtak, ami a korábban elterjedt törzsekre nem volt jellemző. A kolonizációs képesség tehát törzsspecifikus lehet, ami a meropenemmel szembeni nagyobb rezisztencián túl hozzájárulhatott a *bla_{OXA-72}*-t hordozó törzsek sikeréhez.

A Granger-oksági teszt rámutatott arra, hogy összefüggés van a megnövekedett CRAb prevalencia és a karbapenem rezisztens törzsek széklet mintákban való megjelenése között, ugyanakkor ez nem mondható el az antibiotikum csoportra érzékeny izolátumok esetében. A rezisztens törzsek okozta fertőzések előfordulásának gyakorisága hatott a hordozás megjelenésére, míg a hordozás nem fokozta a fertőzések előfordulását, vagyis a megnövekedett hordozás a fertőzések emelkedő prevalenciájának következménye lehet, például a több beteg miatti magasabb környezeti kontamináció eredményeképpen.

Klinikai szempontból a bélrendszer CRAb izolátumokkal történő tünetmentes kolonizációjának a felismerése jelentős kihívás, mivel ezek a betegek átadhatják a kórokozót az egészségügyi dolgozóknak, illetve a beteg környezete (pl. betegágy) is kontaminálódhat. Ezt alátámasztja, hogy a Granger-oksági teszt alapján a kolonizáltak emelkedő száma a fertőzöttek emelkedő számával magyarázható. A kontaminálódott kórházi környezettől, illetve a kolonizálódott ápoló személyzettől a később érkező, kritikus állapotban lévő betegek kolonizációja majd akár invazív fertőzése következhet be. Mivel a vastagbél kolonizációja egy multirezisztens kórokozóval önmagában nem indikációja az antibiotikus terápiának, illetve az antibiotikus terápia nem szünteti meg a kolonizációt, ezért a betegek szűrése és izolálása tűnik továbbra is a leghatékonyabb intézkedésnek a terjedés ellen.

Az antibiotikum stewardship törekvések általában egy gyógyszercsoport fogyasztásának csökkentését célozzák, egyformán kezelve a csoporton belüli azonos spektrumú gyógyszereket. Jelen tanulmány arra hívja fel a figyelmet, hogy a rokon vegyületek nem feltétlenül egyenrangúak, és kedvezhet bizonyos rezisztens törzsek elterjedésének és/vagy a már rezisztens törzseknél a magasabb rezisztencia szint kifejlődésének vagy akár a bélflóra kolonizációjának. Ellenkezőleg, az egyes vegyületek egy gyógyszercsoporton belüli sokoldalú felhasználása az egységes szelekciós nyomás csökkentésével akadályozhatja a rezisztencia terjedését. Ha a teljes antibiotikum restrikció nem kivitelezhető, egy ilyen megközelítés előnyös lehet.

Új eredmények:

- A megnövekedett antibiotikum használat és a CRAb előfordulás között töréspont analízis két esetben talált összefüggést, amikor az antibiotikum használat növekedését követte az rezisztens törzsek prevalenciájának növekedése.
- A klinikai CRAb izolátumok körében törzsváltás történt 2014 és 2016 között. Az addig domináns ST2 *bla_{OXA-23}* karbapenámzokat kódoló törzseket, az újonnan megjelent ST636 és ST492 törzsek szorították vissza, melyek *bla_{OXA-72}* gént kódoltak.
- Az új törzsek rezisztenciája eltért: a meropenem koncentráció-függő ölühatást mutatott, a *bla_{OXA-72}*-t hordozó izolátumok rezisztensebbek voltak. Imipenem esetében az antibiotikum hasonló mértékű koncentráció-független hatást mutatott mindkét karbapenemáz termelőivel szemben.
- Az *A. baumannii* előfordulása megnövekedett a széklet mintákban és a CRAb izolátumok is megjelentek a törzsváltással egyidőben. A székletben korábban klinikai minták esetében domináns ST2, illetve csak *bla_{OXA-23}* karbapenemázt kódoló izolátumot nem találtunk. A CRAb izolátumok mindegyike ST636 és ST492 szekvenciatípusba tartozott.
- A Granger oksági analízis eredményei azt mutatják, hogy a CRAb okozta fertőzés megnövekedett prevalenciája okozta a fekális hordozás megjelenését nem pedig fordítva. Karbapenem érzékeny izolátumok esetében nem volt ilyen összefüggés.

Összefoglalás

A Debreceni Egyetem Klinikai Központjában izolált a karbapenem rezisztens *A. baumannii*-k esetében 2016 előtt a *bla*_{OXA-23} hordozó ST2 és ST45 klónok voltak dominánsak. Azonban 2017-re ezen törzsek prevalenciája lecsökkent és egy újonnan megjelent *bla*_{OXA-72} karbapenemázt kódoló ST636 és ST492 klónok jelentek meg. Az új törzs megjelenése egybeesett a megemelkedett karbapenem fogyási adatokkal, elsősorban az egyoldalú meropenem használatával. Hipotézisünk az volt, hogy a bekövetkezett törzsváltás, az említett egyoldalú antibiotikum használatával függött össze. Az új törzsek megjelenésével egy időben megjelentek az *A. baumannii* -t tünetmentes hordozó a fekvőbetegek.

A *bla*_{OXA-23} és *bla*_{OXA-72} karbapenemázt kódoló izolátumok rezisztenciájának különbségeit idő-ölés kísérletekben vizsgáltuk, karbapenemekkel (meropenem és imipenem; 16, 128-1024 mg/L) és colistinnel (2-32 mg/L) szemben.

Meropenem esetében eltérést találtunk a két karbapenemáz termelésével összefüggő rezisztencia között, míg a *bla*_{OXA-23}-t kódoló ST2 és ST45 izolátumok 256-1024 mg/L között ($k=0,346-0,859$) mutatott baktericid hatást, addig az újonnan megjelent *bla*_{OXA-72} gént hordozó ST636, ST492 klónok esetében ez a hatás csak 512-1024 mg/L koncentrációnál ($k=0,156-0,421$) jelentkezett. Az imipenem koncentrációfüggetlen baktericid hatást mutatott 128 és 1024 mg/L között mind ST2, ST45, ST636 és ST492 esetében. A colistin baktériumölő hatása izolátum függő volt.

2017 és 2019 között a 7806 vizsgált rutin diagnosztikai vizsgálatra érkező székletmintákból 55 *A. baumannii* tenyésztett (0,15%). Ebből a mintacsoportból származó izolátumok esetében a karbapenem rezisztencia prevalenciája alacsonyabb volt, mint a fentebb említett klinikai mintákból származó izolátumoké. A fekális izolátumok között a csak *bla*_{OXA-23} gént hordozó törzsek nem voltak. A *bla*_{OXA-72} karbapenemázt hordozó izolátumok aránya 36,4% volt, de az izolátumok 3,6%-a mindkét karbapenemázt kódolta. A klinikai izolátumok esetében a *bla*_{OXA-72} gén előfordulása 76,9%, míg a *bla*_{OXA-23} gén előfordulása 3,1% volt. A két gént az izolátumok 15,4%-a kódolta egyszerre.

A rezisztensebb klónok, illetve a *bla*_{OXA-72}-t hordozó izolátumok megjelenéséhez a meropenem rezisztenciában tapasztalható különbség hozzájárulhatott, mely különbség imipenem esetében nem volt, ami rávilágít az egyoldalú antibiotikum-használat veszélyeire. A CRAB izolátumok klinikai prevalenciája Granger-okozza a karbapenem-rezisztens ST636 és ST492 izolátumok fekális hordozásának előfordulását, de ez az érzékeny izolátumok esetében nem mutatható ki.



Nyilvántartási szám: DEENK/414/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Balázs Bence
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10054316

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Balázs, B.**, Tóth, Z., Nagy József, B., Majoros, L., Tóth, Á., Kardos, G.: Faecal Carriage of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*: comparison to Clinical Isolates from the Same Period (2017-2019).
Pathogens. "Accepted by Publisher", 2022.
IF: 4.531 (2021)
2. **Balázs, B.**, Tóth, Z., Nagy, F., Kovács, R. L., Tóth, H., Nagy József, B., Tóth, Á., Szarka, K., Majoros, L., Kardos, G.: The Role of Uniform Meropenem Usage in *Acinetobacter baumannii* Clone Replacement.
Antibiotics. 10 (2), 1-12, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics10020127>
IF: 5.222

További közlemények

3. Nagy, B. J., **Balázs, B.**, Benmazouz, I., Gyüre, P., Kövér, L., Kaszab, E., Bali, K., Lovas-Kiss, Á., Damjanova, I., Majoros, L., Tóth, Á., Bányai, K., Kardos, G.: Comparison of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates From Rooks (*Corvus frugilegus*) and Contemporary Human-Derived Strains: A One Health Perspective.
Front. Microbiol. 12, 1-9, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.785411>
IF: 6.064 (2021)
4. Forgács, L., Borman, A. M., Kovács, R. L., Balázs, D., Tóth, Z., **Balázs, B.**, Chun-Ju, C., Kardos, G., Kovács, I., Majoros, L.: In Vivo Efficacy of Amphotericin B against Four *Candida auris* Clades.
J. Fungi. 8 (5), 1-16, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jof8050499>
IF: 5.724 (2021)





5. **Balázs, B.**, Tóth, Z., Kacsir, I., Sipos, A., Buglyó, P., Somsák, L., Bokor, É., Kardos, G., Bai, P.: Targeting multiresistant Gram-positive bacteria by ruthenium, osmium, iridium and rhodium half-sandwich type complexes with bidentate monosaccharide ligands. *Front. Chem.* 10, 1-9, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2022.868234>
IF: 5.545 (2021)
6. Tóth, H., Buchholz, G., Fésüs, A., **Balázs, B.**, Nagy József, B., Majoros, L., Szarka, K., Kardos, G.: Evolution of the Gram-Negative Antibiotic Resistance Spiral over Time: a Time-Series Analysis. *Antibiotics-Basel.* 10 (6), 1-10, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics10060734>
IF: 5.222
7. **Balázs, B.**, Nagy József, B., Tóth, Z., Nagy, F., Károlyi, S., Turcsányi, I., Bistyák, A., Kálmán, A., Sárközi, R., Kardos, G.: Occurrence of Escherichia coli producing extended spectrum [béta]-lactamases in food-producing animals. *Acta Vet. Hung.* 69 (3), 1-5, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/004.2021.00036>
IF: 0.959
8. Kovács, R. L., Nagy, F., Tóth, Z., Bozó, A., **Balázs, B.**, Majoros, L.: Synergistic effect of nikkomycin Z with caspofungin and micafungin against Candida albicans and Candida parapsilosis biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.* 69 (4), 271-278, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/lam.13204>
IF: 2.173
9. Tóth, H., Fésüs, A., Kungler-Gorács, O., **Balázs, B.**, Majoros, L., Szarka, K., Kardos, G.: Utilization of vector autoregressive and linear transfer models to follow up the antibiotic resistance spiral in Gram-negative bacteria from cephalosporin consumption to colistin resistance. *Clin. Infect. Dis.* 69 (8), 1410-1421, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciy1086>
IF: 8.313

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 43,753

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,753

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.09.01.

