

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

ANTIBIOTIKUM REZISZTENS GRAM-POZITÍV COCCUSOK EPIDEMIOLÓGIAI JELLEMZÉSE

Dombrádi Zsuzsanna Rita



Témavezető: Dr. Szabó Judit

DEBRECENI EGYETEM
GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2011

1. TARTALOMJEGYZÉK

1. TARTALOMJEGYZÉK.....	2
2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
3. BEVEZETÉS.....	5
4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	7
4.1. Gram-pozitív coccusok.....	7
4.1.1. Enterococcusok jellemzői.....	7
4.1.2. Staphylococcusok jellemzői.....	9
4.2. Antibiotikum rezisztens baktériumok.....	10
4.2.1. Az enterococcusok antibiotikum rezisztenciája.....	10
4.2.2. A staphylococcusok antibiotikum rezisztenciája.....	12
4.2.3. Glikopeptid antibiotikumok hatásmechanizmusa.....	12
4.2.3.1. Vancomycin rezisztencia enterococcusokban.....	15
4.2.3.2. Vancomycin rezisztencia staphylococcusokban.....	19
4.2.4. β -laktám antibiotikumok hatásmechanizmusa.....	20
4.2.4.1. Methicillin rezisztencia staphylococcusokban.....	21
4.3. Céltűzések.....	23
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	24
5.1. Anyagok.....	24
5.1.1. Vegyszerek, enzimek, kitek.....	24
5.1.2. Pufferek, oldatok.....	24
5.1.3. Tápoldatok, táptalajok.....	25
5.1.4. Oligonukleotid primerek.....	26
5.1.5. Baktérium törzsek.....	28
5.2. Módszerek.....	29
5.2.1. Klinikai minták szűrése, tenyésztése.....	29
5.2.1.1. Rezisztens enterococcus törzsek azonosítása.....	29
5.2.1.2. Rezisztens staphylococcus törzsek azonosítása.....	29
5.2.2. Antibiotikum érzékenység vizsgálata.....	30
5.2.2.1. Korongdiffúzió.....	30
5.2.2.2. E-teszt.....	30
5.2.2.3. VITEK 2 automata.....	32
5.2.3. Molekuláris biológiai vizsgálatok.....	33
5.2.3.1. Baktérium lizátum készítése.....	33
5.2.3.2. Polimeráz láncreakció (PCR).....	34
5.2.3.3. Restrikciós analízis (RFLP).....	36
5.2.3.4. Agaróz gél-elektroforézis.....	36
5.2.3.5. DNS kinyerése agaróz gélből.....	37
5.2.3.6. PCR termékek klónozása.....	37
5.2.3.7. PCR termékek tisztítása és szekvenálása.....	38
5.2.4. Epidemiológiai tipizálási módszerek.....	38
5.2.4.1. Multilocus sequence typing (MLST).....	38
5.2.4.2. Pulzáló erőterű gél-elektroforézis (PFGE).....	39
5.2.4.3. Bakteriofág tipizálás.....	40
5.2.4.4. Módosított populáció analízis profil.....	40
5.2.4.5. Staphylococcus chromosomal cassette mec (SCCmec) tipizálás.....	41
5.2.5. Az adatok elemzése és kiértékelése.....	41

6. EREDMÉNYEK.....	43
6.1. A VRE előfordulása a Debreceni Egyetem klinikáin.....	43
6.1.1. A <i>vanC</i> pozitív törzsek jellemzése.....	45
6.1.1.1. PCR és restrikciós analízis.....	45
6.1.1.2. Antibiotikum érzékenység vizsgálata.....	48
6.1.1.3. Epidemiológiai vizsgálatok.....	48
6.1.2. Egy <i>vanA</i> pozitív eset ismertetése.....	50
6.1.2.1. Esetleírás.....	50
6.1.2.2. Mikrobiológiai jellemzés.....	50
6.1.2.3. Molekuláris biológiai jellemzés.....	51
6.1.3. A VITEK 2 automatával végzett vizsgálatok.....	53
6.2. Az MRSA előfordulása a Debreceni Egyetem klinikáin.....	54
6.2.1. MRSA törzsek incidenciája.....	54
6.2.2. MRSA törzsek antibiotikum rezisztencia mintázata.....	56
6.2.3. MRSA törzsek epidemiológiája.....	57
6.2.3.1. Bakteriofág tipizálás.....	57
6.2.3.2. Klonális kapcsolatok elemzése.....	58
6.2.4. hVISA törzsek jellemzése.....	60
6.2.4.1. Klinikai esetek bemutatása.....	60
6.2.4.2. A hVISA törzsek mikrobiológiai jellemzése.....	61
7. MEGBESZÉLÉS.....	64
8. ÖSSZEFOGLALÁS.....	70
9. SUMMARY.....	71
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	72
10.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke.....	72
10.2. Saját közlemények jegyzéke.....	84
11. TÁRGYSZAVAK.....	85
11.1. Tárgyszavak.....	85
11.2. Keywords.....	85
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	86
13. FÜGGELÉK.....	87
13.1. A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár által hitelesített publikációs lista.....	87
13.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai.....	87

2. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AST: antibiotic sensitivity test (antibiotikum érzékenységi teszt)
ATCC : American Type Culture Collection (amerikai típustörzs gyűjtemény)
BEA : Bile Esculin Azid (epe, eszkulin és azid tartalmú táptalaj)
BHI : brain heart infusion (agy és szív kivonatot tartalmazó táptalaj)
BORSA : Borderline methicillin-resistant *S. aureus*
CA-MRSA : community acquired methicillin-resistant *S. aureus* (közösségben szerzett meticillin-rezisztens *S. aureus*)
CDC : Centers for Disease Control and Prevention (Járványügyi és Megelőzési Központ)
CFU : colony forming unit (telepképző egység)
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinikai és Laboratóriumi Standardok Intézete)
CNS : koaguláz-negatív staphylococcusok
DNS : dezoxiribonukleinsav
EARS-Net : European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (Európai Antimikrobiális Rezisztenciát Felmérő Hálózat)
EDTA : etilén-diamin-tetraecetsav
EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Európai Antimikrobiális Érzékenységet Vizsgáló Bizottság)
GISA: glycopeptide-intermediate sensitive *S. aureus* (glikopeptidre mérsékelten érzékeny *S. aureus*)
hVISA: hetero-vancomycin-intermediate sensitive *S. aureus* (vancomycinre mérsékelten heterorezisztens *S. aureus*)
KRPD: Krebs Ringer Phosphate puffer dextrózzal
MH : Mueller Hinton agar
MIC : Minimal Inhibitory Concentration (minimális gátló koncentráció)
MLST : multi locus sequence typing
MRSA : meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*
MSSA : meticillin-szenzitív *Staphylococcus aureus*
PAP-AUC : populáció analízis profil -area under curve (görbe alatti terület)
PBP : penicillin binding protein (penicillin kötő fehérje)
PCR : polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PFGE : pulsed field gel electrophoresis (pulzáló erőterű gél elektroforézis)
RFLP : restriction fragment length polymorphism (restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus)
SCCmec: *Staphylococcus* chromosomal cassette mec (*Staphylococcus* kromoszómális kazetta mec)
TAE : Tris-acetát-EDTA puffer
VISA : vancomycin-intermediate sensitive *S. aureus* (vancomycinre mérsékelten érzékeny *S. aureus*)
VRE : vancomycin rezisztens *enterococcus*

3. BEVEZETÉS

A huszadik század első felében a szintetikus és természetes eredetű antibiotikumok bevezetése paradigmaváltást idézett elő az orvoslásban. Sokan azt gondolták, hogy örökre megszabadulhatunk a baktériumok által okozott egyszerű fertőzések, vagy széles körű járványok halálos fenyegetésétől. A baktériumok genomjának variabilitása és a horizontális génátadás lehetősége azonban megkérdőjelezte a gyógyszeres kezelés mindenhatóságát. Az antibiotikum rezisztens baktériumok megjelenését követően a gyógyszergyártók a hatóanyagok szerkezetének módosításában, illetve új mechanizmuson alapuló gyógyszerek kidolgozásában keresték a megoldást, azonban ezzel a megközelítéssel legfeljebb csak elodázni tudták a rezisztenciából adódó problémákat. Míg az 1950-es évektől az 1980-as évek második feléig a nagy cégek rendszeresen előállítottak újfajta antibiotikumokat, addig az utóbbi 20 évben ezek száma jelentősen csökkent. A jelenlegi igen hosszú és bonyolult gyógyszer-honosítási eljárás mellett a cégek számára nem éri meg újfajta antibiotikumok fejlesztése. Van olyan cég, amelyik arra számít, hogy nem fog sor kerülni újfajta antibiotikumok kifejlesztésére és megkezdte oltóanyag, illetve antitest előállítását a legfontosabb nozokomiális kórokozók ellen (Füzi, 2006). Úgy tűnik, hogy az elkövetkező időkben a most rendelkezésünkre álló antibiotikum spektrumot kell hatékonyabban és célszerűbben fölhasználni. Először is meg kell szüntetni a nem megfelelő antibiotikum felhasználással kapcsolatos anomáliákat. Ismert, hogy a rezisztencia kialakulásának egyik oka, hogy egyes betegek hosszan tartó kezelésére széles spektrumú antibiotikumokat használnak, melyeket empirikus úton választanak meg. Gyakori, hogy felső légúti virális infekciókban fölösleges antibiotikum kezelésre kerül sor (Kristóf, 2010). Az antibiotikumok kiterjedt használata az elmúlt 50 évben olyan szelekciós nyomást eredményezett, amely a bakteriális rezisztencia megjelenéséhez illetve a rezisztencia gének szétszóródásához vezetett (Méndez-Álvarez és mtsai, 2000). Az emberi illetve az állati bélflóra is a rezisztencia gének rezervoárja lehet. A rezisztenciáért felelős gének eredete régóta foglalkoztatja a tudományt. A legújabb kutatások szerint a környezetünkben élő mikróbák magas szinten antibiotikum rezisztensek, és legalább néhány klinikailag jelentős rezisztencia gén ezekről származtatható (Wright, 2010). A különböző hatóanyagok szinergizmusán alapuló kombinált terápiák már nem hozhatnak megnyugtató megoldást, ugyanis a multirezisztens baktériumok mára igen elterjedtek nemcsak a kórházakban, mint nozokomiális kórokozók, hanem már a közösségben szerzett fertőzések nagy részét is ezek okozzák. A rezisztens törzsek által okozott fertőzések száma azért is növekszik, mivel egyre több a csökkent védekezőképességű beteg, emelkedik

az invazív beavatkozások száma, sokkal többen kerülnek intenzív osztályra, a betegpopuláció életkora pedig meghosszabbodott (Szalka, 2009). Szerencsére jelenleg még ott tartunk, hogy a legújabb, Gram-pozitív baktériumok ellen kifejlesztett antibiotikumok (quinupristin-dalfopristin, daptomycin, linezolid, tigecyclin, dalbavancin, telavancin, oritavancin stb) még hatásosak, a kutatók pedig biztató eredményeket érnek el az új típusú (antitest, szignálmolekula, quorum sensing inhibitor alapú) gyógyszerek tesztelése során (Ippolito és mtsai, 2010). Ebben a helyzetben felértékelődött a bakteriális diagnosztika jelentősége. A rezisztens baktériumok gyors és megbízható kimutatása elengedhetetlen a megfelelő antibiotikumterápia megválasztásához, illetve a megfelelő infekciókontroll intézkedések bevezetéséhez. A modern eljárások közül különösen jelentősek a molekuláris biológiai megközelítések, amelyek a baktérium genotípusa alapján akár 1 napon belül egyértelmű azonosítást tesznek lehetővé. Munkámmal én is ehhez a területhez kívántam hozzájárulni azáltal, hogy új molekuláris biológiai alapú diagnosztikai eljárásokat teszteltem a DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumában.

Témám kiválasztásában szerepet játszott, a rezisztens Gram-pozitív kórokozók előretörése az utóbbi évtizedekben. A nyolcvanas évek közepétől kezdve újra gyakoribbá váltak a Gram-pozitív coccusok, elsősorban a koaguláz negatív staphylococcusok, legújabban pedig az enterococcusok által okozott fertőzések (Kristóf, 2010). A mikrobiológiai laboratóriumnak nagyon fontos szerepe van a nosokomiális fertőzéseket okozó kórokozók identifikálása és korrekt antimikrobiális érzékenységeinek meghatározásában. A rutin laboratóriumi technikák mellett ma már elengedhetetlen lenne az egyszerű molekuláris diagnosztikai módszerek bevezetése a potenciális pathogének illetve rezisztencia rezervoárok monitorozásához a kórházakban. A molekuláris biológiai előnyei közé sorolhatók a pontosabb faji identifikálás, a gyorsabb eredmény, az epidemiológiai tipizálás: egy törzs bizonyított klonalitása lehetőséget biztosít a beteg és a kérdéses mikroorganizmus terjesztője, esetleg forrása közötti kapcsolat igazolására.

4. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

4.1. Gram-pozitív coccusok

Az antibiotikumok felfedezése előtt a szepszisek közel 90%-át Gram-pozitív baktériumok okozták (*S. pneumoniae*, *S. aureus*, A csoportú Streptococcusok). Az ötvenes évek elejétől a nyolcvanas évek közepéig a szepszisek - ezen belül főleg a kórházi eredetű Gram-negatív bakteriális eredetűek- száma fokozatosan emelkedett. Az elmúlt 15 évben azonban a Gram-pozitív mikrobák által okozott szepszisek újból előtérbe kerültek (Szalka, 2009).

4.1.1. Az enterococcusok jellemzői

A székletben található, rövid láncokban vagy párokban elhelyezkedő coccusokat már felfedezésükkor "enterococcus"-nak nevezték el. Sokáig a *Streptococcus* genusba sorolták ezeket a baktériumokat, bár tulajdonságaik alapján meglehetősen különböztek a genus többi tagjától. 1984-ben genetikai bizonyítékok alapján (DNS hibridizáció, 16S rRNS szekvenálás) az önálló *Enterococcus* genusba kerültek (Schleifer és Kilpper-Balz, 1984), amelybe jelenleg 40 species tartozik (J.P. Euzéby, www.bacterio.net). Mivel az enterococcusok kedvezőtlen környezeti viszonyok között is képesek túlélni és szaporodni, a természetben szinte mindenütt megtalálhatók: talajban, vízben, élelmiszerben, állatokban. Az emberi és az állati béltraktusban fordulnak elő leggyakrabban, de az urogenitális szervek (hüvely, húgycső), az epehólyag és a szájüreg normál flórájának is alkotói. Az enterococcus fertőzések ezért főként endogén eredetűek, de létrejöhetnek exogén úton, a kéz és tárgyak (pl. hőmérő) közvetítésével is (Czirók, 1999). Az *E. faecalis* a leggyakrabban izolált species, második az *E. faecium* (EARS-Net, 2010).

Az enterococcusok által leggyakrabban okozott betegségek: a húgyúti infekciók, hepatobiliáris szepszis, endocarditis, sebfertőzés, bacteraemia és neonatális szepszis (Poh és mtsai, 2006). Az elmúlt évtizedben a húgyúti- és sebfertőzések második, a bacteraemiák harmadik leggyakoribb kórokozóiként izolálták őket (De Fatima Silva Lopes és mtsai, 2005).

Az enterococcus fertőzések leggyakrabban antibiotikum kezelés után lépnek fel. Elsősorban az enterococcusokra nem, vagy csak marginálisan ható antibiotikumokkal

(cefalosporinok, aminoglikozidok, clindamycin, kinolonok, metronidazol) folytatott terápia során fordul elő enterococcus felülfertőződés (Czirók, 1999).

Az enterococcusok Gram-pozitív coccusok. Képesek antimikrobiális peptidek, ún. bakteriocinek termelésére. Egyes speciestek, az *E. gallinarum* és az *E. casseliflavus* mozognak, ami félfolyékony táptalajban kimutatható. Az enterococcusok fakultatív anaerobok, optimális növekedési hőmérsékletük 35-37 °C, de a legtöbb törzs képes 5-50°C-on is szaporodni. Mind az *E. faecalis* és az *E. faecium* túléli a 60°C-os hőkezelést 30 percig (Foulquie Moreno, 2006). Növekedésükhöz nem igényelnek emelt CO₂ atmoszférát. A legtöbb törzs szaporodik agar lemezen, izolálásukra azonban a véres agar használatos, amelyen jobban növekednek. Szürkésfehér, 1-2 mm átmérőjű, csillogó, közepén tömörebb állományú telepeket képeznek. Néhány izolátum β-hemolízist mutat. Az *E. faecalis* törzsek 30 %-a β-hemolizál nyúl-, ló-, vagy emberi vért tartalmazó táptalajokon, de ezek a törzsek birkavérrel készült agaron nem hemolizálnak. A β-hemolízis néha marhavéres agaron is tapasztalható. Az *E. casseliflavus*, az *E. mundtii* és az *E. sulfureus* sárga pigmentet termel, amelyet csak akkor észlelünk, ha a tenyészetet kacsával összehúzzuk. Szelektív táptalajuk az epe-eszkulin-azid táptalaj (bile esculine azide, BEA), melyen az enterococcusok az eszkulin hidrolízis következtében fekete telepekben növekednek. A colistinnel és nalidix-savval kiegészített véres agar is alkalmas az enterococcusok szelektív izolálására. Valamennyi törzs növekszik 6,5%-os NaCl-ot tartalmazó tápfolyadékban. Az enterococcusok nem tartalmaznak citokróm enzimeket, ezért kataláz-negatívak. Esetenként gyengén pozitív kataláz-reakciót adnak egy ún. pszeudokataláz termelése következtében. Majdnem valamennyi izolátum homofermentatív, a glukózból gáz nélkül tejsavat képez. Az *E. cecorum*, az *E. columbae* és az *E. saccharolyticus* kivételével valamennyi species pirrolidonil-arilamidázt termel. Valamennyi törzs termel leucin-aminopeptidázt. Az enterococcusok az eszkulint hidrolizálják, 40 % epe és Na-azid jelenlétében növekednek. Az enterococcusok 4 fő képviselője közül csak az *E. faecalis* tellurit tűrő, és hasznosítja a piruvátot. Egyébként pigmenttermelés, mozgásképesség valamint cukorbontó képesség alapján különböztethetők meg egymástól (**1. táblázat**). Az úgynevezett Lancefield D csoportantigén jelenléte általában jellemző az enterococcusokra, de nem minden izolátumban mutatható ki (Czirók, 1999).

1. táblázat. Az enterococcusok 4 fő képviselőjének biokémiai tulajdonságai

	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>
Tellurit túrés	+	-	-	-
Piruvát hasznosítás	+	-	-	-
Pigment termelés	-	-	+	-
Mozgás	-	-	+	+
Arabinóz bontás	-	+	+	+
Szorbit bontás	+	változó	változó	-

4.1.2. A Staphylococcusok jellemzői

A genusba jelenleg 45 speciést sorolnak (J.P. Euzéby, www.bacterio.net). A Staphylococcus genus tagjai Gram-pozitív coccusok, egyesével, párossával, tetrádokban, rövid láncokban, vagy szőlőfürt szerű elrendeződésben fordulnak elő. Az ember illetve a melegvérű állatok bőrén, orrában és egyéb nyálkahártyáin is megtalálhatók, mint a normálfóra tagjai. Nem mozgó, spórát nem képző, általában kataláz-pozitív és tok nélküli baktériumok. A legtöbb faj fakultatív anaerob. A Micrococcaceae család tagjai, a Micrococcus genustól könnyen elkülöníthetők: oxidáz negatívak, lecitináz pozitívak, bacitracin rezisztensek, furazolidonra, nitrofurantoinra illetve lysostaphinra is érzékenyek. Tenyésztési optimumuk 37°C, 2-3 mm, kerek szélű, fényes, enyhén domború telepeket képeznek, melyek színe pigmentjeiktől függően aranyárga (*S. aureus*), citromsárga, porcelánfehér, vagy szürkésfehér lehet. (Gergely, 2003). A genus orvosi mikrobiológiai szempontból legjelentősebb tagja a *Staphylococcus aureus*. Az első *S. aureus* törzset Alexander Ogston izolálta 1880-ban, egy műtéti tályogból (Ogston, 1882). A faj legjellemzőbb tulajdonsága a koaguláz pozitivitás, szemben a többi koaguláz negatív Staphylococcus-szal (CNS). Az exokoaguláz enzimet csökoaguláz próbával, az endokoagulázt ("clumping factor", a törzsek 90-95%-ának felszínén) pedig tárgylemez agglutinációval lehet kimutatni. A szintén koaguláz-pozitív *S. intermedius*tól illetve a *S. hyicus* koaguláz-pozitív törzseitől acetil-metil-karbinol termelése, a *S. delphini* és *S. schleiferi* ssp *coagulans* törzsektől pedig a "clumping faktor" jelenléte különbözteti meg (Czirók, 1999). A legtöbb staphylococcus fajtól elkülöníti a hőstabil termonukleáz termelése is. Jelentős virulencia faktora a protein A, mely 95%-ban a koagulázzal együtt termelődik. Vegyes

flórából 7,5% NaCl tartalmú véres agaron izolálható. Mivel obligát pathogén, foszfátot termel, a mannitot fermentálja.

A *S. aureus* okozta infekciók egy része a bőr, vagy bőrfüggelékek gennyes elváltozásaiként jelentkezik (furunkulus, cellulitis, impetigo, posztoperatív sebfertőzések), más része rendszerint súlyos lefolyású szisztémás fertőzés: szepszis, pneumonia, osteomyelitis, akut endocarditis, myocarditis, pericarditis, cervicitis, meningitis, több szervrendszerre kiterjedő tályogok. Toxinhatás eredménye a staphylococcus ételmérgezés, a toxikus epidermalis necrolysis és a toxikus shock syndroma. Kórházi járványok kórokozójaként a methicillin rezisztens *S. aureus* (MRSA) világszerte súlyos gondot jelent. Gyakorisága emelkedik, már területen szerzett infekciókban is megjelent. Kórházi környezetből kiirtani rendkívül nehéz, az újonnan felvett, a tenyésztés eredményéig elkülönített betegek orrváladékának szűrését és a személyzet kézmintáinak rendszeres ellenőrzését magába foglaló aktív megelőzéssel csökkenthető a járványok kialakulásának a veszélye (Czirók, 1999).

4.2. Antibiotikum rezisztens baktériumok

4.2.1. Az enterococcusok antibiotikum rezisztenciája

Az enterococcusok természetes rezisztenciát mutatnak valamennyi cefalosporinnal, a clindamycinnel és a metronidazollal szemben. Elsősorban a cefalosporinok és a metronidazol elterjedt használatát teszik felelőssé az enterococcusok előretöréséért. A penicillin és származékai iránt sokkal kevésbé érzékenyek, mint az igazi streptococcusok. Ez az alacsony szintű természetes rezisztencia olyan penicillin kötő fehérjék jelenlétének tulajdonítható, amelyek csökkent affinitást mutatnak a β -laktám antibiotikumok iránt (Czirók, 1999). A penicillinekkal szembeni természetes rezisztencia és a később tárgyalandó tolerancia következtében a penicillinszármazékok nem alkalmazhatóak monoterápiaként súlyos enterococcus infekciókban (szepszis, endocarditis, meningitis). Ilyen kórképek kezelésekor a penicillineket aminoglikozidokkal kombináltan kell alkalmazni, annak ellenére, hogy az aminoglikozidok is csak mérsékelten hatékonyak az enterococcusokra. A két szer együtt alkalmazva baktericid szinergizmust mutat. A többi Gram-pozitív coccustól eltérően az enterococcusok eleve rezisztensebbek az aminoglikozidokkal szemben, mivel ezek csak kismértékben jutnak be az enterococcus sejtekbe, ezért az aminoglikozidok sem

alkalmazhatók monoterápiaként enterococcus infekciók kezelésére, hanem csak a sejtfal-aktív penicillinekkal, vagy glikopeptidekkel kombinálva. Mivel az *E. faecium* intrinsic tulajdonsága, hogy egy olyan enzimet is termel, amely a gentamicin és a streptomycin kivételével valamennyi aminoglikozidot hatástalanítja, a gentamicin a kombináció elsőként választandó tagja (Czirók, 1999). Vancomycinnel szemben a két mozgó species, az *E. casseliflavus* és az *E. gallinarum* természetes, alacsony szintű rezisztenciát mutat. A vancomycin csak bakteriosztatikus hatást képes kifejteni az enterococcusokra, ezért önmagában ez sem használható a súlyos infekciók kezelésére, csak aminoglikozidokkal kombinálva. Az *E. faecium* törzsek nagy része rezisztens imipenemre.

Az enterococcusok számos antibiotikummal szemben szereztek rezisztenciát. Magas szintű ampicillin rezisztenciájuk (ampicillin MIC >100 µg/ml) többféle mechanizmus révén jöhet létre. A leggyakoribb a penicillin kötő fehérjék megváltozása, főként *E. faecium*-ban. A panrezisztens *E. faecium* törzsek előretörése aggodalomra ad okot, 31%-uk rezisztens ampicillinre, vancomycinre, gentamicinre és streptomycinre (Edwards, 2000). Először az *E. faecalis* törzsek között észlelték a β -laktamáz termelő törzsek megjelenését. Ez a plazmidon kódolt penicillin rezisztencia gyakran jár együtt magas szintű aminoglikozid rezisztenciával. Manapság már β -laktamáz termelő *E. faecium*-okat is izoláltak. Az enterococcusok toleranciát mutatnak a penicillinek baktericid hatásával szemben. Ez a tolerancia csak olyan enterococcus populációban tapasztalható, amely ki volt téve antibiotikum hatásnak. Az enterococcusok olyan plazmidokat, vagy transzpozonokat szerezhetnek, amelyek aminoglikozid inaktiváló enzimek termeléséért felelősek. Az ilyen enzimeket termelő törzsek magas szinten rezisztensek (MIC >500 µg/ml) az aminoglikozidokkal szemben és következésképpen a kombinációk sem hatnak rájuk. A gentamicinre rezisztens törzsek rezisztensek valamennyi aminoglikozidra, kivéve a streptomycint, amely hatékony lehet egyes izolátumokra. A bifunkcionális enzim 6'-aminoglikozid acetiltranszferáz (AAC-6') 2''-aminoglikozid foszfortranszferáz (APH-2''), amit a 2 kilobázisos fuzionált gén *aacA-aphD* kódol, gentamicin rezisztenciát eredményez enterococcusokban. (az *aacA* gén rezisztenciát eredményez amikacinra, dibekacinra, isepamicinre, netilmicinre, sisomicinre és tobramycinre, az *aphD* pedig gentamicinre, illetve astromycinre)

A sokáig végső megoldásnak tekintett glikopeptid típusú antibiotikumok közül a vancomycint régebben, a teicoplanint újabban alkalmazzák az enterococcus infekciók kezelésében.

4.2.2. A staphylococcusok antibiotikum rezisztenciája

A *S. aureus* elsődlegesen érzékeny az aerob Gram-pozitív baktériumokra ható valamennyi antibiotikumra. Ezekkel szemben a törzsek másodlagos, szerzett rezisztenciát mutatnak. A klinikai izolátumok több mint 95%-a rezisztens penicillinre. Az oxacillin/methicillin rezisztencia aránya emelkedő, egyes kórházakban elérheti a 80%-ot. Penicillinekkal szemben a rezisztencia két típusa fordul elő: exogén β -laktamáz termelése esetén a törzs egyidejűleg rezisztens ampicillinre, carbenicillinre, azlocillinre, mezlocillinre és piperacillinre is, de érzékeny a β -laktamáz gátlókkal kombinált készítményekre. Új penicillin kötő proteinek szintetizálódása esetén a penicillinek támadáspontja változik meg (PBP, "penicillin binding protein"). Ez teljes keresztrezisztenciát eredményez minden β -laktám antibiotikumra, (félszintetikus penicillinek, cefalosporinok, karbapenemek), valamint β -laktamáz inhibitorokat tartalmazó készítményekkel szemben is. Ezek a törzsek gyakran heterorezisztensek, azaz a jelleg a tenyészetnek csak egy kisebb populációjában érvényesül.

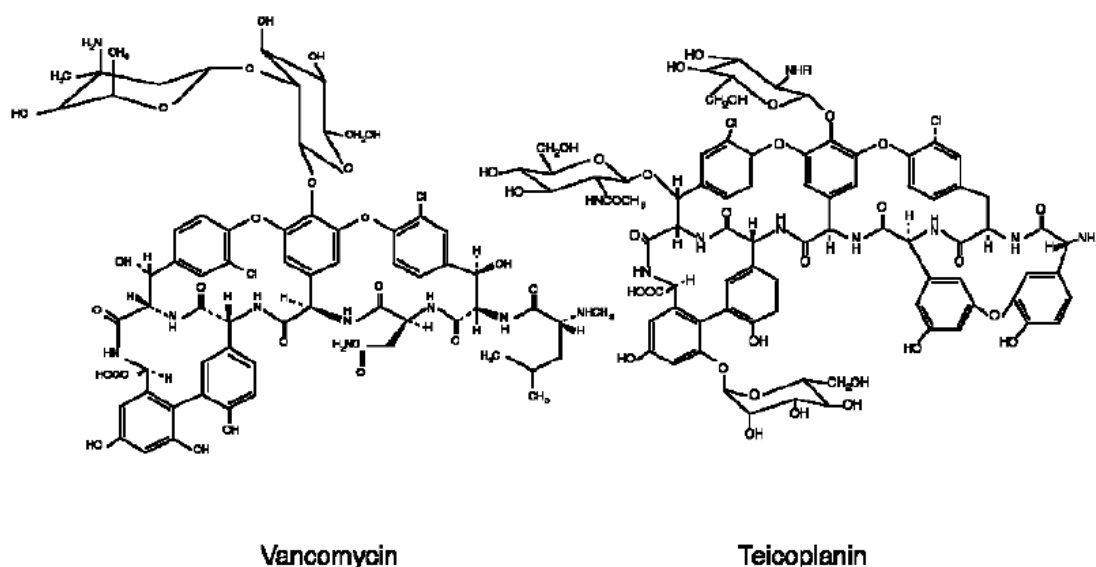
A makrolid-linkóزامid-streptogramin (MLS) antibiotikumokkal szembeni rezisztencia alaptípusa a riboszómális RNS szerkezetének módosulása. Ez teljes, vagy részleges keresztrezisztenciát eredményez az MLS csoport tagjai között: a törzsek rezisztensek egy vagy több makrolid antibiotikummal szemben, de clindamycinre egyaránt lehetnek érzékenyek és rezisztensek is. Aktív transzportnak köszönhető efflux esetén szűk keresztrezisztencia spektrum alakulhat ki. A rezisztencia ritkán előforduló típusai az erythromycin inaktiválása észterezéssel és a sejtbé való bejutásának megakadályozás a membrán-permeabilitás változása révén. Ezek nem járnak együtt más szerekekkel szembeni rezisztenciával.

A clindamycin rezisztencia hátterében enzimés inaktiválás áll, mely lincomycin-koronggal vizsgálva ismerhető fel. A felületi sebfertőzések kezelésében alkalmazott mupirocinnal szembeni rezisztencia a kórházi törzsek között számottevő. A rezisztens törzsekben két izoleucin szintetáz enzim található, a mupirocin csak az egyiknek a működését gátolja (Czirók, 1999).

4.2.3. Glikopeptid antibiotikumok hatásmechanizmusa

A glikopeptid antibiotikumok csoportjába két nagy molekulatömegű (kb. 1450 D) antibiotikum tartozik, az *Amycolatopsis orientalis* által termelt vancomycin, és a hasonló

struktúrájú teicoplanin, amit az *Actynoplanes teichomyceticus* termel (Parenti és mtsai, 1978) (1. ábra).

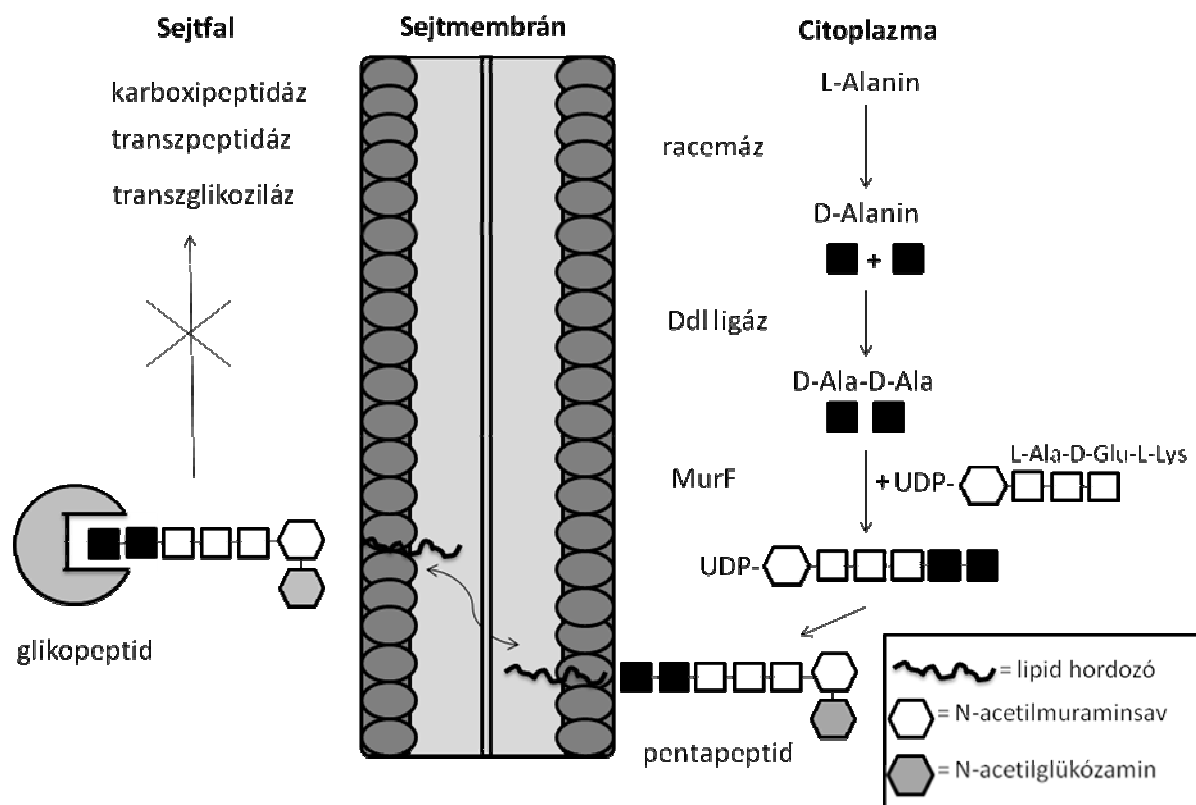


1. ábra. A vancomycin és a teicoplanin szerkezete (Méndez-Álvarez és mtsai, 2000)

Az eredeti készítmények rendkívül oto- és nefrotoxikusak voltak, ezért hosszú ideig csak bélműtétek előkészítésében az anaerob flóra csíraszámának csökkentésére használták. A kromatográfiásan tisztított készítmények hatása többszörösen felülmúlja a nyers termékekét, ugyanakkor kevésbé toxikusak. A szérumszint monitorozása mellett intravénásan, elsősorban infúzióban adhatók (Gergely, 2003).

A baktériumok sejtfal szintézise során a citoplazmában először egy L-alanin molekula átalakul D-alaninná, racemáz enzim segítségével, majd 2 D-alanin molekulát összekapcsol egy ligáz. Ez a dipeptid ezután hozzákapcsolódik egy uracil-difoszfát-N-acetilmuramil-tripeptid-hez, létrehozva az ún. uracil-difoszfát-N-acetilmuramil(NAM)-pentapeptidet, amely egy lipid hordozóhoz kötődik, és itt kapcsolódik hozzá az N-acetil-glükózamin (NAG) is. A lipid hordozó ájtuttatja a prekursorokat a sejtmembrán külső felszínére, ahol megtörténik a transzglikoziláció, a NAG-NAM-pentapeptid beépül a naszcens peptidoglikánba, majd a transzpeptidáció során létrejönnek a keresztkötések (Reynolds és mtsai 1989).

A glikopeptidek a sejtfal peptidoglikán szintézisének késői fázisát gátolják. A Gram-pozitív baktériumok peptidoglikánjának egyik prekursorához, a citoplazma membrán külső részén levő terminális pentapeptidhez, a D-alanil-D-alaninhoz kötődve a sejtfalképződés két alapvető folyamatát, a transzglikozidációt és a transzpeptidációt blokkolják (Courvalin, 2006) (2. ábra).



2. ábra. Peptidoglikán bioszintézis és a vancomycin hatásmechanizmusa.

Az antibiotikum kötődése a késői peptidoglikán prekursorok C-terminális D-Ala–D-Ala végeihez megakadályozza a transzglikoziláz, transzpeptidáz és a D,D-karboxipeptidáz enzimek működését. Ddl ligáz= D-Ala-D-Ala ligáz, MurF= egy szintetáz protein; UDP= uracil difoszfát (Courvalin, 2006 alapján)

Azok a Gram-pozitív baktériumok, amelyeknek a megfelelő terminális pentapeptidje a D-alanin-D-alanin helyett D-alanin-D-laktát, természetes rezisztenciával rendelkeznek a glikopeptidekkel szemben, mert ehhez a pentapeptidhez a glikopeptidek csak gyengén kötődnek. Ilyenek a *Leuconostoc*, a *Pediococcus*, a *Lactobacillus* genusba tartozó törzsek nagy része, az *Erysipelothrix* és a *Nocardia* genusok törzsei. A Gram-negatív baktériumok porinjain a nagymolekulájú glikopeptid molekulák eleve nem tudnak áthatolni, ezért a Gram-negatív baktériumok a *Flavobacterium* genus, és a porphyromonasok kivételével glikopeptid antibiotikumokkal szemben elsődlegesen rezisztensek (Schafer, 1996).

A glikopeptid antibiotikumok baktericid hatásának kialakulásában több mechanizmus játszik szerepet (Gergely, 2003).

1. gátolják a sejtfalszintézist, a peptidoglikán prekursorokkal komplexet képezve
2. a sejtfal-sejtmembránhoz kapcsolódva megváltoztatják a szelektív permeabilitást és az aktív transzportot

A β -laktámokhoz hasonlóan a glikopeptid antibiotikumok az aminoglikozidokkal együtt adva potenciózzák egymás hatását. A liquorba csak gyulladás esetén jutnak be, epében nem érnek el terápiás koncentrációt. A glikopeptidek használatát javasolják MRSA fertőzések, *Clostridium difficile* fertőzések kezelésére, illetve Gram-pozitív baktériumok okozta súlyos fertőzések esetén, amikor a beteg allergiás a β -laktámokra (Méndez-Álvarez és mtsai, 2000).

4.2.3.1. Vancomycin rezisztencia enterococcusokban

A glikopeptidekkel szembeni másodlagos rezisztenciának jelenleg elsősorban az *Enterococcus* és a *Staphylococcus* genusba tartozó speciesek esetében van klinikai jelentősége. Az idetartozó antibiotikumokkal szembeni másodlagos rezisztencia először az enterococcusok területén vált ismertté és ezt a rezisztencia mechanizmust tanulmányozták a legintenzívebben. Amennyiben egy VRE törzs fertőz meg egy beteget, a kórházi kezelés sikertelensége 20%-al nő, a mortalitás pedig 27%-ról 52%-ra nő egy érzékeny törzzsel szemben (Brown és mtsai, 2006).

A rezisztencia kétféle módon valósulhat meg: egyrészt a célmolekulák megváltozásával, másrészt az érzékeny célmolekulák eltávolítása révén (Arthur és mtsai, 1996). Az előbbi mechanizmus során a peptidoglikán prekursor C-terminális D-alaninja helyett vagy D-laktát (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanF* és *vanM* rezisztencia gének esetén), vagy D-szerin (*vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* gének esetén) épül be. A D-alanin-D-laktáthoz 1000-szer kisebb a vancomycin kötődés, míg a D-alanin-D-szerin esetén ez csak 7-szeresére csökken. (Gilmore, 2002). Az érzékeny célmolekuláknak, a D-alaninra végződő prekursoroknak az eltávolítását 2 enzim végezheti: a VanX D,D-dipeptidáz, a D-ala-D-ala dipeptidek hidrolízisét végzi, a VanY D,D-karboxipeptidáz pedig a késői peptidoglikán prekursorok C-terminális végeiről hasítja le a D-alanint (Arthur és mtsai, 1998). A D-alanin-D-szerin ligáz termelő törzsek esetén ezt a 2 funkciót a VanXY látja el.

A rezisztencia osztályozása a ligázok struktúrális génjeinek elsődleges szekvenciáin alapul. Eddig 9 *van* gént írtak le. A leggyakoribb **VanA** típusú rezisztencia többféle *Enterococcus* speciesre, elsősorban az *E. faecalis* és az *E. faecium* fajokra jellemző, és a Tn1546 transzpozon illetve ehhez közeli rokon elemek közvetítik. A rezisztencia konjugációval akár olyan más genusok, mint a *Streptococcus*, a *Staphylococcus* és a *Listeria*, érzékeny egyedeire is átvihető. A VanA típusú glikopeptid rezisztenciát magas szintű

vancomycin (MIC: 64-1000 mg/l) és magas szintű teicoplanin rezisztencia (MIC: 16-512 mg/l) jellemzi. A rezisztenciát mindkét antibiotikum indukálhatja (Werner és mtsai, 2008). A **VanB** típusú rezisztencia esetén a prekursorok szintén D-alanin-D-laktátban végződnek. Az ilyen törzsek vancomycinnel szemben mérsékelten, vagy magas fokban rezisztensek (MIC: 4-1000 µg/ml), teicoplanin iránt in vitro érzékenyek tűnnek (MIC: 0,5-1 µg/ml), a teicoplanin a rezisztenciát nem indukálja. A *vanB* operon plazmidon vagy kromoszómálisan helyezkedik el, szintén transzferábilis. Szekvencia különbségek alapján a *vanB* cluster 3 szubtypusra osztható: *vanB1*, *vanB2* és *vanB3* (Dahl és mtsai, 1999; Patel és mtsai, 1998). A szerzett, **VanD** típusú rezisztencia a konstitutívan termelődő D-alanin-D-laktát peptidoglikán prekursoroknak tulajdonítható. A *vanD* (Perichon és mtsai, 1997) gének által kódolt rezisztencia faktor kromoszómálisan helyezkedik el, és nem transzferábilis. A törzsek D,D-dipeptidáz aktivitása elhanyagolható, mégsem érzékenyek glikopeptidekre, mert a *ddl* génjük különféle mutációk következtében inaktív. A *vanD* cluster konstitutív expresszáldásának oka szintén mutáció a *vanR_D* regulátorban és a *vanS_D* szenzorban (Depardieu és mtsai, 2003; Depardieu és mtsai, 2004a). Ezidáig 5 *vanD* szubtypust fedeztek fel (*vanD1-5*), melyeket *E. faecium*, *E. faecalis* vagy *E. raffinosus* fajokban írtak le (Werner és mtsai, 2008). A **vanF** gén clustert a *Paenibacillus popilliae* nevű biopeszticid baktériumban fedezték fel, de enterococcusokban eddig még nem mutatták ki (Patel és mtsai, 2000). A legújabban felfedezett *van* gén clustert, a **vanM**-et Xiaogang és mtsai jellemezték 2010-ben egy *E. faecium* törzsből. A *vanM* rezisztencia gén szintén egy D-alanin-D-laktát ligázt kódol, a rezisztenciát mindkét antibiotikum indukálhatja, és konjugációval átvihető. A *vanM* pozitív törzsek vancomycinre és teicoplaninra is magas fokban rezisztensek. A glikopeptidekkel szembeni **VanC** típusú rezisztenciáért a D-alanin-D-szerin ligáz a felelős. Elsőként a *vanC1* rezisztencia gént *Enterococcus gallinarum*, később a *vanC2/3* gént *Enterococcus casseliflavus/flavescens* fajokban írtak le (Leclercq és mtsai, 1992; Navarro és Courvalin, 1994). Ez a típusú rezisztencia kizárólag vancomycinnel szembeni, konstitutív vagy indukálható, alacsony szintű (MIC: 2-32 µg/ml) rezisztenciát jelent, az ide tartozó törzsek teicoplanin iránt érzékenyek. A *vanC* operon kromoszómálisan helyezkedik el, nem transzferábilis és az *E. gallinarum/casseliflavus/flavescens* fajok intrinsic tulajdonsága. A **VanE** típusú rezisztencia esetén az *E. faecalis* törzsek csak vancomycinnel szemben mutatnak alacson szintű rezisztenciát (MIC 8-32 µg/ml) . A *vanE* klaszter leginkább a *vanC* operonhoz hasonlít, a peptidoglikán prekursorok D-szerinben végződnek (Fines és mtsai, 1999). A szerzett, **VanG** típust is az indukálható, alacsony szintű vancomycin rezisztencia jellemzi (MIC 16 µg/ml) (McKessar és mtsai, 2000), azonban ez transzferábilis. *vanG1* és *vanG2*

szubtypusok léteznek (Werner és mtsai, 2008; Boyd és mtsai, 2006). Egy **vanL** operont hordozó *E. faecalis* törzset írtak le Boyd és mtsai 2008-ban, melynek vancomycin MIC értéke 8 µg/ml volt. Ez az operon is nagyban hasonlít a *vanC* operonra, azzal a különbséggel, hogy a szerin racemáz aktivitást 2 gén kódolja: *vanTm_L* és *vanTr_L*. A vancomycin rezisztencia típusait és genetikai hátterét a **2. táblázat** foglalja össze.

Néhány VanA illetve VanB típusú enterococcusnál már beszámoltak ún. vancomycin-dependenciáról is (Courvalin, 2006). Ezeknek a törzseknek szükségük van a glikopeptidek jelenlétére a növekedéshez, mivel különféle mutációk következtében nincs normálisan működő D-alanin-D-alanin ligázuk.

A vancomycin rezisztencia legaggasztóbb jellemzői: (1) a szinergizmus hiánya aminoglikoziddal történő kombináció esetén, (2) számos antibiotikummal szembeni szimultán rezisztencia magas frekvenciája, (3) annak a veszélye, hogy a rezisztencia átterjed más (*S. aureus*, *S. pneumoniae*) fajokra.

Az első vancomycin rezisztens enterococcus (VRE) fajok megjelenését Európában 1988-ban közzétették (Leclercq és mtsai, 1988; Uttley és mtsai, 1988). Hasonló törzseket találtak később az Egyesült Államok keleti partjainál (Frieden és mtsai, 1993).

A VRE epidemiológiáját tekintve megállapítható volt, hogy más eredetű a VRE megjelenése és elterjedése az Amerikai Egyesült Államokban és más Európában. Míg az USA-ban a nagymértékű antibiotikum fogyasztás játszik szerepet, Európában az avoparcin (hozamfokozó glikopeptid) állati takarmányba keverése miatt jelent meg az állatok, majd az ember béltraktusában (Mannu és mtsai, 2003).

Az avoparcint Magyarországon nem használták olyan széleskörűen, mint máshol, talán ezzel is magyarázható, hogy a VRE számottevő járványt Magyarországon eddig nem okozott. Az avoparcin használatát 1998-ban betiltották (Ghidán és mtsai, 2008).

A VRE eddig csak szórványosan fordult elő Magyarországon. Az első hazai PCR technikával igazolt esetet Ghidán és mtsai közzétették 2000-ben. Knausz és mtsai 2003-ban ugyancsak PCR-rel igazolt VRE izolálásáról számoltak be. 2005-ben írták le az első hazai vancomycin rezisztens *E. faecium* által okozott epidémiát (Böröcz és mtsai, 2005).

2. táblázat. A vancomycin rezisztencia típusai

	Szerzett rezisztencia							Intrinsic rezisztencia
Fenotípus	VanA	VanB	VanD	VanE	VanG	VanL	VanM	VanC
ligáz gén	<i>vanA</i>	<i>vanB1-3</i>	<i>vanD1-5</i>	<i>vanE</i>	<i>vanG1-2</i>	<i>vanL</i>	<i>vanM</i>	<i>vanC1-2/3</i>
ligáz	D-Ala-D-laktát	D-Ala-D-laktát	D-Ala-D-laktát	D-Ala-D-szerin	D-Ala-D-szerin	D-Ala-D-szerin	D-Ala-D-laktát	D-Ala-D-szerin
vancomycin MIC mg/l	64-1000	4-32(-1000)	64-128	8-32	16	8	>256	2-32
teicoplanin MIC mg/l	(4-)16-512	0,5-1	4-64	0,5	0,5	S	(0,75)>64	0,5-1
expresszió	indukálható	indukálható	konstitutív	indukálható	indukálható	indukálható	indukálható	konstitutív/ indukálható
lokalizáció	plazmid/ kromoszóma	plazmid/ kromoszóma	kromoszóma	kromoszóma	kromoszóma	kromoszóma?	kromoszóma	kromoszóma
átvitel konjugációval	+/-	+/-	-	-	+	-	+	-
előfordulás	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. raffinosus</i> <i>E. avium</i> <i>E. mundtii</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. durans</i> <i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i>

S= érzékeny

4.2.3.2. Vancomycin rezisztencia staphylococcusokban

A vancomycin-intermediate *S. aureus* (VISA) megnevezésnél talán jobb a glikopeptid-intermediate *S. aureus* (GISA) kifejezés, hiszen pontosabban leírja ezeknek a törzseknek vancomycinnel és teicoplaninnal szembeni, együttesen megjelenő csökkent érzékenységét. De, míg a csökkent teicoplanin érzékenység jelen lehet csökkent vancomycin érzékenység nélkül, addig a VISA törzsekben ezidáig mindig kimutatható volt a csökkent teicoplanin érzékenység is.

A vancomycint 1958-ban vezették be a klinikai gyakorlatba, de a kutatóknak már ezt megelőzően sikerült laboratóriumi körülmények között kifejleszteni a vancomycin rezisztenciát staphylococcusokban (Geraci, 1956; Ziegler, 1956). A *Staphylococcus haemolyticus* volt az első olyan Gram-pozitív patogén, amely glikopeptid rezisztenciát szerzett (korábban, mint más *Staphylococcus* vagy *Enterococcus* speciesek) (Froggatt és mtsai, 1989; Biavasco és mtsai, 2000). A csökkent teicoplanin érzékenységről *S. aureus*-ban hamarabb beszámoltak már, mint a csökkent vancomycin érzékenységről (Mainardi és mtsai, 1995). Jelentős aggodalomra adott okot, amikor 1997-ben Japánban leírták az első vancomycinre csökkent érzékenységet mutató *S. aureus*-t (Hiramatsu és mtsai, 1997a, 1997b). Az első közleményben egy olyan MRSA törzset jellemeztek, amelynél a populáció egy része magasabb MIC értékkel rendelkezett (2-9 mg/L), tehát a törzs heterogén rezisztenciát mutatott (hVISA). A második közleményben egy VISA törzs izolálásáról számoltak be. Kiderült, hogy a két törzs PFGE mintázata azonos volt, tehát igazolódott, hogy a heterogén rezisztenciából képes kialakulni a homogén rezisztencia. Ezeket a közleményeket hamarosan újabbak követték a világ különböző tájairól (CDC, 1997; Ploy és mtsai, 1998; Garnier és mtsai, 2006; Gould, 2008). Az első hazai hetero-VISA törzset, melyet egy fatális kimenetelű fertőzésből izoláltak, 2008-ban írták le (Tóth és mtsai, 2008).

A magas szinten vancomycin rezisztens *S. aureus* (VRSA) törzsek, -amelyek az enterococcusoktól szerezték a *vanA* rezisztencia gént- először 2002-ben jelentek meg az Egyesült Államokban (CDC, 2002; Chang és mtsai, 2003). Egészen mostanáig, összesen 9 amerikai, egy indiai és egy iráni VRSA esetről számoltak be (Howden és mtsai, 2010).

A rezisztencia mechanizmusa különbözik a hVISA/VISA illetve VRSA törzsek esetén. Az utóbbinál a glikopeptid célmolekulája változik meg (az enterococcusoknál leírt módon), míg az előbbieknél alacsony szintű rezisztenciája multifaktoriális eredetű. Háttérében, a baktérium sejtfalban bekövetkező szerkezeti változások állhatnak úgymint; a sejtfal vastagodása, csökkent mennyiségű és megváltozott szerkezetű keresztkötések kialakulása,

fals antibiotikum kötőhelyek megjelenése, csökkent protein A termelés, és a sejtfal prekursorok fokozott termelése. Egyes vizsgálatok a PBP2 koncentrációjának emelkedését is detektálták. Ezeken kívül a törzsek megnövekedett biofilmképző képességet, illetve csökkent autolízist mutathatnak (Gemmell, 2004; Howden és mtsai, 2010).

A homogén szintű mérsékelt érzékenység kialakulása több lépcsőben megy végbe, mint a heterogén, és így ritkábban is fordul elő. Míg a VISA törzsek előfordulása ritka, addig a különböző felmérések a vizsgált MRSA törzsek 5-6%-át találták hGISA fenotípusúnak (Appelbaum, 2007; Liu és Chambers, 2003; Gould, 2008).

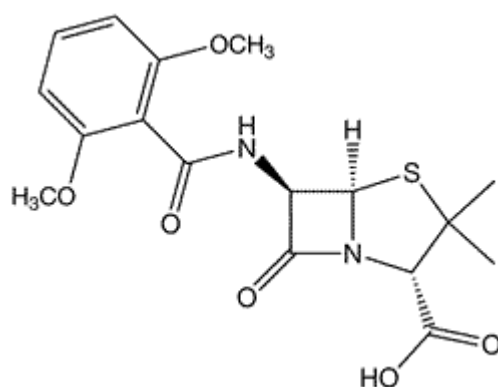
4.2.4. β -laktám antibiotikumok hatásmechanizmusa

Az első, terápiában is alkalmazott antibiotikum a Fleming által 1929-ben felfedezett penicillin volt. A 6-aminopenicillánsav és a penicillinek nagyfokú labilitását a négyes tagból álló β -laktám-gyűrű okozza, amely sav-, lúg- vagy hő hatására felhasad. Ezt a kötést támadja meg a mikroorganizmusok által termelt enzim, a penicillináz, vagy más néven β -laktamáz. A heterociklusos mag egymaga azonban hatástalan, s antibakteriális tulajdonságot csak akkor nyer, ha a szabad aminocsoport egyik hidrogénjének helyére valamilyen savmaradék- acil- vagy arilgyök- lép, és ezzel penicillinné lesz.

A penicillin a sejtfal bioszintézisben az ún. transzpeptidációs folyamatot gátolja. A gátlást azzal magyarázzák, hogy a penicillin szerkezetileg analóg a peptidoglikán pentapeptid-oldalláncának terminális D-alanil-D-alanin csoportjával. A transzpeptidáz enzimek melyek megkötik, penicillin binding protein (PBP) néven is ismertek. A penicillin klinikai alkalmazását megelőző időszakban a staphylococcusok között igen ritka volt a penicillinázt termelő törzs. A széles körű alkalmazásával a bőrön az orr- és garatüregben élő érzékeny staphylococcusok kipusztultak, és csak a ritka penicillinázt termelők maradtak életben. Ezzel olyan szelekció jött létre, amelynek során a rezisztens törzsek mind hordozás, mind pedig betegségokozás révén fokozatosan kiszorították az érzékenyeket. A penicillinázt termelő törzsek elleni küzdelemben van elsőrendű fontossága a penicillinázstabil félszintetikus penicillineknek. Közéjük tartoznak az olyan származékok, mint a methicillin (dimetoxifenil-penicillin) és az oxacillin (izoxazolil-penicillin) (Gergely, 2003).

4.2.4.1. Methicillin rezisztencia staphylococcusokban

A methicillint először 1959-ben vezették be, a penicillin-rezisztens *S. aureus* által okozott infekciók kezelésére (**3. ábra**). Az első MRSA törzset két évvel később, 1961-ben izolálták Angliában, és azóta is egyre nő az incidenciája. Az MRSA jelenleg a leggyakrabban izolálható antibiotikum rezisztens patogén a világ számos részén (Ippolito, 2010). Az Európai Unióban évi több mint 150,000-re becsülik az MRSA infekciók előfordulását (Köck, 2010).



3. ábra. A methicillin szerkezete

Magyarországon az első MRSA által okozott járvány 1993-1994-ben volt (de Lencastre és mtsai, 1997). A sokáig csak nosokomiális patogénnek tartott MRSA (hospital-acquired: HA-MRSA), ma már előfordul otthon szerzett infekciókban is. Az ilyen community-acquired MRSA (CA-MRSA) törzsek a 1990-es évek közepén jelentek meg és világszerte elterjedtek. Különösen súlyos, rapid lefolyású sebfertőzéseket okoznak, feltételezhetően speciális virulencia faktorokkal, pl: Panton Valentin Leukocidin.

Az MRSA törzsek egy olyan módosult penicillin-kötő fehérjét termelnek (PBP2a vagy más néven PBP2'), amelynek csökkent az affinitása a legtöbb félszintetikus penicillin, pl: methicillin, nafcillin, oxacillin, valamint a legtöbb cephem antibiotikum iránt (IWG-SCC, 2009).

A PBP2a-t vagy PBP2'-t a *mecA* gén kódolja, amely egy mobilis genetikai elem, a Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*-en (SCC*mec*) helyezkedik el. A methicillin-rezisztens staphylococcus vonalak felbukkanása az SCC*mec* elemeknek az érzékeny törzsek kromoszómájába történő inzerációjának tulajdonítható. Az első SCC*mec* elemet Ito és mtsai jellemezték 1999-ben. Jelenleg több SCC*mec* típust ismerünk, melyeknek számos variánsai

léteznek. Közös bennük, hogy hordoznak egy *mec* gén komplexet (*mec*), egy *ccr* gén komplexet (cassette chromosome recombinase: *ccr*), mindkét végükön hordoznak direkt ismétlődő szekvenciákat illetve komplementer szekvenciákat, és az orfX 3' végén lévő ISS-be (integration site sequence) képesek integrálódni. Ezeken kívül nem esszenciális J régiók („junkyard”, vagy újabban „joining” régiók) is megfigyelhetők, amelyek alapján különböző szubtipusok vannak (www.staphylococcus.net). A különféle *mec* osztályok és *ccr* típusok alapján az alábbi SCCmec típusokat ismerjük *S. aureus*-ban (**3. táblázat**):

3. táblázat. A jelenleg ismert SCCmec típusok

SCCmec típus	<i>ccr</i> gén komplex	<i>mec</i> gén komplex
I	1 (A1B1)*	B
II	2 (A2B2)	A
III	3 (A3B3)	A
IV	2 (A2B2)	B
V	5 (C)	C2
VI	4 (A4B4)	B
VII	5 (C)	C1
VIII	4 (A4B4)	A
IX	1 (A1B1)	C2
X	7 (A1B6)	C1
XI	8 (A1B3)	E

* A zárójelben a *ccr* gének allotípusai állnak (www.SCCmec.org).

A heterogén rezisztenciát mutató törzsek esetén a sejtek többsége (99,9%-a) érzékeny a β -laktámok alacsony koncentrációira, és csak egy kis százalékuk (kb 1 a 10^6 -ból) nő 50 μ g/ml, vagy annál nagyobb methicillin koncentrációnál. Azonban a heterogén törzsek gyakran homogénnek tűnhetnek bizonyos tenyésztési körülmények között, Pl: ha NaCl-al vagy szukrózzal kiegészített hipertóniás tápközeget használunk, vagy 30°C-on inkubálunk. EDTA (pH 5,2) hozzáadásával, vagy 37-43°C-os inkubálásnál a heterogén fenotípus dominál.

Meg kell említeni még az ún. borderline (vagy alacsony szintű) methicillin-rezisztenciát is, amikor a törzsek minimális gátló koncentrációja éppen az érzékenységi határértéknél, vagy csak enyhén magasabban van. A *mecA*-t hordozó BORSA törzsek extrém módon heterogén rezisztensek, PBP2a termelők. A *mecA* negatív BORSA törzsek között azonban nem találunk erősen methicillin-rezisztens klónokat; a rezisztencia oka a módosult PBP-k, vagy pedig β -laktamáz túltermelés (Chambers, 1997).

4.3. CÉLKITŰZÉSEK

A Debreceni Egyetem Orvos-és Egészségtudományi Centrum klinikáiról az Orvosi Mikrobiológiai Intézet Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumába évente körülbelül 30,000 klinikai minta érkezik. Munkánk során vizsgálni kívántuk a legjelentősebb Gram-pozitív patogén baktériumok; a vancomycin rezisztens enterococcusok (VRE), illetve a methicillin-rezisztens *S. aureus* (MRSA) előfordulását az egyetem klinikáin, valamint célunk volt az izolált törzsek epidemiológiai és molekuláris szintű jellemzése.

Vancomycin-rezisztens enterococcus törzsek vizsgálata

Célkitűzések:

- a VRE törzsek szűrése, incidenciájának felmérése, és species szintű identifikálása a 2004. és 2009. közötti időszakban begyűjtött beteganyagból.
- a törzsek antibiotikum érzékenységének vizsgálata, és az antibiotikum rezisztencia háttérében álló gének molekuláris biológiai módszerekkel történő azonosítása.
- a törzsek közötti genetikai rokonság feltárása, epidemiológiai jelentőségük megítélése.
- VRE-vel fertőzött betegek esetének kivizsgálása.
- szerettünk volna utánajárni, hogy a VITEK2 automata helyettesítheti-e a glikopeptid MIC meghatározáshoz rutinszerűen alkalmazott E-teszt módszert.

Methicillin-rezisztens *S. aureus* törzsek vizsgálata

Célkitűzések:

- az MRSA törzsek szűrése, előfordulásuk felmérése a DEOEC klinikáról érkező mintákból.
- 2005-ben izolált MRSA törzsek jellemzése: antibiotikum rezisztencia profil készítése.
- genotipizálási vizsgálatok, a törzsek epidemiológiájának megértése és az MRSA továbbterjedésének megakadályozása céljából.
- a különleges antibiotikum rezisztenciával rendelkező *S. aureus* okozta fertőzések analízise.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Anyagok

5.1.1. Vegyszerek, enzimek, kitek

Vegyszerek: i-propanol, 70 %-os etanol, 100 bp DNS létra (Invitrogen), „NO34OS λ ladder PFG marker” (New England Biolabs), etidium-bromid (Serva), GelRed (Sigma), agaróz (Bio-Rad), „chromosomal-grade” alacsony olvadáspontú agaróz (Bio-Rad), RED Taq™ Ready Mix (Sigma), DNáz mentes víz, antibiotikum korongok (Oxoid),

Enzimek: lysostaphin (Sigma), proteináz K (Merck), RNáz A (Sigma), *EcoRI*, *Sall*, *HindIII*, T4 ligáz (Promega), *SmaI*, mutanolysin (Sigma), lysozyme (Sigma), Taq polimeráz (Fermentas), Pfu polimeráz (Fermentas)

Kitek: E-teszt (AB Biodisk), „pGEM-T easy” vektor (Promega), Microcon Ultracel YM-100 oszlop (Millipore), QiaQuick gél extrakciós készlet (Qiagen), „Wizard SV gel and PCR clean-up system” készlet (Promega), „QIAprep Spin Miniprep” készlet (Qiagen), Cryobank gyöngyök (Mast Diagnostica), Streptex agglutinációs készlet (Murex Biotech Ltd).

5.1.2. Pufferek, oldatok

Steril sóoldat: 0,45%-0,50% NaCl vizes oldata, pH 4,5-7,0

Szuszpenzió medium (bioMerieux): demineralizált víz

50 x TAE (TRIS-acetát-EDTA puffer): 242 g Tris, 57,1 ml 96 % ecetsav, 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,05, desztillált víz 1000 ml-ig

TE puffer: 10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0

PBS: NaCl 137 mM/L, KCl 2,7 mM/L, Na₂HPO₄ x 2 H₂O 8,1 mM/L, KH₂PO₄ 1.76 mM/L, pH= 7,4

EC lízis puffer: 1 M NaCl, 100 mM EDTA, 6 mM TRIS, 0.5% Brij58, 0.2% deoxikolát, 0.5% N-lauroil szarkozin, pH=7.6

ESTN puffer: 0.5M EDTA, 1% N-lauroyl sarcosine, 10 mM TRIS, 20 mM NaCl, pH=8.0

0,5 x TBE: 45 mM Tris, 2 mM EDTA, 45 mM ecetsav

CS puffer: 1 M NaCl, 10 mM TRIS, pH=8.0

ES puffer: 0.5 M EDTA, 1 % N-lauroil szarkozin

5.1.3. Tápoldatok, táptalajok

A táptalajokat 116°C-on 30 percig autoklávoztuk.

BEA agar: 56,7g BEA-agart (Bio-Rad) 1 liter vízben feloldunk, Koch fazékban felforralunk, Widal csövekbe szétmérünk, autoklávozzuk, Russel módjára ferdítjük. BEA-agar összetétele: pancreas emésztett kazein 17g, marhahúskivonat 3g, élesztőkivonat 5g, porított marhaepe 10g, NaCl 5g, eszculin 1g, vas-citrát 0,5g, agar 15g, nátrium-azid 0,15g

(Brain Heart Infusion) folyékony tápoldat: 37g BHI-t (Oxoid) 1 liter ioncserélt vízben feloldunk, szétmérünk és autoklávozzuk. BHI összetétele: 27,5g szubsztrát (agykivonat, szív kivonat és peptonok), 2g glükóz, 5g NaCl, 2,5g Na₂HPO₄

BHI agar: 47g BHI-agart (Oxoid) 1 liter ioncserélt vízben feloldunk, Petri-csészébe kiöntünk. A screeneléshez az agarhoz kiöntés előtt 6 µg/ml vancomycint adunk. BHI-agar összetétele: BHI+ 15g agar

Columbia agar (Merck): peptonkeverék 23g, keményítő 1g, NaCl 5g, agar 13g.

Csokoládé agar: 42g Columbia agart 1 liter ioncserélt vízben feloldunk, 100°C-on hozzáadunk 5-10% steril defibrinált birkavért, Petri-csészébe öntjük.

Eozin-Metilénkék agar: 37,5g EMB-t (Himedia) 1 liter vízben feloldunk, szétöntés előtt késhegynyi nátrium-lauril-szulfátot adunk hozzá. EMB összetétele: eozin- 0,4g, pepton 10g , K₂HPO₄ 2g, laktóz 10g, metilénkék 0,065g, agar 15g.

LB (Luria-Bertani-féle) agar: 10g tripton, 5g élesztőkivonat, 10g NaCl, 1,5 % agar 1000 ml oldatban, pH 7,0.

LB tápoldat: 10g tripton, 5g élesztőkivonat, 10g NaCl 1000 ml oldatban, pH 7,0.

SOC oldat: 20 g/l tripton, 2 g/l élesztőkivonat, 0,6g NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glükóz, pH 7,0.

Só mannit agar (Becton Dickinson BBL™): 5g/l kazein, 5g/l állati szövet, 1 g/l marhahús kivonat, 10g/l D-Mannitol, 75g/l NaCl, 15 g/l agar, 25mg/l fenol-vörös.

MRSASelect szűrőlemez (Bio-Rad): pepton 18.5g/l, kromogén szubsztrát 0.2g/l, szilika 15g/l, agar 15g/l, nátrium piruvát 1g/l, sókeverék 25g/l, antimikrobiális és antifungális szerek 0.1g/l.

Mueller-Hinton agar (Oxoid): marhahús kivonat 30g/l, kazein hidrolizátum 17,5g/l, keményítő 1,5g/l, agar 17g/l, pH 7,4. 28g Mueller-Hinton agart 1 liter ioncserélt vízben oldunk.

Véres agar: 42g Columbia agart 1 liter ioncserélt vízben feloldunk, 45°C-50°C-on hozzáadunk 5-10% defibrinált birkavért, Petri-csészébe öntjük.

5.1.4. Oligonukleotid primerek

Az SP6 és T7 primereket a DNS szekvenáláshoz az MTA SZBK szekvenáló laboratóriuma biztosította. A többi oligonukleotid primert az Integrated DNA Technologies Incorporated-től rendeltük (Bio-Science Kft). Az *E. faecalis* és *E. faecium* *ddl* génekre, valamint a *van* génekre specifikus primereket Depardieu és mtsai (2004) alapján terveztük (4. és 5. táblázat).

4. táblázat. Rezisztencia gének detektálására használt primerek

Gén	Primer kód	Szekvencia (5'→3')	PCR termék (bp)
<i>vanA</i>	EA1(+)	GGGAAAACGACAATTGC	732
	EA2(-)	GTACAATGCGGCCGTTA	
<i>vanB</i>	EB3(+)	ACGGAATGGGAAGCCGA	647
	EB4(-)	TGCACCCGATTTTCGTTC	
<i>vanC1/2</i>	EC5(+)	ATGGATTGGTAYTKGTAT	815/827
	EC8(-)	TAGCGGGAGTGMCYMGTA	
<i>vanD</i>	ED1(+)	TGTGGGATGCGATATTCAA	500
	ED2(-)	TGCAGCCAAGTATCCGGTAA	
<i>vanE</i>	EE1(+)	TGTGGTATCGGAGCTGCAG	430
	EE2(-)	GTTACCAGCTAAACTAT	
<i>vanG</i>	EG1(+)	CGGCATCCGCTGTTTTTGA	941
	EG2(-)	GAACGATAGACCAATGCCTTT	
<i>aacA-aphD</i>	acph-F	GATTTGCCAGAACATGAATTACAC	168
	acph-R	ATCATAACCACTACCGATTATTC	

K=G/T, M=A/C, Y=C/T

5. táblázat. Fajspecifikus PCR reakció során használt primerek

Gén	Baktérium	Primer kód	Szekvencia (5'→3')	PCR termék (bp)
<i>ddl</i>	<i>E. faecalis</i>	DD1-3(+)	CACCTGAAGAAACAGGC	475
		DD3-2(-)	ATGGCTACTTCAATTTCACG	
	<i>E. faecium</i>	FAC1-1(+)	GAGTAAATCACTGAACGA	1,091
		FAC2-1(-)	CGCTGATGGTATCGATTCAT	
<i>sodA</i>	<i>E. faecalis</i>	FL1	ACTTATGTGACTAACTTAACC	360
		FL2	TAATGGTGAATCTTGGTTTGG	
	<i>E. casseliflavus</i>	CA1	TCCTGAATTAGGTGAAAAAAC	288
		CA2	GCTAGTTTACCGTCTTTAACG	
	<i>E. gallinarum</i>	GA1	TTACTTGCTGATTTTGATTCTG	173
		GA2	TGAATTCTTCTTTGAAATCAG	

K=G/T, M=A/C, Y=C/T

A *sodA* génekre specifikus primereket Jackson és mtsai (2004) alapján használtuk (**5. táblázat**). A bifunkcionális aminoglikozid rezisztencia génre (*aacA-aphD*), tervezett primerpárt kis mértékben módosítottuk oly módon, hogy T_m pontjuk egymáshoz közelebb essen és 3'-végükön G, vagy C nukleotidot tartalmazzanak (**4. táblázat**) (Yean és mtsai, 2007). Az MLST kísérletek során használt primereket a www.mlst.net webhely szerint alkalmaztuk (**6. és 7. táblázat**) (Aanansen és Spratt, 2005; Enright és mtsai, 2000).

6. táblázat. *E. faecalis* MLST során használt primerek

Gén	Primer kód	Szekvencia (5'-3')
glükóz-6-foszfát dehidrogenáz	<i>gdh-1</i>	GGCGCACTAAAAGATATGGT
	<i>gdh-2</i>	CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA
gliceraldehyd-3-foszfát dehidrogenáz	<i>gyd-1</i>	CAAACTGCTTAGCTCCAATGGC
	<i>gyd-2</i>	CATTCGTTGTCATACCAAGC
foszfát "ATP binding cassette" transzporter	<i>pstS-1</i>	CGGAACAGGACTTTTCGC
	<i>pstS-2</i>	ATTTACATCACGTTCTACTTGC
glükokináz	<i>gki-1</i>	GATTTTGTGGGAATTGGTATGG
	<i>gki-2</i>	ACCATTAAGCAAAATGATCGC
sikiminsav-5-dehidrogenáz	<i>aroE-1</i>	TGGAAAACCTTTACGGAGACAGC
	<i>aroE-2</i>	GTCCTGTCCATTGTTCAAAAGC
xantin foszforiboziltranszferáz	<i>xpt-1</i>	AAAATGATGGCCGTGTATTAGG
	<i>xpt-2</i>	AACGTCACCGTTCCTTCACTTA
acetyl-koenzim-A acetyltranszferáz	<i>yqiL-1</i>	CAGCTTAAGTCAAGTAAGTGCCG
	<i>yqiL-2</i>	GAATATCCCTTCTGCTTGTGCT

7. táblázat. *S. aureus* MLST során használt primerek

Gén	Primer kód	Szekvencia (5'-3')
karbamát kináz	<i>arc up</i>	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC
	<i>arc dn</i>	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG
sikiminsav-dehidrogenáz	<i>aro up</i>	ATCGGAAATCCTATTTTACATTC
	<i>aro dn</i>	GGTGTGTATTAATAACGATATC
glicerol kináz	<i>glp up</i>	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC
	<i>glp dn</i>	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC
guanilát kináz	<i>gmk up</i>	ATCGTTTTATCGGGACCATC
	<i>gmk dn</i>	TCATTAACCTACAACGTAATCGTA
foszfát acetyltranszferáz	<i>pta up</i>	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG
	<i>pta dn</i>	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA
triózfoszfát izomeráz	<i>tpi up</i>	TCGTTTATTCTGAACGTCGTGAA
	<i>tpi dn</i>	TTTGACCTTCTAACAATTGTAC
acetyl-koenzim-A acetyltranszferáz	<i>yqi up</i>	CAGCATACAGGACACCTATTGGC
	<i>yqi dn</i>	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC

5.1.5. Baktérium törzsek

Kontroll törzsek. Munkánk során a következő kontroll törzseket használtuk: MRSA (ATCC 43300), MSSA (ATCC 25923), *E. faecalis* ATCC 51299 (*vanA* gént hordozó törzs), *E. faecalis* ATCC 29212 (vad típusú törzs). A DNS klónozáshoz az *E. coli* DH5 α törzset használtuk. A populáció analízis során a *S. aureus* Mu3 (ATCC 700698, hVISA), *S. aureus* ATCC 29213 (vancomycin érzékeny törzs, VSSA) törzseket használtuk.

Klinikai minták. A Debreceni Egyetem Orvos-és Egészségtudományi Centrum klinikáiról érkezett vizsgálati anyagokból az Orvosi Mikrobiológiai Intézet Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumában 2004 januárja óta szűrjük az enterococcus törzseket, 2009 dec 31-ig 7271 enterococcus tenyésztett ki. A vizsgálatainkba bevont MRSA törzseket 2000 január 1. és 2005 december 31. között gyűjtöttük. A hVISA esetekből származó törzseket 2007, 2008 és 2009 években izoláltuk.

5.2. MÓDSZEREK

5.2.1. Klinikai minták szűrése, tenyésztése

A laborba érkezett vizsgálati anyagokat általában dúsítjuk, úgynevezett Brain-Heart Infusion (BHI) folyékony táptalajban, majd kioltjuk véres agar, csokoládé agar és eozin-metilénkék agar táptalajokra.

5.2.1.1. Rezisztens enterococcus törzsek azonosítása

16-18 órás inkubálás után az enterococcus törzsek a véres és a csokoládé táptalajon kinőnek, míg az eozin-metilénkék agaron nem. Véres agaron jellegzetes telepmorfológiát mutatnak: szürkésfehér, 1-2 mm átmérőjű, csillogó, közepén tömörebb állományú telepeket képeznek. A Gram pozitív, kataláz negatív coccusokat szelektív táptalajra, a bile-eszkulin-azid (BEA) agarra oltottuk, mely epét és eszkulint tartalmaz. Az eszkulin hidrolízise révén az enterococcusok fekete telepeket képeznek. A szénhidrát bontás vizsgálatát arabinóz és szorbit táptalajokban nézzük (Czirók, 1999). A Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumban kitenyésztett enterococcus törzsek további vizsgálata 6 µg/ml vancomycint tartalmazó BHI szűrőlemezen történik. A törzsekből 0,5 McFarland sűrűségű hígítást végeztünk, 100µl baktérium szuszpenziót szélesztettünk a lemezekre, majd egy éjszakán át inkubáltuk 37°C-on. A lemezen növekedést mutató törzseket Cryobank gyöngyökön lefagyasztva -20°C-on tároltuk (Mast Diagnostica).

5.2.1.2. Rezisztens staphylococcus törzsek azonosítása

16-18 órás inkubálás után a *S. aureus* véres agaron 2-3 mm átmérőjű, enyhén domború, sima aranysárga telepeket képez, β-hemolízist mutat. A Gram pozitív, kataláz pozitív coccusok mannit fermentálását, só mannit agaron vizsgáltuk (Becton Dickinson). A sejtfelszínhez kötött koaguláz, vagy „clumping factor” detektálását Staphaurex kittel (Remel) végeztük. A *S. aureus* gyanús törzsek faji azonosítását cső koaguláz teszttel is megerősítettük. A methicillin-rezisztencia kimutatásához oxacillin korong diffúziót indítottunk; amennyiben a gátlási zóna >13 mm, vagy ennél kisebb, de a gátlási zónán belül pontszerű növekedés észlelhető, a törzset tovább kell vizsgálni oxacillin E-teszttel a pontos MIC meghatározás

érdekében. Az MRSA gyanús törzseket MRSASelect (Bio-Rad) szűrőlemezre oltottuk, majd 18-28 óra múlva olvastuk le az eredményt: a methicillin-rezisztens *S. aureusok* rózsaszín telepeket képeznek.

A vancomycin-rezisztencia kimutatásához a hagyományos vancomycin E-teszt módszert használtuk. A csökkent vancomycin érzékenységre gyanús törzseket ezután makro E-teszt módszerrel is megvizsgáltuk. A GISA/hGISA gyanús törzseket módosított populáció analízis vizsgálatra küldtük az Országos Epidemiológiai Központba. A törzseket -80°-on tároltuk, 15% glicerinben.

5.2.2. Antibiotikum érzékenység vizsgálata

5.2.2.1. Korongdiffúzió

A korongdiffúzió a rutin antibiotikum érzékenységi vizsgálatok leggyakoribb, nemzetközi szinten elfogadott és alkalmazott módszere. A Kirby-Bauer-féle korongdiffúziós módszer során az elérhető vérszintnek megfelelő antibiotikum-koncentrációval átitatott szűrőpapírkorongokkal vizsgáltuk meg a kórokozók érzékenységét a gyártó leírása szerint (Oxoid). A kapott zónaátmérőt a kontroll törzsekkel végzett, standardizált körülmények között kapott eredményekhez hasonlítva érzékeny, mérsékelten érzékeny és rezisztens kategóriákat kaptunk. Hangsúlyozni kell, hogy a módszer nem alkalmas a staphylococcus és enterococcus törzsek glikopeptid rezisztenciájának meghatározására. Az inkubációs hőmérséklet a CLSI által megadott $35^{\circ}\text{C} \pm 2$ vagy a hazai gyakorlatban elterjedt $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, kivéve a staphylococcusokat, amelyeknek methicillin rezisztenciája jobban kifejeződik, ha az inkubációs hőmérséklet $33\text{-}35^{\circ}\text{C}$ közé esik. Az inkubáció időtartama általában 16-18 óra, kivételek: a staphylococcusok oxacillin, daptomycin és glikopeptid, az enterococcusok daptomycin és glikopeptid érzékenységének vizsgálatakor az inkubációs idő teljes 24 óra. A baktérium populáción belül másodlagosan kialakuló rezisztens szubpopuláció telepeinek megjelenése, (heterorezisztens törzs) leginkább a staphylococcusok oxacillin, és az enterococcusok vancomycin érzékenységének vizsgálata során észlelhető.

5.2.2.2. E-teszt

Az E-teszt egy kvantitatív és könnyen kivitelezhető módszer az antibiotikum érzékenység meghatározására. Sok esetben ez a legjobb módszer a MIC megállapítására, mivel korongdiffúzió alkalmazásakor a nagyméretű molekulák (pl: glikopeptidek) diffúziója nem megfelelő, mikrodilúció esetén pedig az alacsony inokulum koncentráció szuboptimális

lehet az alacsony szintű rezisztencia detektálásához. A gyors automata rendszerek sem mindig megbízhatóak, például késleltetett expresszió illetve indukálható rezisztencia kimutatása esetén. Az E-teszt csík egyik felszínére az antibiotikumot meghatározott koncentráció grádiensnek megfelelően vitték fel. Az antibiotikum koncentrációkat a csíkon feltüntetett skála mutatja (AB Biodisk). A különböző antibiotikumokat hordozó E-tesztek esetén azonban kicsit más eljárást kell alkalmazni, illetve meg kell különböztetni a makromódszert a standard módszertől.

Vancomycin és teicoplanin E-teszt használata:

- A vizsgálandó baktériumból 0,5 McFarland sűrűségű inokulumot készítünk szuszpenzió mediummal (bioMerieux).
- Steril tamponnal egyenletesen szétszélesztjük Mueller Hinton agarra, majd hagyjuk megszáradni.
- Steril csipesszel kivesszünk a gyári tasakból egy tesztcsíkot, és ráhelyezzük az agar lemez közepére. Ezt követően $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ -os termosztátban inkubáljuk a táptalajokat.
- Az eredményt 24 óra múlva olvassuk le, illetve 48 óra múlva megerősítjük.

A Mueller-Hinton agart és 0,5 McFarland szuszpenziót alkalmazó protokoll neve standard módszer, míg ha BHI agart és 2 McFarland szuszpenziót alkalmazunk, azt makromódszernek nevezzük. A standard módszer alkalmazásával leolvasott MIC értékek alapján lehet az izolátumokat az érzékeny, mérsékelten érzékeny illetve rezisztens kategóriákba besorolni. Vancomycinre és teicoplaninra érzékenynek tekinthető az enterococcus törzs, ha a $\text{MIC} \leq 4$ mg/l, mérsékelten érzékeny, ha 8-16 mg/l és rezisztens, ha ≥ 32 mg/l (CLSI, 2010). A csökkent vancomycin érzékenységre gyanús *S. aureus* törzseket pedig makro E-teszt módszerrel ajánlott megvizsgálni. Ha a teicoplanin értéke ≥ 12 mg/l, vagy mind a vancomycin, mind a teicoplanin értéke ≥ 8 mg/l, akkor a vizsgálatot pozitívnak kell tekinteni. Fontos megemlíteni, hogy az így kapott érték nem feleltethető meg MIC értéknek.

Daptomycin E-teszt használata:

- Enterococcusok és staphylococcusok esetén 0,5 McFarland sűrűségű inokulumot készítünk sóoldattal.
- Mueller Hinton agarra szélesztünk. Ajánlott a BBLTM márkát használni, adott Ca^{+} tartalma miatt (Becton Dickinson).
- Inkubálás $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ -on 16-20 órán keresztül.

- Leolvasás: *Enterococcus* species: érzékeny ≤ 4 mg/L, rezisztens > 4 mg/L, *Staphylococcus* species: érzékeny ≤ 1 mg/L, rezisztens > 1 mg/L, (CLSI, 2010).

Gentamicin és streptomycin E-tesztek:

- 0,5-1 McFarland sűrűségű inokulum szükséges, sóoldatban készítve.
- Mueller Hinton agarra szélesztünk.
- 35°C, 24h /48h inkubálás.
- Leolvasás: *Enterococcus* sp. gentamicin: érzékeny ≤ 500 mg/L, rezisztens > 500 mg/L, streptomycin: érzékeny ≤ 2000 mg/L, rezisztens > 2000 mg/L (CLSI, 2010).

Oxacillin E-teszt:

- 0,5-1 McFarland sűrűségű inokulum szükséges, sóoldatban készítve.
- Mueller Hinton agar + 2% NaCl.
- 35°C, 24h inkubálás.
- Leolvasás: *S. aureus*: érzékeny ≤ 2 mg/L, rezisztens ≥ 4 mg/L (CLSI, 2010).

Azon antibiotikumoknál, melyek nincsenek kiemelve, a gyártó szerint történt az E-teszt kivitelezése, inkubálása és leolvasása. Az inkubációs idő letelte után a csík környezetében ellipszis alakú gátlási zóna alakul ki. Az ellipszis és a csík metszéspontjához legközelebb eső feltüntetett koncentráció jelenti az antibiotikumok MIC értékét mg/l-ben megadva.

5.2.2.3. VITEK 2 automata (3.01 szoftver verzió)

A VITEK 2 baktériumok identifikálására, valamint érzékenységi vizsgálatára szolgáló automata, melynek a 3.01 szoftver verzióját használtuk (bioMérieux). Az *enterococcus*ok identifikálásához VITEK 2 Gram-pozitív (GP) identifikáló kártyát használtunk, mely biokémiai módszereken és szubsztrátokon alapul. A kártyán 43 biokémiai teszt található, amelyek a szénforrás-hasznosítást, enzimatis aktivitásokat és a rezisztenciát mérik. A végeredmény körülbelül 8 óra elteltével áll rendelkezésre.

Az eljárás lépései:

1. 3,0 ml steril sóoldatot (0,45%-0,50% NaCl vizes oldata, pH 4,5-7,0) töltünk át egy műanyag kémcsőbe.
2. 0,50-0,63 McFarland sűrűségű homogén szuszpenziót készítünk a sóoldattal.
3. A szuszpenziót tartalmazó kémcsövet és a GP kártyát egy kazettába helyezzük, amelyet a VITEK 2 készülékbe töltünk.

Az enterococcusok érzékenységének meghatározásához AST (antibiotikum érzékenységi teszt) kártyát használtunk, amely egy miniatürizált változata a mikrodilúciós módszer szerinti feles sorozathígításon alapuló MIC meghatározási módszernek. Minden kártya válogatott antibiotikumokat tartalmaz különböző koncentrációkban, szárított állapotban, mikrobiológiai táptalajjal együtt. Mi az AST-P536 kártyát használtuk. A kártya inokulálásának lépései megegyeznek a GP inokulálásának lépéseivel, egészen a 3. pontig. Innen a lépések a következők:

4. Egy 3,0 ml sóoldatot tartalmazó másik kémcsőbe a 2. pont szerint beállított szuszpenzióból 280 µl-t adagolunk.
5. A 4. pontban elkészített hígítást tartalmazó kémcsövet és az AST kártyát behelyezzük a kazettába, a kazettát pedig a VITEK 2 készülékbe.

5.2.3. Molekuláris biológiai vizsgálatok

5.2.3.1. Baktérium lizátum készítése

A PCR reakciók templatjaként, a baktériumokból készített lizátumokat használtuk, melyeket Yean és mtsai (2007) alapján készítettünk. A baktériumokat előzetesen egy éjszakán át tenyésztettük 37°C-on BHI tápoldatban, majd ebből a tenyészetből 100µl-t lecentrifugáltunk (10,000 x g, 3 perc). A felülúszó eltávolítása után, a pelletet 100µl DNáz mentes vízben vettük fel, amit 10 percig forraltunk, majd újabb centrifugálás következett (10,000 x g, 3 perc). Az így kapott felülúszóból kb 3µl-t használtunk egy-egy PCR-hez.

5.2.3.2. Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR reakcióelegy összetétele a Multiplex, *vanC* specifikus és *sodA* specifikus PCR-ek esetén a következő volt:

REDTaq™ ReadyMix™ PCR reaction mix	25 µl
templát (DNS lizátum)	3 µl
primer keverék (forward ill. reverz primerek 4 pmol/µl oldata)	5 µl
<u>steril H₂O</u>	<u>17 µl</u>
végtérfogat:	50 µl

Az inkubációs ciklus jellemzői:

1) Multiplex PCR esetén:

1. 94 °C 3 perc
2. 94 °C 1 perc
3. 54 °C 1perc
4. 72 °C 1 perc
5. 30 alkalommal vissza a 2. lépésre
6. 72 °C 7 perc

2) *VanC* specifikus PCR esetén: A 3. lépésben 54 °C helyett 50 °C-ot használtunk.

3) Fajspecifikus (*sodA*) PCR esetén: Az 1. lépés: 95 °C 4 perc

2. lépés: 95 °C 30 másodperc

3. lépés: 55 °C 1 perc

Az *aacA-aphD* gén specifiukus PCR esetén, a PCR reakcióelegy összetétele a következő volt:

Taq polimeráz	0,5 µl
templát (DNS lizátum)	3 µl
primer pár (4 pmol/µl)	5 µl
10 mM 4xdNTP	0,6 µl
25 mM MgSO ₄	8 µl
10xPCR puffer -MgSO ₄	5 µl
<u>steril H₂O</u>	<u>27,9 µl</u>
végtérfogat:	50 µl

Az inkubációs ciklus jellemzői:

1. 95 °C 2,5 perc
2. 95 °C 30 másodperc
3. 60 °C 30 másodperc
4. 72 °C 1 perc
5. 30 alkalommal vissza a 2. lépésre
6. 72 °C 3 perc

Az *E. faecalis* MLST esetén a PCR reakcióelegy összetétele:

Pfu polimeráz 1,25U	0,5 µl
templát (DNS lizátum)	1 µl
primer pár (10 pmol/µl)	1 µl
10 mM 4xdNTP	0,5 µl
25 mM MgSO ₄	2 µl
10xPCR puffer -MgSO ₄	2,5 µl
<u>steril H₂O</u>	<u>17,5 µl</u>
végtérfogat:	25 µl

Az inkubációs ciklus jellemzői:

(Mielőtt a PCR csöveket a PCR készülékbe helyeztük, a készülék tetejét felhevítettük 94 °C-ra.)

1. 94 °C 5 perc
2. 94 °C 30 másodperc
3. 52 °C 30 másodperc
4. 72 °C 1 perc
5. 30 alkalommal vissza a 2. lépésre
6. 72 °C 7 perc

S. aureus MLST esetén a PCR reakcióelegy összetétele azonos volt az *E. faecalis* MLST-nél leírtakkal, kivéve hogy Pfu helyett 0,25 µl Taq polimerázt használtunk, illetve 17,75 µl steril vizet.

Az inkubációs ciklus jellemzői:

1. 94 °C 3 perc
2. 94 °C 30 másodperc
3. 55 °C 30 másodperc
4. 72 °C 30 másodperc
5. 30 alkalommal vissza a 2. lépésre
6. 72 °C 5 perc

A PCR reakciók eredményét agaróz gélen futtatva (1 % agaróz 1x TAE pufferben oldva) ellenőriztük.

5.2.3.3. Restriktációs analízis

Az emésztések nagy részét 23 µl-es reakcióközegben végeztük, amely tartalmazta a kívánt mennyiségű (1-2 µg) DNS mintát, az adott restriktációs endonukleáznak megfelelő puffert és a megfelelő restriktációs endonukleázt 1-2 U/µg DNS mennyiségben. A reakcióelegyet steril desztillált vízzel a kívánt térfogatúra egészítettük ki. Az emésztéseket az enzimek hőmérsékleti optimumának megfelelő hőmérsékleten (37°C-on) végeztük 2 órán át.

8. táblázat. Egy tipikus restriktációs emésztési közeg összeállítása

DNS minta	5 µl
10x puffer	2 µl
0,1 M DTT	2 µl
steril víz	12 µl
enzim (2 U)	2 µl
ÖSSZESEN	23 µl

Az emésztést agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük.

5.2.3.4. Agaróz gélelektroforézis

A DNS fragmentumokat 1 %-os agaróz gélben választottuk szét. Az agarózt 1x TAE pufferben oldottuk fel, majd lehűlés után Gel Redet (4 µl/100ml) adtunk az oldathoz (Sigma).

A DNS mintákhoz 6x DNS minta puffert adtunk, majd felvittük a megszilárdult gélre. 80 V feszültség mellett 1x TAE pufferben kb 1 órán át történő futtatással végeztük az elválasztást. Az agaróz gélelektroforézis után a gél UV fényben vizsgáltuk, majd Bio-Rad Multi-Analyst készülékkel a gélképet *tif* formátumban rögzítettük.

5.2.3.5. DNS kinyerése agaróz gélből

A megfelelő méretű sávokat alkohollal sterilizált szikével kivágtuk, és steril Eppendorf csövekbe helyeztük, majd lemértük a gél darabok tömegét. A DNS-t QIAquick gel extraction kit (Qiagen), illetve a Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) segítségével nyertük ki a gyártó cégek leírása szerint.

5.2.3.6. PCR termékek klónozása

A PCR termékeket T4 DNS ligázzal pGEM-T Easy vektorba ligáltuk. A ligálási közeget az alábbiak szerint állítottuk össze, és 4 °C –on inkubáltuk 1 éjszakán át:

9. táblázat. Egy tipikus ligálási közeg összeállítása

2x ligáz puffer	5 µl
steril H ₂ O	2 µl
pGEM-T Easy vektor	1 µl
PCR termék	1µl
T4 DNS ligáz (3U/µl)	1 µl
ÖSSZESEN	10 µl

Az *E. coli* DH5α kompetens sejtek transzformálása során 50-50 µl kompetens sejthez 10 illetve 5 µl ligálási elegyet adtunk, és jégen állni hagytuk 40 percig. 42 °C-on 50 másodpercig alkalmazott hősokkolás után a sejtekhez 200 µl SOC tápoldatot adtunk, majd 1 órán át ráztuk 37 °C-on, 150-200 rpm sebességgel. A baktérium sejteket ezután ampicillint, IPTG-t és X-gal-t tartalmazó LB-agar táptalajra szélesztettük és 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk.

A plazmidot hordozó fehér *E. coli* telepeket 100 µg/ml ampicillint tartalmazó 5 ml LB folyékony táptalajba oltottuk le és 37 °C-on inkubáltuk 1 éjszakán át, 200 rpm rázatás mellett. A plazmidokat QIAprep Spin Miniprep Kit készlettel izoláltuk. A sejteket steril Eppendorf csőben centrifugálással összegyűjtöttük, majd reszuszpendáló pufferrel (P₁) szuszpendáltuk a pelletet. Lizáló és semlegesítő pufferek (P₂- és N₃) hozzáadása után néhányszor finoman megforgattuk a csövet. A keletkezett csapadékot 10 percen át 13000 rpm-es centrifugálással ülepítettük, a felülúszót oszlopra pipettáztuk és újra centrifugáltuk. Ezután kötő (PB)- és mosó puffereket (PE) pipettáztunk az oszlopra. A pufferek hozzáadását 1 percig, 13000 rpm-mel történő centrifugálás követte. Az oszlopot steril Eppendorf csőbe helyeztük, majd az eluáló puffer (EB) hozzáadása után, újabb centrifugálással gyűjtöttük össze az eluáló puffert, ami a plazmid DNS-t tartalmazta.

5.2.3.7. PCR termékek tisztítása és szekvenálása

A PCR termékek tisztítását Microcon Ultracel YM-100 kittel végeztük (Millipore). A gén specifikus PCR termékekből 20-40 µl-t pipettáztunk eppendorf csövekbe, majd steril vízzel 200 µl-re egészítettük ki. A Microcon rezervoárt az ampullába illesztettük, az oldatot rápipettáztuk. A tetejét lezártuk, majd centrifugáltuk (5000 rpm, 5 perc). Ezután a rezervoárt megfordítva egy újabb ampullába raktuk, és így centrifugáltuk 3 percig, 10000 rpm-mel. Az ampulla alján összegyűlt terméket ismét 200 µl-re egészítettük ki steril vízzel, majd a centrifugálásokat megismételtük.

A klónok ellenőrzésére a teljes inzertált DNS mindkét szálát megszekvenáltattuk az Szegedi Biológiai Kutató Központ Biokémiai Intézetében SP6 és T7 oligonukleotid primerek felhasználásával. A tisztított PCR termékek szekvenálását az amplifikációhoz használt primerekkel végeztettük Gödöllőn a BIOMI Kft-nél, illetve a DEOEC Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében. A hVISA3 törzs MLST vizsgálata során a szekvenálást az Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszéken végeztük.

5.2.4. Epidemiológiai tipizálási módszerek

5.2.4.1. Multilocus sequence typing (MLST)

Az *E. faecalis* törzsek MLST vizsgálata során 7 háztartási gén (*gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt*, *yqiL*) belső gén fragmentumának szekvenálása történt Aanensen és Spratt (2005)

alapján (6. táblázat). A *S. aureus* törzsek MLST vizsgálata során a 7 vizsgált gén a következő volt: *arc*, *aro*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqil* (Enright és mtsai 2000) (7. táblázat). A génfragmentumokat Pfu illetve Taq polimerázzal amplifikáltuk, az 5.2.3.2. fejezetben már leírt módon. A PCR termékeket Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) kittel tisztítottuk, és mindkét szálon megszekvenáltattuk. A kapott szekvencia adatok kiértékelése, megfelelő méretűvé "vágása" után, a www.mlst.net adatbázis megfelelő alléljaival összehasonlítva megkaptuk a törzsek allélikus profiljait, és az ezekhez tartozó szekvencia típusokat.

5.2.4.2. Pulzáló erőterű gél-elektroforézis (PFGE)

S. aureus: A genomi DNS kinyeréséhez egy kacsnyi baktériumot először 1 ml PBS-sel mostunk, majd elszuszpenzáltuk 300 µl EC lízis pufferben, amelyhez előzőleg 20 µl 1 mg/l lysostaphint (Sigma) adtunk. A baktérium szuszpenziót azonos térfogatú 2%-os, EC lízis pufferben feloldott „chromosomal-grade low-melting” (Bio-Rad) agarózzal kevertük össze, majd szétosztottuk a dugóformákba. Megszilárdulás után a dugókat először 37°C-on inkubáltuk 1 órán át 3 ml EC lízis pufferben, ezután 55°C-on inkubáltuk 3 órán keresztül 3 ml ESTN pufferben, amelyhez 20 µl 20 mg/l proteinase K-t (Merck) adtunk. Az inkubálások után mostuk a dugókat 3 ml 7 µl PMSF tartalmú TE pufferben 50°C-on 30 percig, majd még háromszor mostuk TE pufferben szobahőmérsékleten. Minden egyes dugóból egyharmad részt 30 U *Sma*I (Sigma) restrikciós enzimmel emésztettünk 2 órán át 25°C-on. Az így kapott fragmentumokat CHEF-DR® II (Bio-Rad) készülékben választottuk szét. Az 1%-os „pulsed-field certified” agaróz gél 0,5 x TBE pufferrel készítettük. A futási paraméterek a következők voltak: 14°C, 6 V/cm, az első blokkban 10 óra 5s-15s, a második blokkban 11,5 óra 15s-60s. Kontrollként a NO340S λ ladder PFG markert (New England Biolabs) használtuk. A dendrogramokat a BioNumerics program 2.5 verziójával analizáltuk (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium) a Dice-koefficiens alkalmazásával, nem súlyozott pár csoport módszerrel (UPGMA), 1.0 % sáv pozíció toleranciával. Az izolátumok összefüggését Tenover (1995) kritériumai alapján határoztuk meg.

Enterococcus fajok: Az enterococcusok PFGE vizsgálata során hasonló módon jártunk el, mint a staphylococcusoknál, néhány módosítással: A baktériumokat 300 µl CS pufferben szuszpenzáltuk el, majd 2%-os „low melting” agarózzal összekeverve készítettük el a dugókat. Megszilárdulásuk után a dugókat 37°C-on inkubáltuk 3 órán keresztül 3 ml EC lízis pufferben, amely a következő enzimeket tartalmazta: 25U mutanolysin (Sigma), 0,5

mg/ml lysozyme (Sigma) és 166 µg/ml RNase A (Sigma). A második inkubáció 54°C-on zajlott 19-20 órán keresztül 3 ml ES pufferben 133.3 µg/ml proteinase K-val kiegészítve. A dugókat ezután négyszer 30 percig mostuk 3 ml TE pufferben szobahőn. Az emésztés 25°C-on történt 15U *SmaI* enzimmel, saját pufferében (buffer SA) 4 órán át. A DNS fragmentumokat a staphylococcusoknál leírt módunk választottuk szét. A dendrogrammok készítésénél 2% optimalizációt és 2% sáv pozíció toleranciát választottunk.

5.2.4.3. Bakteriofág tipizálás

A 2000-2005 között izolált MRSA törzsek tipizálását dr. Horváth Judit (Csongrád megyei ANTSZ, Fág laboratórium, Szeged) végezte Blair és Williams munkássága (1961) alapján. A módszer segítségével egy baktérium fajon belül, biokémiai és szerológiai módszerrel tovább nem differenciálható törzsek, különböző típusokba oszthatók. Csak azok a baktériumok érzékenyek az adott fágokkal szemben, amelyek a fágadszorpcióhoz megfelelő fágreceptorral rendelkeznek. A fágtípus-meghatározáshoz használt fágok, az ún. típusfágok a tipizálandó baktériumtörzseket azok érzékenysége esetén lizálják. A típusfágokkal kapott oldások alapján állapítható meg a fágtípus/fágkép.

5.2.4.4. Módosított populáció analízis profil (PAP)

A baktériumokat egy éjszakán át tenyésztettük folyékony BHI-ban. Ebből a tenyészetből 0.3 optikai denzitású (578nm) szuszpenziót, majd $1/10^1$ és $1/10^4$ hígításokat készítettünk. Mindkét hígításból 50µl-t kentünk ki 0; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 4,0; valamint 8,0 mg/l vancomycin tartalmú BHI lemezre. 48 órás inkubáció után (35-37°C, normál légter) megszámoltuk a kinőtt telepeket. A CFU-kat (colony forming units) a vancomycin hígítás függvényében féllogaritmikusan ábrázoltuk. Az értékeléskor minden egyes törzsre meghatároztuk a görbe alatti területeket (PAP-AUC= area under curve). A pozitív kontroll törzs PAP-AUC értékei a következők: Mu3 PAP-AUC = 21.06 ± 2.47 . Ezután a VISA/hVISA gyanús törzsek PAP-AUC értékének és a párhuzamosan vizsgált Mu3 PAP-AUC értékének arányát kell megvizsgálni. Ha ≥ 0.9 , akkor hVISA törzsről, ha ≥ 1.3 , akkor VISA törzsről beszélünk (Tóth és mtsai, 2008). A PAP-AUC vizsgálatokat Tóth Ákos végezte (Országos Epidemiológiai Központ, Bakteriológia I. osztály)

5.2.4.5. *Staphylococcus chromosomal cassette mec* (SCCmec) tipizálás

A Debrecenben izolált 3 hVISA törzs SCCmec kazetta tipizálása Oliveira és de Lencastre (2002) alapján, multiplex PCR segítségével történt (Ungvári Erika, Országos Epidemiológiai Központ, Fágtypizálási és Molekuláris Epidemiológiai Osztály). A reakció 8 primer párt tartalmaz, a *mec* gén komplex 8 lókuszára tervezve, valamint belső pozitív kontrollként a *mecA* génre tervezett primereket. A PCR termékek mérete 162-495 bp között volt, az egyes sávok legalább 40 bp-ban eltértek egymástól. A kapott termékek száma és mérete egy mintázatot határoz meg (SCCmec típus), amelyet szem ellenőrzése mellett szoftver segítségével értékelték.

5.2.5. Az adatok elemzése és kiértékelése

- A DNS szekvenciák összehasonlítását ClustalW2 szoftver segítségével végeztük: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>. (Chenna és mtsai, 2003).
- A gének azonosítása a blastn algoritmussal történt. (Altschul és mtsai, 1990).
- A PFGE dendrogramokat a Bionumerics program 2.5 verziójával analizáltuk (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium)
- Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok során az interpretálás a CLSI illetve az EUCAST határértékek alapján történt (**10. táblázat**).

10. táblázat. A vizsgált antibiotikumok MIC határértékei a CLSI és EUCAST alapján (mg/L).

	CLSI 2010		EUCAST 2011	
	Enterococci	<i>S. aureus</i>	Enterococci	<i>S. aureus</i>
Amikacin	rezisztens	≤16, 32, ≥64	IE, IE	≤8, >16
Amoxicillin/clavulánsav	ampicillin!	≤4/2, -, ≥8/4	≤4, >8	benzilpenicillin >0,125
Ampicillin	≤8, -, ≥16	≤0,25, -, ≥0,5	≤4, >8	benzilpenicillin >0,125
Ampicillin/sulbactam	ampicillin!	≤8/4, 16/8, ≥32/16	≤4, >8	benzilpenicillin >0,125
Ciprofloxacin	≤1, 2, ≥4	≤1, 2, ≥4	-, -,	≤1, >1
Clindamycin	rezisztens	≤0,5, 1-2, ≥4	-, -,	≤0,25, >0,5
Daptomycin	≤4, -, -,	≤1, -, -	IE, IE	≤1, >1
Erythromycin	≤0,5, 1-4, ≥8	≤0,5, 1-4, ≥8	-, -,	≤1, >2
Gentamicin	S≤500,R>500	≤4, 8, ≥16	>128 HLAR	≤1, >1
Imipenem	ampicillin!	≤4, 8, ≥16	≤4, >8	cefoxitin >4
Linezolid	≤2, 4, ≥8	≤4, -, ≥8,	≤4, >4	≤4, >4
Moxifloxacin	-	≤0,5, 1, ≥2	-, -,	≤0,5, >1
Oxacillin	-	≤2, -, ≥4	-, -,	benzilpenicillin >0,125
Quinupristin/Dalfopristin	≤1, 2, ≥4	≤1, 2, ≥4	≤1, >4 <i>E. faecium</i>	≤1, >2
Rifampin	≤1, 2, ≥4	≤1, 2, ≥4	-, -,	≤0,064, >0,5
Streptomycin	S≤1000,R>2000	-	>512 HLSR	-
Teicoplanin	≤8, 16, ≥32	≤8, 18, ≥32	≤2, >2	≤2, >2
Tetracyclin	≤4, 8, ≥16	≤4, 8, ≥16	-, -	≤1, >2
Tobramicin	-	≤4, 8, ≥16	IE, IE	≤1, >1
Trimethoprim/ sulfamethoxazol	rezisztens	≤2/38, -, ≥4/76	≤0,032, >1	≤2, >4
Tygecyclin	-	-	≤0,25, >0,5	≤0,5, >0,5
Vancomycin	≤4, 8-16, ≥32	≤2, 4-8, ≥16	≤4, >4	≤2, >2

6. EREDMÉNYEK

6.1. A VRE előfordulása a Debreceni Egyetem klinikáin

A Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratórium 2004 óta szűri az enterococcus törzseket vancomycinre. A vizsgált időszakban, 2004. január 1. és 2009. december 31. között összesen 7271 enterococcust izoláltunk a laborba érkező különféle klinikai mintákból a rutin laboratóriumi diagnosztika során. Minden enterococcus törzs vancomycin rezisztenciáját először 6 µg/ml vancomycint tartalmazó BHI screen lemezen vizsgáltuk, majd a screen lemezen növekedést mutató törzsek esetén további molekuláris biológiai vizsgálatokat végeztünk. A multiplex PCR reakciók alapján egyetlen *E. faecalis* izolátum hordozta a *vanA* rezisztencia gént (Dombrádi és mtsai, 2009). Ezen kívül 15 klinikai mintából tudtuk kimutatni *vanC* pozitív enterococcusok jelenlétét (Dombrádi és mtsai, 2011 in press). A **11. táblázat** bemutatja a vizsgált időszakban gyűjtött VRE gyanús minták izolálásának idejét, a minták eredetét a minta típusa illetve klinikák szerint, valamint az enterococcus fajok mellett ugyanabból a mintából kitenyésztett egyéb mikroorganizmusokat.

11. táblázat. A 2004-2009 között gyűjtött VRE gyanús minták jellemzése

Minta száma	Izolálás ideje	Minta típusa	Klinika	Kórokozók*
11876	2004.05.21	vizelet (3 éves lány)	Gyermecklinika, Sebészeti Osztály	<i>E. coli</i>
2479	2004.01.31	seb (53 éves nő)†	I. Belgyógyászati Klinika	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. mirabilis</i>
6130	2005.03.08	vizelet (3 éves fiú)	Gyermecklinika, Csecsemőosztály	<i>P. morganii</i>
17807	2005.06.28	seb (50 éves nő)	Kardiológiai Intézet, Szívsebészeti Osztály	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>
13053	2006.05.16	abscessus (66 éves férfi)†	II. Sebészet, Általános Sebészet	<i>E. coli</i> , <i>C. krusei</i> , <i>Enterobacter</i>
5588	2007.03.18	katéter (65 éves nő)	I. Sebészet, Általános Fekvő Osztály	-
24525	2007.12.08	katéter (70 éves férfi)V	I. Sebészet, Intenzív Fekvő Egység	<i>E. coli</i>
23610	2007.11.27	vizelet (59 éves nő)	I. Sebészet, Vesetranszplantáció	-
24836	2007.12.12	vizelet (1 hónapos fiú)	Gyermecklinika, Koraszülött Utógondozó	-
99	2008.01.02	seb (74 éves férfi)†V	II. Sebészet, Intenzív Osztály	<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
4984	2008.03.02	seb (57 éves nő)	Szülészeti-Nőgyógyászat, Sebészeti Osztály	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>
10048	2008.05.05	ascites (47 éves nő)†	I. Sebészet, Általános Fekvő Osztály	<i>E. coli</i> , <i>P. loescheii</i> , <i>Fusobacterium</i>
13698	2008.06.19	hemokultúra (68 éves férfi)	II. Belgyógyászati Klinika, Haematológia Spec. Osztály	-
3834	2009.02.18	ascites (82 éves nő)†V	I. Sebészet, Intenzív Fekvő Egység	<i>E. coli</i> , <i>C. lusitaniae</i>
4445	2009.02.26	decubitus (72 éves nő)	I. Belgyógyászati Klinika, Kardiológia Osztály	<i>Acinetobacter</i>
8043	2009.04.10	vizelet (9 hónapos lány)	II. Sebészet, Sürgősségi Osztály	<i>E. coli</i>

**Enterococcus* spp. mellett ugyanabból a mintából kitenyészett egyéb mikroorganizmusok

† = elhunyt beteg

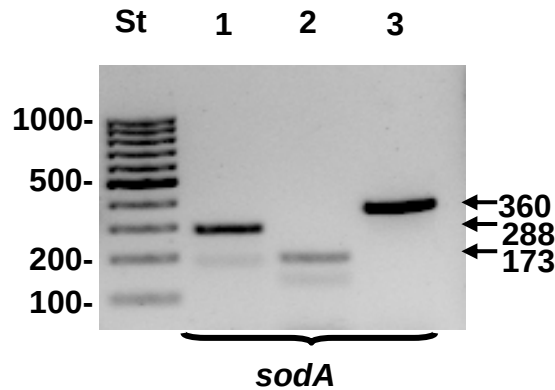
V = vancomycin terápiában részesült beteg

6.1.1. A *vanC* pozitív törzsek jellemzése

6.1.1.1. PCR és restrikciós analízis

A Multiplex PCR reakciót Depardieu és mtsai (2004b) alapján végeztük. A PCR közeg a *vanA*, *vanB*, *vanC1/2*, *vanD*, *vanE* és *vanG* vancomycin rezisztencia génekre, valamint az *E. faecalis* és *E. faecium* D-alanin-D-alanin (ddl) ligáz génekre specifikus primer párokat tartalmazta. Ezeken kívül az *E. faecalis*, *E. casseliflavus* és *E. gallinarum* fajokat a szuperoxid dizmutáz (*sodA*) génre specifikus primerekkel is azonosítottuk (Jackson és mtsai, 2004). A magas fokú gentamicin rezisztenciát Yean és mtsai (2007) alapján PCR-rel erősítettük meg. A bifunkcionális aminoglikozid rezisztencia génre (*aacA-aphD*) tervezett primer párokat enyhén módosítottuk. A 16 *vanC* gént hordozó törzsből összesen 2 volt *vanC2* pozitív *E. casseliflavus*, a többi 14 pedig *vanC1* pozitív *E. gallinarum* (**12. táblázat**).

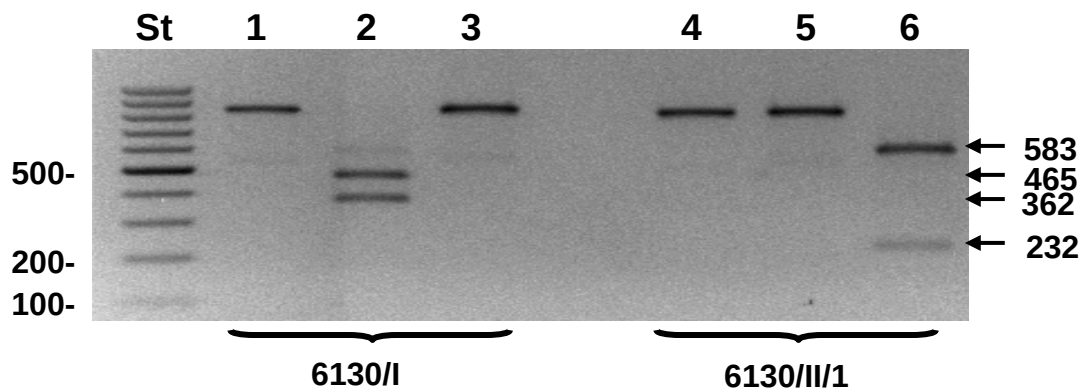
Az általunk használt *vanC* specifikus primerek mind a *vanC1*, mind a *vanC2* gének amplifikálására alkalmasak. Kezdetben a *vanC1* illetve *vanC2* géneket DNS szekvenálással különböztettük meg. A 815 bp illetve 827 bp hosszú szakaszok teljesen azonosak voltak az adatbázisokban közölt *E. gallinarum vanC1*(EU151772) illetve *E. casseliflavus vanC2/3* (EU151764) gének megfelelő szakaszaival. Később a két gén elkülönítésére restrikciós analízist dolgoztunk ki. A génszekvenciák restrikciós térképének összehasonlításával olyan restrikciós enzim hasító helyeket kerestünk, amelyek csak az adott génre specifikusak és az agaróz gélen jól detektálható fragmentumokat hoznak létre a PCR termék emésztése után. A mások által használt *MspI* enzim helyett (amely mindkét terméket hasítja), mi a *SalI* és *HindIII* enzimeket használtuk (Leclercq és mtsai, 1988). A *SalI* csak a *vanC1* gént hasítja, a PCR termékből egy 583 bp és egy 232 bp fragmentumot hoz létre. A *HindIII* specifikusan hasítja a *vanC2* gént úgy, hogy a PCR termékből egy 362 bp és egy 465 bp méretű fragmentum keletkezik. Tehát amennyiben a *SalI* enzim hasítja a PCR terméket, akkor *vanC1*, ha a *HindIII* hasítja, akkor *vanC2* a rezisztencia faktor (**12. táblázat**). Ezzel a módszerrel azt tapasztaltuk, hogy az egyik mintát (száma: 6130) mindkét enzim hasította, felvetve ezáltal mindkét gén jelenlétét. Ez a vizelet minta egy 3 éves fiútól származott 2005-ből, aki pneumonia miatt került a Gyermekklinikára. Az eredeti vizeletmintából származó lefagyasztott törzs felnevelésével, és az egyes telepek szétszélesztésével három szubkultúrát különítettünk el. A fajspecifikus *sodA* PCR reakció alapján a három szélesztés három fajt reprezentált (**4. ábra**).



4. ábra. A 6130-as minta vizsgálata *sodA* fajspecifikus PCR reakcióval

1. oszlop: 6130/I minta, *E. casseliflavus sodA* (288bp), 2. oszlop: 6130/II/2 minta, *E. faecalis sodA* (173bp), 3. oszlop: 6130/II/2 minta, *E. gallinarum sodA* (360bp). St= 100bp DNS létra (Invitrogen).

Mivel igen különleges esemény, hogy egyetlen betegből egyidejűleg három enterococcus faj tenyészten ki, ezt az esetet részletesen kivizsgáltuk. A három species közül csak az *E. casseliflavus* (6130/I) és az *E. gallinarum* (6130/II/1) fajok nőttek a VRE screen lemezen, az *E. faecalis* (6130/II/2) azonban nem volt vancomycin rezisztens. Az ezt követő *vanC* specifikus PCR és restrikciós analízis kimutatta, hogy a 6130/I izolátum a *vanC2*, a 6130/II/1 izolátum pedig a *vanC1* gént hordozta (5. ábra).



5. ábra. A 6130-as minta szubkultúráinak restrikciós analízise

A 6130/I minta *vanC* PCR terméke emésztetlenül (1), *HindIII* emésztés után (2), *Sall* emésztés után (3), a 6130/II/1 minta *vanC* PCR terméke emésztetlenül (4), *HindIII* emésztés után (5), *Sall* emésztés után (6). St= 100bp DNS létra (Invitrogen).

A ritmusszabályozóval élő, Down-kóros, asztmás beteget valószínűleg alapbetegségei, fiatal kora valamint leromlott egészségi állapota miatt kolonizálhatták az enterococcus fajok. A 12. táblázat foglalja össze a VRE törzsek molekuláris vizsgálata során kapott eredményeinket, valamint mutatja az E-tesztel és a VITEK2 automatával meghatározott vancomycin és teicoplanin MIC értékeket is.

12. táblázat. VRE törzsek PCR és antibiotikum rezisztencia eredményei

Minta száma	Species	Rezisztencia gén	E-teszt**	VITEK2**
11876	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i> *	V:2; T:1,5	V:≥32;T:≤0,5
2479	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i> *	V:12; T:3	V:2; T:≤0,5
6130/I	<i>E. casseliflaus</i>	<i>vanC2</i> *	V:8; T:1,5	V:8; T:2
6130/II/1	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	V:8; T:1,5	V:4; T:1
6130/II/2	<i>E. faecalis</i>	-	-	-
13053	<i>E. casseliflaus</i>	<i>vanC2</i>	-	-
5588	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	V:8; T:1	V:2; T:≤0,5
24525	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1, aacA-aphD</i>	V:8; T:1	V:8; T:≤0,5
23610	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1, aacA-aphD</i>	V:8; T:4	V:≤1; T: ≤0,5
24836	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	V:8; T:0,25	V:4; T:≤0,5
99	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1, aacA-aphD</i>	V:16-24; T:0,75	V:32; T:0,5
4984	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	V:8; T:1	V:32; T:0,5
10048	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	V:8; T:1	V:32; T:0,5
13698	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	V:8; T:0,5	V:8; T:0,5
3834	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	V:8; T:0,5	V:8; T:0,5
4445	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	V:8; T:0,5	V:8; T:0,5
8043	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	V:8; T:1	V:8; T:0,5

* DNS szekvenálással megerősítve

**A MIC értékek mg/l-ben vannak megadva. V=vancomycin, T=teicoplanin

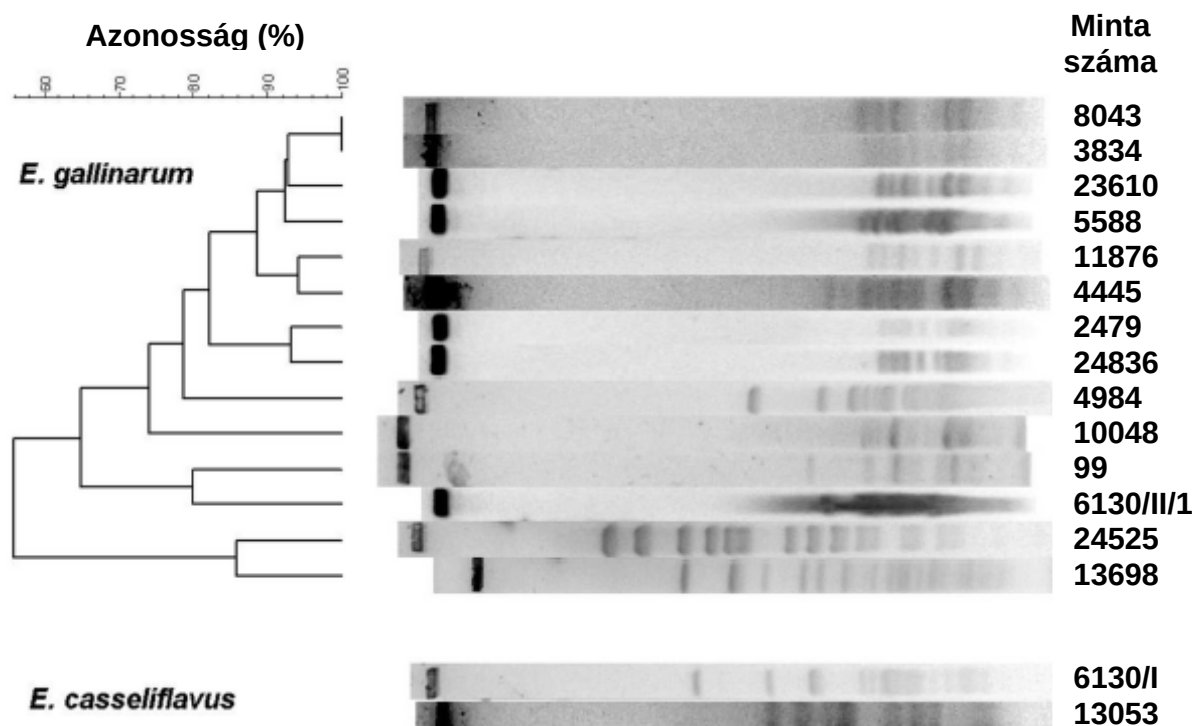
6.1.1.2. Antibiotikum érzékenység vizsgálata

A VRE törzsek antibiotikum érzékenységét E-teszttel vizsgáltuk, a következő antibiotikumokra: vancomycin, teicoplanin, linezolid, ampicillin, tigecyclin, daptomycin, gentamicin és amoxicillin/klavulánsav. A 16 *vanC* pozitív törzs közül mind mérsékelten rezisztens volt vancomycinre, és érzékeny teicoplaninra. A vancomycin rezisztencia mellett 3 *E. gallinarum* izolátumot találtunk, melyek magas fokú rezisztenciát mutattak gentamicinnel szemben. Ezekben a törzsekben ki tudtuk mutatni az *aacA-aphD* bifunkcionális aminoglikozid rezisztencia gént PCR segítségével (**12. táblázat**). Szerencsére a VRE törzsek a többi vizsgált antibiotikumra érzékenynek bizonyultak.

6.1.1.3. Epidemiológiai vizsgálatok

A 6130-as mintából kitenyésztett vancomycin érzékeny *E. faecalis* törzset MLST módszerrel genotipizáltuk. Az acetyl-CoA acetiltranszferáz (*yiqL*) gén szekvenálása során azt találtuk, hogy az *yiqL*-8 allélhoz képest a 187-es pozícióban egy C→T nukleotid csere történt. Ezek alapján az MLST kurátora az új allélhoz az *yiqL*-64, az új szekvencia típushoz pedig az ST-336 számot rendelte (www.mlst.net).

A rezisztens törzsek genetikai rokonságának feltárásához pulzáló erőterű gélelektroforézist használtunk (**6. ábra**). A kapott PFGE mintázatokat Tenover és mtsai (1995) szerint értékeltük ki.



6. ábra. A VRE törzsek PFGE dendrogramjai

A dendrogrammok alapján 2 *E. gallinarum* (8043 és 3834) mintázata teljes mértékben megegyezett. Mind a két törzs 2009-ből, Sebészeti intézetekből származott, azonban a 3834-es törzs az I. Sebészet Intenzív Fekvő Egységéről, a 8043-as pedig a II. Sebészet Sürgősségi Osztályáról érkezett (**11. táblázat**). A 3834 *E. gallinarum* egy 82 éves nő ascites mintájából tenyésztett ki, a betegben invazív beavatkozást (hysterectomia) végeztek, majd akut peritonitis, vastagbélátfúródás, nekrozis miatt további műtétei voltak. Ugyanebből az ascites mintájából *E. coli* és *Candida lusitanae* is kitenyésztett, későbbi mintáiból pedig *Klebsiella* és *Pseudomonas* fajokat izoláltak. A beteg számos antibiotikum mellett vancomycin terápiában is részesült, de idős kora valamint betegségei miatt a műtét után 1 hónappal meghalt. Nem lehet kizárni, hogy a vancomycin rezisztens *E. gallinarum* is közrejátszott a sepszis kialakulásában, amire az alkalmazott Vancocin nem hatott. A 8034 *E. gallinarum* egy 9 hónapos lány vizeletéből származott, akit bakteriuria miatt kezeltek, és kontrollra érkezett vissza. A szignifikáns csíraszámban (10^5) kitenyésztett *E. coli* mellett az enterococcus csak 10^4 csíraszám volt jelen, így a székletflórából való kontamináció nem zárható ki. A két beteg között direkt kontaktus nem történhetett.

6 további törzset egy klaszterbe lehetett sorolni, mivel a PFGE mintázatuk >90%-ban megegyezett. Ezek közül egy 2009-ből, kettő 2004-ből, három pedig 2007-ből származott. A

2004-es esetek közül az első minta (2479) az I. Belgyógyászati Klinikáról érkezett, a beteg leromlott állapota miatt februárban meghalt. A második minta (11876) májusban érkezett a Gyermekklinikáról, tehát nem feltételezhető kapcsolat a két eset között. Az 2007-es (5588, 23610, 24836) esetek sem hozhatók összefüggésbe egymással. Az első két minta az I. Sebészetről érkezett, de különböző osztályokról, és időszakokból, a harmadik minta pedig a Gyermekklinikáról származott.

6.1.2. Egy *vanA* pozitív eset ismertetése

6.1.2.1. Esetleírás

Az 50 éves beteg mitrális billentyű prolapszus elektív műtete miatt került a kórházba 2005-ben. Kórtörténetében előfordult gyomorfekély, magas vérnyomás, akut miokardiális infarktus és szívasztma. A helyi protokoll szerint cefuroxim és tobramycin profilaxist alkalmaztak az 5 órás műtét előtt. A műtétet követően a beteget újra kellett éleszteni, intraaortikus ballonpumpával lehetett a szív-tüdő gépről elválasztani. A beteget intenzív terápiás osztályra helyezték, ahol további 29 órás intubálásra és ventillálásra volt szüksége. 8 nappal a műtét után *E. faecalis*, *Escherichia coli* és *Pseudomonas aeruginosa* volt izolálható a femorális sebéből, azonban a beteg nem volt lázas és nem kapott antibiotikumot. A 6 hónappal későbbi kontrollon már nem volt nyoma sebfertőzésnek. Ezek a kórokozók valószínűleg csak kolonizálták a sebet.

6.1.2.2. Mikrobiológiai jellemzés

Az *E. coli* és *P. aeruginosa* törzseket hagyományos biokémiai módszerekkel identifikáltuk. Ezeken a törzseken kívül a femorális sebből kitenyésztettünk egy Gram-pozitív, spórát nem képző coccust, amely láncokba rendeződött. Véres agaron nem-hemolizáló, szürke, 1mm-es átmérőjű kolóniákat képzett. Az izolátum jól nőtt csokoládé agaron és BEA agaron, ezen kívül kataláz negatív, optochin és bacitracin rezisztens volt. Lancefield szerinti szerocsoport meghatározás a Streptex agglutinációs kittel történt (Murex Biotech). A 6 µg/ml vancomycin tartalmú szűrőlemezen kinőtt telepeket tovább vizsgáltuk. Az antibiotikum érzékenység meghatározásához a VITEK2 automatát használtuk (13.

táblázat), valamint korongdiffúziót a CLSI leírása alapján. Mind a vancomycin mind a teicoplanin MIC értékek >256 mg/l voltak az E-tesztek alapján.

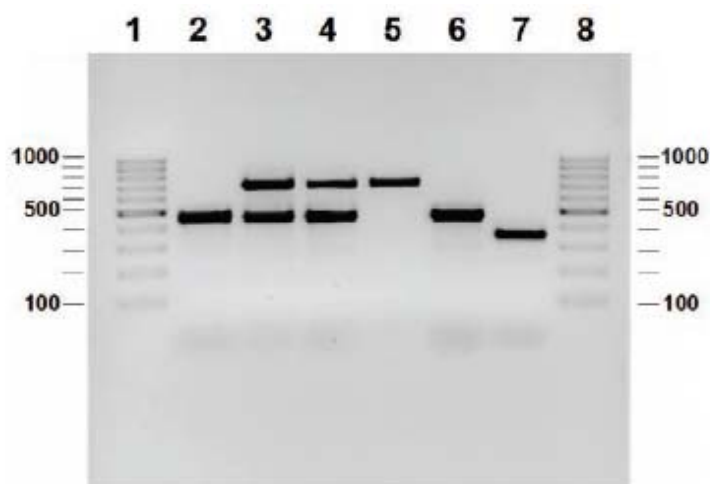
13. táblázat. A *vanA* pozitív *E. faecalis* antibiotikum érzékenysége VITEK2 automatával

Antibiotikum	MIC (µg/ml)	Interpretáció
Ampicillin	≤ 2	S
Ampicillin/Sulbactam	≤ 2	S
Imipenem	≤ 1	S
Gentamicin (Magas fokú)	SYN-S	S
Sztreptomycin (Magas fokú)	SYN-S	R
Ciprofloxacin	≤ 0,5	S
Moxifloxacin	≤ 0,25	S
Erythromycin	0,5	S
Linezolid	2	S
Teicoplanin	≥ 32	R
Vancomycin	≥ 32	R
Tetracyclin	≥ 16	R

S= érzékeny, R= Rezisztens, SYN= szinergizmus várható

6.1.2.3. Molekuláris biológiai jellemzés

A Multiplex PCR reakció során kapott termékeket agaróz gélen megfuttatva 2 sávot kaptunk, melyek az *E. faecalis ddl* (475bp) valamint a *vanA* (732bp) glikopeptid rezisztencia géneknek feleltek meg. A faji szintű azonosítást megerősítettük az *E. faecalis ddl* (475bp) illetve *sodA* (360bp) génjeire specifikus primerekkel végzett külön PCR reakciókkal. A rezisztencia gén identifikálását szintén megerősítettük egy specifikus PCR reakcióval (7. ábra).



7. ábra. A *vanA* pozitív *E. faecalis* törzs molekuláris biológiai jellemzése

A Multiplex PCR során kapott termékeket láthatjuk a 2-4. oszlopokban; 2. oszlop: *E. faecalis* ATCC29212 (negatív kontroll), 3. oszlop: *vanA* pozitív *E. faecalis* (pozitív kontroll), 4. oszlop: 17807 *E. faecalis*. A specifikus PCR reakciók termékeit láthatjuk az 5-7. oszlopokban; 5. oszlop: *vanA*, 6. oszlop: *ddl*, 7. oszlop: *sodA*. Az 1. és 8. oszlopokban a 100-bp DNS létra látható (Invitrogen). A méreteket bp-ban vannak feltüntetve.

Az EA1-EA2 primerekkel amplifikált PCR terméket agaróz gélből Quiagen gél extrakciós kittel izoláltam, és a tisztított DNS-t T4 DNS ligázzal pGEM-T Easy vektorba ligáltam, majd a ligálási elegyet kompetens *E. coli* DH5α sejtekbe transzformáltam. A transzformált sejtekből a plazmidot QIAprep készlettel izoláltam és *EcoRI* restrikciós emésztéssel ellenőriztem. A kapott klónt T7 valamint SP6 plazmid specifikus primerekkel megszekvenáltattuk az MTA SZBK Szekvenáló Laboratóriumában. A plazmidban megtalálható volt a *vanA* gén 732 bp hosszúságú szakasza, amely tartalmazza a PCR primereket is. A megszekvenált szakasz 1 nukleotid kivételével teljesen megegyezett az adatbázisban lévő *vanA* gén szekvenciájával. A meghatározott szekvenciában a 640-es pozícióban egy A→G pont mutáció volt az irodalmi adathoz képest. A pontmutáció egy konzervatív I-M aminosav cserét okozott a fehérje szerkezetében. A mutáció ellenőrzésére a *vanA* PCR terméket közvetlen tisztítás (Microcon Ultracell YM-100 kit) után is megszekvenáltattuk (Biomi Kft). A 647 nukleotidból álló szekvenciát mindkét szálon megvizsgáltuk, és 100%-ban azonosnak találtuk a pLW043, pVEF1 illetve pVEF2 plazmidokra jellemző *vanA* gén megfelelő fragmentumával. A pVEF plazmidok gyakrabban fordulnak elő *E. faecium* fajokban, habár a mi esetünkben több független kísérlet is *E. faecalis*-nak azonosította a baktériumot.

6.1.3. A VITEK 2 automatával végzett vizsgálatok

Vizsgálataink során össze kívántuk hasonlítani a VITEK 2 automata 3.01. szoftver verziójával (bioMérieux), valamint az E-tesztel (AB Biodisk) kapott eredményeket a *vanA* pozitív törzs, illetve a *vanC* pozitív törzsek glikopeptid érzékenységére vonatkozóan.

A VITEK2 automata AST-P536 kártyáját használtuk, amely a következő antibiotikum koncentrációkat tartalmazta; vancomycin 2, 4, és 6 µg/ml; teicoplanin 1, 4, 8, és 16 µg/ml. A két módszer közötti különbségeket a CLSI határértékek alapján 3 csoportra osztottuk: nagyon súlyos, súlyos, illetve kisebb jelentőségű interpretációs hibákat definiáltunk (van den Braak és mtsai, 2001). Nagyon súlyos hibának tekintettük, ha a VITEK2 automata érzékeny, az E-teszt viszont rezisztens eredményt adott. Súlyos hibának tekinthető, amikor a VITEK2 rezisztens, az E-teszt viszont érzékeny eredményt adott. Kisebb jelentőségű hibának azt vettük, amikor a két módszer közötti eltérés egy interpretációs kategória volt, pl: közepesen rezisztens helyett rezisztens vagy érzékeny eredmény. Kontrollként a *vanA* pozitív klinikai izolátumot (pozitív kontroll), illetve az érzékeny ATCC 29212 *E. faecalis* törzset használtuk (negatív kontroll). Minden kísérletet háromszor végeztünk el, és ugyanazt az eredményt kaptuk. A VITEK2 automatával és az E-tesztel kapott MIC értékeket a **12. táblázat** foglalja össze. A *vanA* pozitív törzset mindkét rendszer jól azonosította, és nem tapasztaltunk hibát a teicoplanin érzékenységek interpretálása során sem. Mindegyik *vanC* pozitív törzs érzékeny volt teicoplaninra (MIC ≤8µg/ml). Az E-teszt azonban diszkriminatívabbnak bizonyult, mivel a VITEK2 értékek sokkal szűkebb megoszlást mutattak. A vancomycin vizsgálatokor 10 esetben ütköztünk minor hibába. A 17 vizsgált VRE törzsből a VITEK2 automata alapján 5 volt vancomycin rezisztens (MIC ≥32µg/ml), 6 volt érzékeny (MIC ≤4µg/ml), és 6 volt közepesen érzékeny (MIC =8µg/ml). 6 E-tesztel közepesen érzékenynek kapott törzset a VITEK2 érzékenynek detektált, míg 4 esetben a közepesen érzékeny törzset rezisztensként detektálta és *vanB* fenotípusúnak adta ki. Összefoglalva tehát elmondhatjuk, hogy a vancomycin érzékenység detektálása során a VITEK2 automata (3.01 szoftver) 17 esetből 10-szer (59%) adott helytelen eredményt.

6.2. Az MRSA előfordulása a Debreceni Egyetem klinikáin

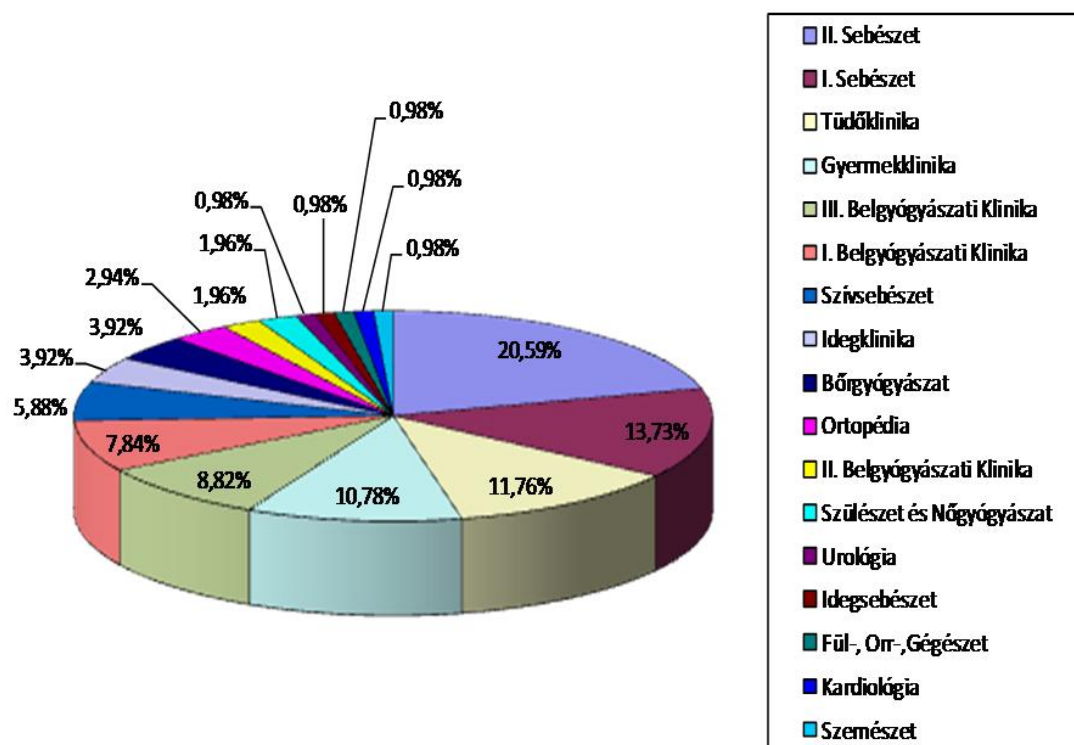
Az MRSA törzsek 2003-ig sporadikusan fordultak elő a Debreceni Egyetem klinikáin, a prevalenciájuk 2,3-3,2% körül mozgott. 2004-ben az előfordulásuk csaknem 4% volt, a nozokómiális surveillance rendszer tevékenysége ellenére 2005-ben már meghaladta a 7%-ot (14. táblázat).

14. táblázat. MRSA törzsek prevalenciája a Debreceni Egyetem Klinikáin (2000-2005)

Év	<i>S. aureus</i> (n)	MRSA (n)	MRSA (%)
2000	1102	25	2,27
2001	1257	28	2,23
2002	1247	41	3,28
2003	1106	26	2,35
2004	1269	50	3,94
2005	1411	102	7,23

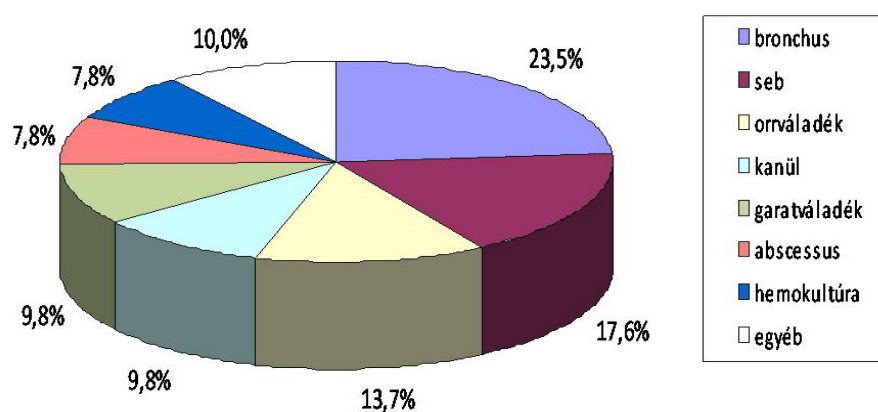
6.2.1. MRSA törzsek incidenciája

A 2005 január-december közötti időszakban összesen 339 MRSA törzset izolált a Bakteriológiai Diagnosztikai Labor, melyek 102 betegről, 17 különböző klinikáról származtak. A kiértékelésnél azonban csak az első izolátumot vettük figyelembe minden betegnél. A **8. ábrán** látható, hogy az MRSA aránya igen magas volt a Sebészeti klinikákon, a Tüdőklinikán és a Gyermekklinikán.



8. ábra. A 2005-ben izolált MRSA törzsek klinikánkénti megoszlása

A 102 MRSA izolátum mintánkénti eloszlása a következő volt: bronchus váladék 23,5%, seb 17,6%, orrváladék 13,7%, kanül 9,8%, garatváladék 9,8%, és az abscessus illetve hemokultúra is 7,8% (10% egyéb) (9. ábra).



9. ábra. A 102 MRSA izolátum mintánkénti megoszlása

6.2.2. MRSA törzsek antibiotikum rezisztencia mintázata

Minden izolátum β -laktám rezisztensnek bizonyult, 97 törzs oxacillin MIC értéke 256 mg/l volt. A további öt törzs oxacillin MIC értéke 256 mg/l alatt volt, de még a rezisztens tartományba esett. Mind a 102 törzs érzékeny volt vancomycinre illetve teicoplaninra, azonban a törzsek 99%-a rezisztens volt erythromycinre és clindamycinre, 97% ciprofloxacinra, 31% trimethoprim/sulfamethoxazolra, 39% amikacinra és 49% tetracyclinre. A törzseket 20-féle antibiotikum rezisztencia mintázatba lehetett besorolni (**15. táblázat**).

15. táblázat. A 79 MRSA törzs PFGE típusa és antibiotikum rezisztencia mintázata

PFGE típus	Rezisztencia	Kód	MRSA (n)	MRSA (%)
C	Gen, Tob,	2A	1	1,3
A	Ery, Clin, Gen, Tob	4A	1	1,3
A	Ery, Clin, Ami, Gen, Tob	5A	1	1,3
A	Ery, Clin, Cip, Gen, Tob	5B	33	41,8
B	Ery, Clin, Cip, Gen, Tob	5B	1	1,3
A	Ery, Clin, Cip, Tet, Gen, Tob	6A	5	6,3
B	Ery, Clin, Cip, Tet, Gen, Tob	6A	2	2,5
C	Ery, Clin, Cip, Tet, Gen, Tob	6A	2	2,5
B	Ery, Clin, Cip, Ami, Gen, Tob	6B	7	8,9
C	Ery, Clin, Cip, Ami, Gen, Tob	6B	4	5,1
A	Ery, Clin, Cip, Sxt, Gen, Tob	6C	2	2,5
C	Ery, Clin, Cip, Sxt, Gen, Tob	6C	1	1,3
A	Ery, Clin, Tet, Sxt, Cip, Gen, Tob	7A	2	2,5
C	Ery, Clin, Tet, Sxt, Cip, Gen, Tob	7A	2	2,5
A	Ery, Clin, Tet, Cip, Ami, Gen, Tob	7B	2	2,5
B	Ery, Clin, Tet, Cip, Ami, Gen, Tob	7B	2	2,5
C	Ery, Clin, Tet, Cip, Ami, Gen, Tob	7B	2	2,5
B	Ery, Clin, Sxt, Cip, Ami, Gen, Tob	7C	1	1,3
C	Ery, Clin, Sxt, Cip, Ami, Gen, Tob	7C	6	7,6
C	Ery, Clin, Sxt, Tet, Cip, Ami, Gen, Tob	8A	2	2,5
Összesen			79	100

Ery= erythromycin, Clin= clindamycin, Gen= gentamicin, Tob= tobramycin,

Cip= ciprofloxacin, Ami= amikacin, Tet= tetracyclin, Sxt= trimethoprim/sulfamethoxazol

6.2.3. MRSA törzsek epidemiológiája

Az MRSA törzsek terjedésének megfékezéséhez, az epidemiológiájuk megértéséhez elengedhetetlen a genetikai tipizálás, annak meghatározása, hogy a terjedés egy vagy több klónnak tulajdonítható. A számtalan molekuláris epidemiológiai vizsgálat közül a bakteriofág tipizálás, az SCCmec tipizálás, a PFGE illetve az MLST a leggyakrabban alkalmazott módszerek.

6.2.3.1. Bakteriofág tipizálás

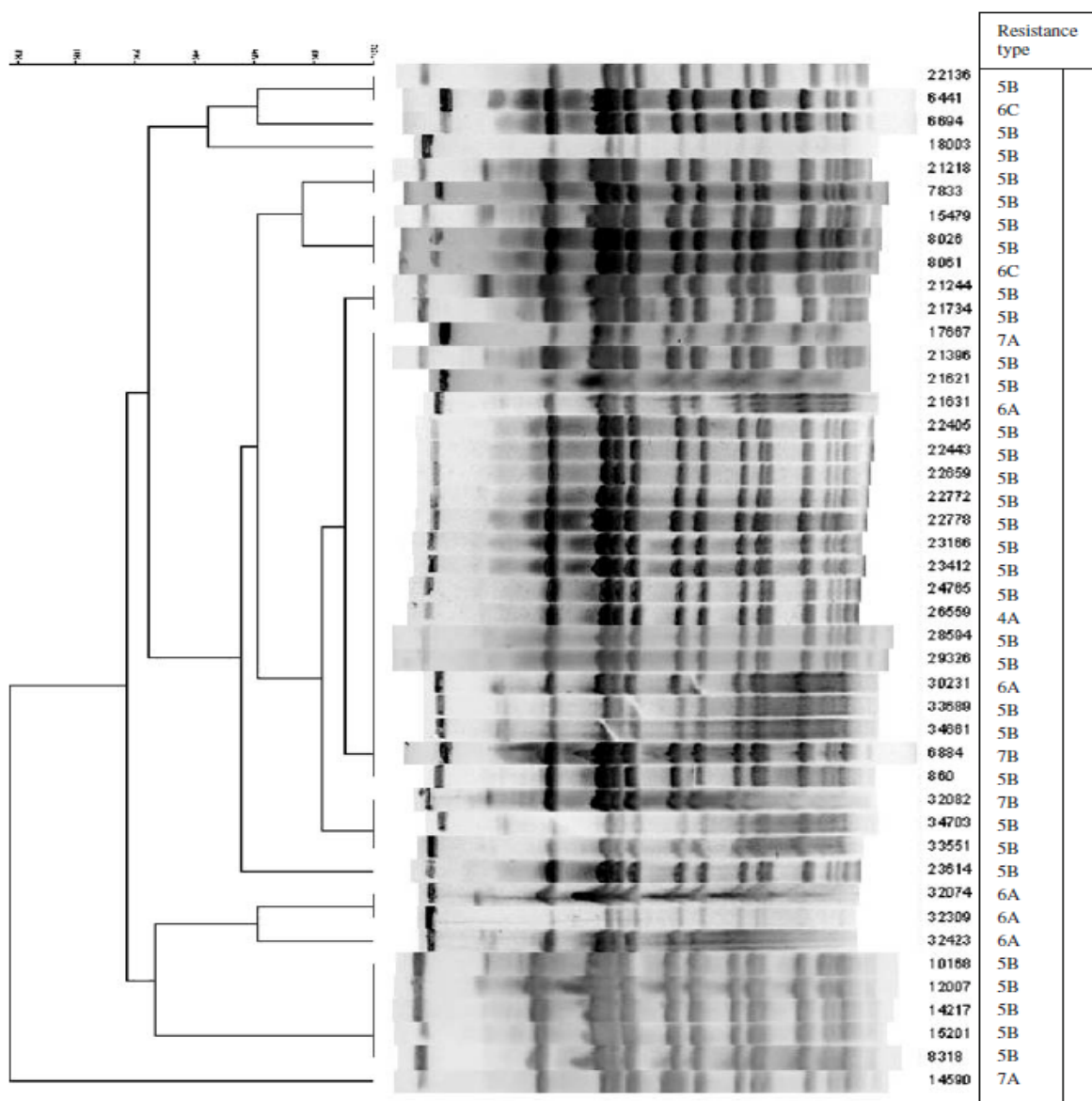
Az ún. nem-tipizálható törzsek aránya az évek során ugyan csökkent, de a kevert fág típusú törzsek száma nőtt, az V fág csoportot pedig fokozatosan felváltotta a III. 2005-ben az izolátumok több mint a fele (57,85%) volt kevert, 34,31% a III fág csoportba tartozott és 7,85% nem volt tipizálható (**16. táblázat**). A törzseknek csaknem fele a 617/622/623 fág típusba tartozott, majdnem 20% pedig a 629-es fággal volt csak tipizálható.

16. táblázat. A 102 MRSA törzs megoszlása fág csoportok és fág típusok szerint

Fág csoport	Fág típus	Törzsek száma	%
III	629	20	19,61
III	623	4	3,92
III	623,629	11	10,78
Kevert	617,622,623	49	48,04
Kevert	622,623	7	6,86
Kevert	616,618,622	2	1,96
Kevert	622,623	1	0,98
Nem tipizálható	-	8	7,85
Összesen		102	100

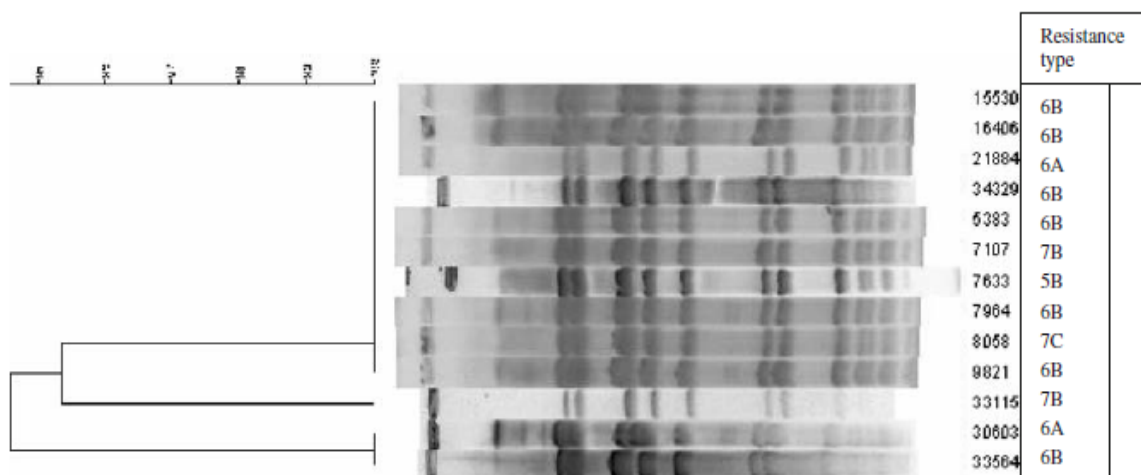
6.2.3.2. Klonális kapcsolatok elemzése

A 84 megvizsgált MRSA törzsből 79-et lehetett besorolni a kapott három PFGE típus; A, B, és C valamelyikébe. A többi törzs között nem volt kimutatható genetikai kapcsolat. A dendrogramokat a **10., 11., és 12. ábrák** mutatják, kiértékelésük Tenover és mtsai (1995) alapján történt. A legtöbb törzs, szám szerint 46, az A típusba tartozott. Ezek mindegyike érzékeny volt glikopeptidekre, de rezisztens volt erythromycinre, clindamycinre és két kivétellel ciprofloxacinra. A legtöbb törzs érzékeny volt amikacinra, trimethoprim/sulfamethoxazolra és tetracyclinre. Többségük kevert fágcsoporthoz tartozott, melyek közül a domináns fágtípus a 617/622/ 623 volt. A törzsek a legkülönbözőbb klinikákról származtak.



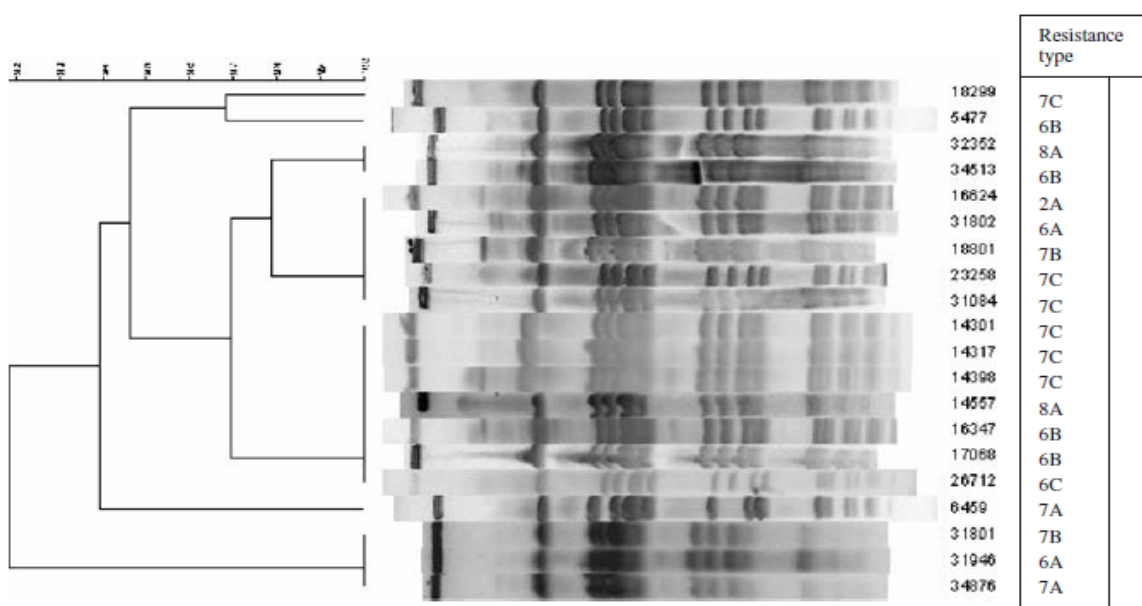
10. ábra. A PFGE A típusú törzsek dendrogramja

A B típusba sorolható törzsek (n=13) szintén egyedi antibiotikum rezisztencia mintázattal rendelkeztek; a legtöbb érzékeny volt trimethoprim/szulfamethoxazolra, míg három kivétellel rezisztensek voltak amikacinra (15. táblázat). 72,7% a III fágcsoportba tartozott. A domináns fág típus a 629-es volt.



11. ábra. A PFGE B típusú törzsek dendrogramja

A legtöbb C típusú izolátum szintén a III fágcsoportba tartozott. Ezek között volt a legtöbb multirezisztens izolátum (15. táblázat). Két izolátumról kijelenthetjük, hogy a vancomycin illetve teicoplanin kivételével pánrezisztensek voltak, mindekkettő a III fágcsoportot és 8A rezisztencia mintázatot képviselte.



12. ábra. A PFGE C típusú törzsek dendrogramja

Meg kell jegyeznünk, hogy a B és C PFGE típusba tartozó törzsek több mint fele a II. Sebészetről, a III. Belgyógyászati Klinikáról, a Tüdőklinikáról és a Szívsebészetről származott. Ezek 2005-ben egy épületen belül helyezkedtek el, más klinikáktól elkülönülten. A fág típusok analízise során azt tapasztaltuk, hogy a Gyermekklinikáról származó törzsek egy kivétellel a III fág csoportba tartoztak, és a 623-as fág típus volt túlsúlyban, míg ezen izolátumok másik fő forrása a fent említett különálló klinikai blokk volt. A törzsek többsége a C PFGE típusba tartozott, változatos rezisztencia mintázatokkal. A kevert fág csoportú törzsek között a leggyakoribb PFGE típus az A volt, erythromycin-clindamycin-ciprofloxacin-gentamicin-tobramycin (5B) rezisztencia mintázattal. A nem tipizálható törzsek csoportja minden szempontból változékony volt.

6.2.2. hVISA törzsek jellemzése

A debreceni hVISA törzseket 2007, 2008 és 2009 években izoláltuk. Három új törzset tudtunk kimutatni 3 különböző betegből, ezekkel együtt a hVISA izolátumok száma Magyarországon 5-re nőtt (Tóth és mtsai, 2008; és egy nem publikált eset). A klinikai eseteket részletesen megvizsgáltuk.

6.2.2.1. Klinikai esetek bemutatása

Első beteg (2007)

Az 56 éves férfi beteg távolabbi anamnézisében komolyabb betegség nem szerepelt. 2007-ben submandibularis-parapharyngealis tályog miatt szájsebészeti műtét történt, majd sepszis, jobboldali bronchopneumonia és akut veseelégtelenség miatt kezelték. Állapota javult, de haemodialízis programba kellett felvenni. 3 hónappal később a vena jugularis katéterszepszis gyanúja miatt eltávolításra került, az orvosok amikacin terápiába kezdtek. A beteg haemokultúrájából MRSA tenyésztett ki, amely vancomycin érzékeny volt, ezért az amikacin terápiát vancomycinnel később pedig rifampicinnel kombinálták. A CT vizsgálat során mindkét tüdőben és a lépben is abscessus igazolódott, a mellkasi röntgen kétoldali bazális pneumóniát mutatott. Végül keringési elégtelenség, valamint ventriculás arithmiák a beteg halálához vezettek. Posztmortem haemokultúrából csökkent vancomycin érzékenységgű MRSA tenyésztett ki (hVISA1).

Második beteg (2008)

A második beteg Little-kórban, tetraplégiában, epilepsziában, és szomatomentális retardációban szenvedett. 24 évesen került a kórházba tüdőgyulladással és akut légzési elégtelenséggel egy epilepsziás roham után. Aspiráció gyanúja miatt clindamycin illetve ceftriaxon terápiát kezdtek. A beteg gépi lélegeztetésre szorult. Bronchusváladékából *Pseudomonas aeruginosa* illetve *Candida* gomba tenyésztett ki, antibiotikum váltás (ceftazidim, amikacin, clarythromycin, fluconazol) után azonban láza megszűnt. Ebben az időszakban a beteg parenterális táplálásra szorult. Később orrváladékából, haemokultúrából és bronchusváladékából MRSA tenyésztett ki. A bronchusváladékából izolált MRSA hVISA törzsnek bizonyult (hVISA2). 3 hónapos kezelése alatt lázas illetve láztalan periódusok váltakoztak, a lázas állapotok hátterében az említett MRSA mellett *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, illetve gombafertőzések voltak kimutathatóak. A célzott kezelések ellenére állapotát nem sikerült javítani. Klinikai kezelésének utolsó hetében súlyos septicus-toxicus talajon kialakult csontvelő szuppresszió lépett fel, melynek következtében a beteg meghalt.

Harmadik beteg (2009)

A harmadik beteg egy 27 éves nő volt, aki égési sérüléseket szenvedett a teljes testfelületének kb 40%-án. Többszörös nekrotómiára és bőrátültetésekre volt szüksége. Kórházi kezelése alatt tüdőgyulladás lépett fel. Bőrléziójából hVISA törzs tenyésztett ki (hVISA3), ezért tigecyclinnel kezelték. Ő volt az egyetlen beteg, aki 2 hónappal a felvétele után gyógyultan távozott a kórházból.

6.2.2.2. A hVISA törzsek mikrobiológiai jellemzése

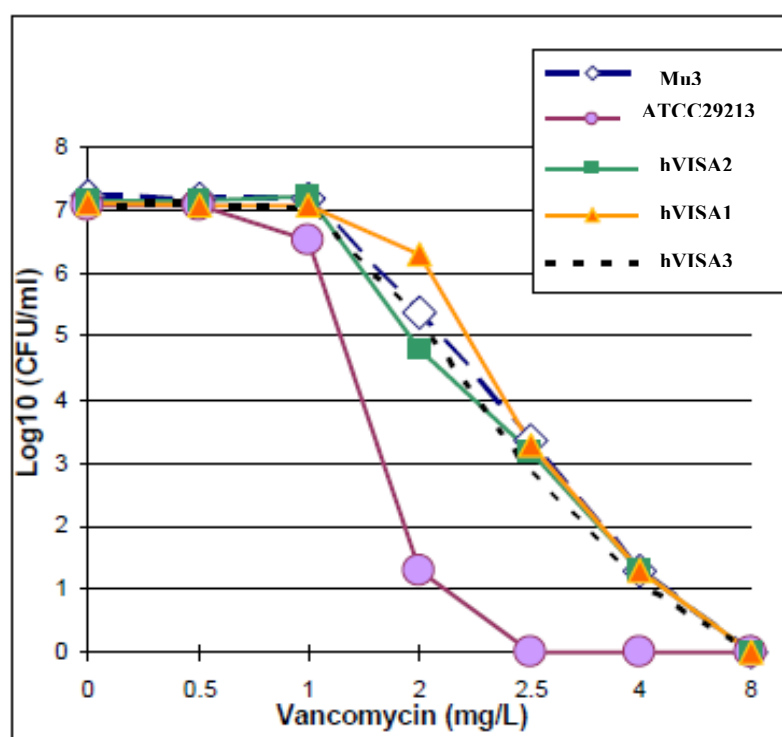
A törzsek antibiotikum érzékenységét először a CLSI ajánlása alapján korongdiffúzióval vizsgáltuk meg. A methicillin rezisztenciát oxacillin E-tesztel néztük, ezen kívül E-tesztet végeztünk a következő antibiotikumokra is: vancomycin, teicoplanin, erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, gentamicin, amikacin, rifampicin, tigecyclin, daptomycin, quinupristin/dalfopristin és linezolid (17. táblázat).

17. táblázat. A hVISA törzsek minimális gátló koncentrációi E-tesztel vizsgálva

	Oxa*	Ery	Clin	Cip	Gen	Amik	Rif	Tig	Dap	Qui/Dal	Lin
hVISA1	>256	>256	>256	>32	24	16	0,006	0,5	1	1	1,5
hVISA2	>256	>256	>256	>32	64	64	>32	0,5	1	1	1
hVISA3	>256	>256	>256	>32	32	16	0,006	0,25	1	2	0,75

*A MIC értékek mg/l-ben vannak megadva. Oxa=oxacillin, Ery=erythromicin, Clin=clindamycin, Cip=ciprofloxacín, Gen=gentamicin, Amik=amikacin, Rif=rifampicin, Tig=tigecyclin, Dap=daptomycin, Qui/Dal=quinupristin/dalfopristin, Lin=linezolid.

Az első beteg (2007) véréből izolált methicillin rezisztens *S. aureus* törzs a makro E-teszt illetve a populáció analízis alapján hVISA-nak bizonyult (hVISA1). A makro E-tesztel kapott minimális gátló koncentrációk a következők voltak: vancomycin 8 mg/L, teicoplanin 12 mg/L. A PAP-AUC arány 1,01 volt (**13. ábra**). Az MLST és az SCCmec tipizálás alapján a törzs a Magyar ST239-MRSA-III klónt képviselte.



13. ábra. Módosított populáció analízis profil-görbe alatti terület (PAP-AUC) módszer alkalmazása a három hVISA törzsre (hVISA1, hVISA2, hVISA3). Mu3= hVISA pozitív kontroll. *S. aureus* ATCC 29213= VSSA (negatív kontroll).

A második beteg (2008) bronchusváladékából izolált MRSA törzs szintén hVISA-nak bizonyult a makro E-teszt és a populáció analízis szerint (hVISA2). Mind a vancomycin mind a teicoplanin MIC 8 mg/L volt, a PAP-AUC arány pedig 0,97 (**13. ábra**). Az MLST és SCCmec tipizálás alapján a törzs a New York/Japan ST5-MRSA-II klónhoz tartozott.

A harmadik beteg (2009) bőrléziójából kitenyészett MRSA törzs esetén a makro E-teszt és populáció analízis alátámasztotta a hVISA gyanút (hVISA3). A makro E-teszt során kapott vancomycin és teicoplanin MIC érték 8 mg/L volt. A PAP-AUC arány ennél a törzsnél 0,93 volt (**13. ábra**). A molekuláris tipizálás beigazolta, hogy ez az izolátum is a New York/Japan ST5-MRSA-II klónhoz tartozott.

7. MEGBESZÉLÉS

Súlyos bakteriális infekciók általában csökkent védekező képességű betegekben alakulnak ki. Ez az állapot felerősíti a hatékony antibiotikum terápia fontosságát. A rezisztens genotípusok gyors detektálása elengedhetetlen az adekvát empirikus terápia megkezdéséhez és a terjedés megakadályozásához (Ratanasuwan és mtsai, 1999). A legnagyobb gondot a rezisztens Gram-pozitív coccusok előretörése jelenti, melyek közül a legjelentősebb kórokozók az enterococcusok illetve a staphylococcusok.

Nagy aggodalomra adott okot, amikor 1988-ban izolálták az első vancomycin rezisztens enterococcust Franciaországban, ugyanebben az évben Angliában, majd később az Egyesült Államok keleti partjainál. Jelenleg Európában a VRE előfordulási gyakorisága földrajzi területenként igen eltérő, akár 50% is lehet. Az EARS-Net 2009-es adatai alapján Magyarországon a rezisztens *Enterococcus faecium* 1-5%-ban fordult elő. A network adatai az Országos Epidemiológiai Központ adataira épülnek, amely szerint a rezisztens *E. faecium* aránya 2009-ben 1,6% volt, míg ugyanebben az évben nem jelentettek be egyetlen rezisztens *E. faecalis* sem. Sajnos az egyéb enterococcus fajokról nincsenek adatok.

A klinikai gyakorlatban a vancomycin rezisztencia gének molekuláris jellemzése elsősorban a *vanA* illetve *vanB* génekre korlátozódik, hiszen ezek kódolnak magasabb szintű vancomycin rezisztenciát. A *vanA* és a *vanB* operonok mobilis genetikai elemeken találhatóak, lehetővé téve a klonális illetve laterális terjedésüket, emiatt sokkal nagyobb az epidemiológiai jelentőségük. Ezzel szemben a *vanC* pozitív törzsek alacsony szintű rezisztenciával rendelkeznek, és a rezisztencia gén kromoszómálisan helyezkedik el. Habár a *vanC* genotípust sokszor figyelmen kívül hagyják, ezek a törzsek éppen olyan súlyos infekciókat okozhatnak, mint bármely más VRE törzs (Pappas és mtsai, 2004). A vancomycin nem megfelelő empirikus alkalmazása ezekben az esetekben terápiás sikertelenséghez, hosszabb kórházi kezeléshez és megnövekedett ápolási költségekhez vezethet.

Munkánk során a DE OEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumában a 2004-2009 közötti időszakban izolált VRE törzseket analizáltuk. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokhoz a legmegfelelőbb módszer jelenleg az E-teszt, amely azonban drága, és 24-48 órás tenyésztési időt igényel. Annak ellenére, hogy a VITEK2 automata már 8 óra múlva eredményt ad, a 3.01 szoftver verzió nem mindig megfelelő az alacsony szintű glikopeptid rezisztencia kimutatására (Dombrádi és mtsai, 2010). Mindezek alapján a vancomycin rezisztencia gyors és pontos detektálásának legjobb módszere a *van* rezisztencia gének kimutatása PCR-rel.

A vizsgált időszakban összesen 7271 enterococcus tenyésztett ki, melyek közül 17 volt vancomycin rezisztens. Ezek között 1 *vanA* pozitív és 16 *vanC* pozitív törzset azonosítottunk. Magyarországon az első PCR-rel igazolt *vanA* pozitív *E. faecalis* esetét 2000-ben írták le (Ghidán és mtsai, 2000). Ennél a betegnél a VRE törzset egy cukorbeteg férfi lábujján lévő fekélyéből izolálták, amit később amputálni is kellett. Az enterococcusok, leggyakrabban az *E. faecalis*, a sebfertőzések és kolonizációk 5-20%-ában mutathatók ki (Surucuoglu és mtsai, 2005; Zmudzinska és mtsai, 2005). A mi esetünkben a mitrális prolapszus elektív műtétén átesett nő femorális sebéből tenyésztettük ki a *vanA*-hordozó *E. faecalis*-t, nyolc nappal a műtét után. Ez meglepő eredmény volt, hiszen a beteg sohasem kapott vancomycint. A VRE valószínűleg csak kolonizálta a sebet más baktériumokkal együtt. A beteget ápoló személyzet székletét később szűrtük az esetleges VRE hordozás kimutatása céljából, illetve a beteg kórházi környezetét is megvizsgáltuk, de minden minta negatívnak bizonyult, a törzs eredetére nem derült fény. Szerencsére egészen mostanáig ez volt az egyetlen *vanA* pozitív enterococcus a Debreceni Egyetem klinikáin, 2011-ben azonban egy újabb VRE-et izoláltunk, melyet *vanB* pozitív *Enterococcus faecium*-ként azonosítottunk. Ez az új eset már nem került bele a disszertációba, mégis meg kell említeni, hogy a rezisztens genotípus korai felismerése tette lehetővé, hogy a megfelelő infekciókontroll intézkedéseket időben bevezethessük.

Korábbi európai és amerikai felmérésekkel összhangban elmondhatjuk, hogy a Debreceni Egyetem klinikáin a *vanC1* pozitív törzsek prevalenciája magasabb volt, mint a *vanC2* törzseké: a 16 *vanC* gént hordozó törzsből összesen 2 volt *vanC2* pozitív *E. casseliflavus*, a többi 14 pedig *vanC1* pozitív *E. gallinarum*-nak bizonyult (Patel és mtsai, 1997, Gikas és mtsai, 2005). Összességében tehát a *vanC* gént hordozó enterococcusok incidenciája Debrecenben elég alacsony, 0,22%. A különböző rezisztens enterococcus fajok által okozott többszörös infekciók azonban külön figyelmet igényelnek, mivel az esetek többségében nem kerülnek felismerésre a rutin laboratóriumi tesztelés során. A 6130-as klinikai minta molekuláris biológiai vizsgálata közben derült ki, hogy az egyik beteget egyszerre 3 enterococcus fertőzte meg. Mivel az általunk használt *vanC* specifikus primerek mind a *vanC1*, mind a *vanC2* gének amplifikálására alkalmasak voltak, a két gén elkülönítésére restrikciós analízist dolgoztunk ki. A 6130-as minta *vanC* PCR termékének restrikciós emésztése során kapott eredmény hívta fel a figyelmünket arra, hogy egyszerre több rezisztencia gén, így valószínűleg több faj van jelen a mintában. A szélesztések után fajspecifikus PCR-rel azonosított három species közül csak az *E. casseliflavus* és az *E. gallinarum* fajok nőttek a VRE screen lemezen, az *E. faecalis* azonban nem volt vancomycin

rezisztens. Az ezt követő *vanC* specifikus PCR és restrikciós analízis kimutatta, hogy a 6130/I izolátum a *vanC2*, a 6130/II/1 izolátum pedig a *vanC1* gént hordozta.

További 3 betegből olyan vancomycin rezisztens *E. gallinarum* törzsek voltak izolálhatóak, amelyek magas fokú gentamicin rezisztenciával is rendelkeztek (0,04%). Ezek az izolátumok az *aacA-aphD* rezisztencia gént is hordozták a *vanC1* gén mellett. A PFGE vizsgálatok eredménye alapján a három törzs nem mutatott genetikai rokonságot, valószínűleg egymástól függetlenül tettek szert a gentamicin rezisztenciára. A PFGE mintázatok alátámasztották azt a feltevést, hogy a legtöbb VRE törzs megjelenése sporadikus volt. Mindössze két 2009-ben izolált *E. gallinarum* mintázata egyezett meg. Ezek a minták (3834, 8043) sebészeti intézetekből származtak, de a betegeket különböző osztályokon, különböző időpontokban kezelték, tehát a betegek közötti direkt kontaktus kizárható volt. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok alapján számos antibiotikum hatásosnak bizonyult. Összegzésként tehát elmondható, hogy a VRE megjelenése a Debreceni Klinikákon véletlenszerű és jól kezelhető, ha időben felismerésre kerül.

Mivel az enterococcus az emberi gastrointestinális traktus normálflórájának tagja, a VRE előfordulhat a székletben, bekerülhet a kórházi környezetbe, s ott adott predisponáló tényezők mellett nosocomiális infekció kiváltója lehet. Miután hővel, kiszáradással és egyéb külső hatásokkal szemben igen ellenálló, a VRE-hordozó személy környezetében jelen lehet és huzamosabb ideig életképes maradhat. A VRE klinikai anyagban való előfordulásakor a környezetben kórházhigiénés bakteriológiai vizsgálatok indokoltak, a forrás és terjedés útjának felderítésére (Gacs, 2004). Erre a leggyorsabb és legmegbízhatóbb módszer a vancomycin rezisztencia gének molekuláris biológiai detektálása. Számos mikrobiológiai laboratórium azonban a rutin munka során az alternatív módszerek közül az olyan automata rendszereket használja, mint amilyen pl: a VITEK2 rendszer. A VITEK2 a különféle baktériumok gyors identifikálására, illetve az antibiotikum rezisztenciájuk determinálására használható. Az identifikálás és az érzékenység kimutatása során a legtöbb konvencionális laboratóriumi módszer 24 órás inkubálást igényel, míg a VITEK2 rendszer már 8 óra múlva eredményt ad. Az eredmények minél gyorsabb közlése nagyban hozzájárulhat a beteg túléléséhez, illetve a költséghatékonyabb kezeléshez. Számos közlemény beszámolt azonban a VITEK2 rendszer nem megfelelő működéséről az enterococcusok glikopeptid rezisztenciájának detektálásakor (Eisner és mtsai, 2005; Kohner és mtsai, 1997; Pendle és mtsai, 2008; van den Braak és mtsai, 2001). Más közlemények viszont megfelelőnek találták az automatát, igaz csak a VanA illetve VanB típusú törzsek tesztelésére (Garcia-Garrote és mtsai, 2000; Kobayashi és mtsai, 2004; Ramotar és mtsai, 2000). Vizsgálataink célja tehát az

volt, hogy kiderítsük, hogy a VITEK2 automata helyettesítheti-e az enterococcusok MIC meghatározása esetén a rutinszerűen alkalmazott E-teszt módszert. Munkánk során a 16 *vanC* pozitív valamint a *vanA* pozitív enterococcus törzsre kapott MIC értékeket hasonlítottuk össze. Az általunk használt AST-P536 kártyával a VITEK2 3.01 szoftver a teicoplanin rezisztenciát illetve érzékenységet helyesen detektálta minden törzsnél, viszont az alacsony szintű vancomycin rezisztenciát a VRE törzsek 59%-ánál helytelenül állapította meg. A minták 24%-át VanB fenotípusúnak interpretálta a szoftver a VanC fenotípus helyett, és 35%-át vancomycin érzékenynek adta ki. Tudomásunk szerint eddig még csak kevés közlemény foglalkozott a VITEK2 rendszer tesztelésével VanC fenotípusú törzsekkel szemben. A kapott eredmények birtokában kijelenthetjük, hogy a VITEK2 automata 3.01 szoftvere nem alkalmas az enterococcusok alacsony szintű glikopeptid rezisztenciájának identifikálására. Abele-Horn és mtsai (2006) adatai alapján azonban úgy tűnik, hogy az automata 4.01 szoftververzióját használva megbízhatóbb eredményeket kaphatunk.

A Gram pozitív coccusok másik jelentős faja a *S. aureus*, a véráramfertőzések leggyakoribb kórokozója és a leggyakrabban izolált antibiotikum rezisztens patogén. A methicillint először 1959-ben vezették be, a penicillin-rezisztens *S. aureus* által okozott infekciók kezelésére, és az első MRSA törzset már két évvel később izolálták Angliában. Az országos éves rezisztencia adatok, valamint a European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants adatai alapján Magyarországon 2002-ben a kórházban szerzett *S. aureus* törzsek körülbelül 20%-a volt MRSA (Tiemersma és mtsai, 2004). A methicillin rezisztencia előfordulása 4,1% volt a járóbetegek, míg 16,8% a fekvőbetegek körében. Nem meglepően az Intenzív Terápiás Osztályokon (26,5%) illetve invazív beavatkozásoknál (20,2%) az MRSA aránya még ennél is nagyobb volt. A 2005-ben végzett felmérésünk alapján, a debreceni klinikákon a MRSA aránya 7,23% volt, ami kevesebb, mint a Magyarország többi területén tapasztalt értékek (Kristóf és mtsai, 2005). Továbbá ez a frekvencia sokkal alacsonyabbnak bizonyult, mint Macedóniában (31,5%), vagy Romániában (49,9%) (Cekovska és mtsai, 2005; Székely és mtsai, 2008). Ez a jó eredmény elsősorban az egyetemen működő Kórházhigiénés és Infekciókontroll Tanszék eredményes munkájának és a Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriummal való együttműködésének köszönhető. Az átlag alatti értéket a mai napig sikerült megtartanunk, amihez laboratóriumunk gyors diagnosztikai eredményei, és az infekció kontroll szabályok szigorú betartása is hozzájárult.

Az MRSA aránya a Sebészeti klinikákon, a Tüdőklinikán valamint a Gyermekklinikán volt a legmagasabb. A legtöbb minta bronchus váladék, sebváladék, illetve orrváladék volt. Habár a törzseket összesen 8 fágtypusba lehetett besorolni, legtöbbjük (majdnem 50%) a

617/622/623 fágtípusba tartozott, csaknem 20% pedig 629-es fágtípusú volt. Érdekes módon az MRSA törzsek nagy részének voltak receptorai a 622-es és 623-as fágtípusokhoz, bizonyítván a fágtípusizálás korlátait a pontos epidemiológiai csoportok meghatározásánál. Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok során a 79 MRSA izolátum húszféle antibiotikum rezisztencia mintázattal rendelkezett. Mivel 41,8%-a a törzseknek az 5B fenotípusba tartozott, amely erythromycin-clindamycin-ciprofloxacin-gentamicin-tobramycin rezisztenciát jelentett, ez bizonyította a rezisztencia vizsgálatok korlátait az epidemiológiai rokonságok vizsgálatánál. A PFGE eredményeket figyelembe véve azonban a törzsek közötti genetikai diverzitás sokkal kisebb volt, mint a fenotípusos diverzitás. Az epidémia során 3 fő PFGE típust találtunk, melyek közül az A típus volt a leggyakoribb (55%), azonban ezek a törzsek a legkülönbözőbb klinikákról származtak. A B típusba sorolható törzsek szintén egyedi antibiotikum rezisztencia mintázattal rendelkeztek. A C típusú izolátumok között volt a legtöbb multirezisztens törzs. Meg kell azonban jegyezni, hogy a B és C PFGE típusba tartozó törzsek több mint fele a régi Augusztai központban működő klinikákról származott. A PFGE eredmények rámutattak arra, hogy a fenotípusosan különböző izolátumok is lehetnek igen közeli genetikai kapcsolatban. 2005 óta az MRSA előfordulása stagnált 9-10% körül, ami hazai és nemzetközi összehasonlításban is jó eredménynek tekinthető. A klinikák átköltözése nem változtatta meg a statisztikai adatokat, továbbra is a Tüdőklinikáról és a Sebészeti Intézetből kapott minták között a legmagasabb az MRSA aránya. Úgy tűnik tehát, hogy az MRSA törzsek előfordulása elsősorban a beteganyagtól és az ápoló személyzettől függ. A terjedés megakadályozásában a legfontosabb a higiénés szabályok betartása.

A súlyos MRSA infekciók esetén a legtöbbször alkalmazott antibiotikum a vancomycin. Mivel a kórházakban egyre nagyobb az MRSA aránya, a vancomycin felhasználás növekedésével számolni kell a vancomycin rezisztencia illetve heterorezisztencia megjelenésére a staphylococcusok körében is. A hVISA infekciónál igen gyakori a rossz prognózis, a halálozási ráta megközelítheti a 75%-ot (Szabó, 2009). A hVISA/VISA fertőzések rizikó faktorai közé sorolják a hemodialízist, az idegentestek (kanülök, katéterek) hosszú ideig tartó használatát illetve égett sebek jelenlétét (Goldblum és mtsai, 1978; Boelaert, 1994; Szabó, 2009). Ezek a faktorok a három debreceni betegnél is hozzájárulhattak a hVISA megjelenéséhez. hVISA törzsek felbukkanásáról már számos országban beszámoltak, és a legtöbb törzs a New York/Japan MRSA klónhoz tartozott (Hiramatsu és mtsai, 1997a, b; CDC, 1997; Ploy és mtsai, 1998; Garnier és mtsai, 2006; Gould, 2008). Magyarországon eddig összesen 5 hVISA törzset detektáltak; a legelső Tóth és mtsai írták le 2008-ban, a második törzs Székesfehérvárról származott, három pedig az értekezésben

jellemzett három debreceni törzs volt. A hVISA fenotípus felismerése igen nehéz, talán ezzel is magyarázható, hogy eddig csak néhány esetet találtunk. Az első beteg 2007.11.05.-én levett hemokultúrájából MRSA jelenlétét detektáltuk, amely vancomycin érzékeny volt. Ez alapján a beteg vancomycin és rifampicin terápiában részesült. Feltételezhető, hogy a hVISA törzs az alkalmazott vancomycin kezelés hatására szelektálódott ki úgy, hogy 2007.11.14.-én, a beteg halála napján vett mintában már ez a kórokozó vált dominánssá. Sajnos a hVISA fenotípust csak késve tudtuk igazolni. A második beteg bronchusváladékából izolált MRSA hVISA törzsnek bizonyult. A beteget ezt követően három hónapon át ápolták, végül sepsis illetve csontvelő-szupresszió következtében meghalt. A harmadik beteg égési sérült volt, a bőrléziójából kitenyészett hVISA törzs miatt tigecyclinnel kezelték, sikeresen. Az epidemiológiai vizsgálatok során kimutattuk, hogy a 2007-ben izolált törzs a Magyar ST239-MRSA-III klónhoz tartozott, a 2008-ban és 2009-ben izolált törzsek pedig a Magyarországon is elterjedt New York/Japan ST5-MRSA-II klónt képviselték. Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok során azonban a két utóbbi törzs rezisztenciája nem egyezett meg teljes mértékben: mindkét törzs számos antibiotikum ellen rezisztensnek bizonyult, de a hVISA2 törzs rezisztens volt rifampicinre.

Végső konklúzióként elmondható, hogy mind a VRE mind az MRSA incidenciája alacsony a Debreceni Egyetem klinikáin. Ez elsősorban a jó kórházhygiénés helyzetnek, illetve a molekuláris diagnosztikai lehetőségeknek köszönhető. Kiemelendő, hogy a hVISA fenotípus felismerése lehetőséget adott a harmadik hVISA beteg sikeres kezelésére, míg a *vanB* genotípus kimutatása a hatékony infekciókontroll intézkedések elvégzését tette lehetővé. További fejlesztési törekvéseink közzé tartozik a molekuláris diagnosztikai módszerek még szélesebb körű bevezetése a napi rutinba, mely részben már megvalósult az MRSA QPCR elven alapuló kimutatásával is.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám célja a DE-OEC klinikáiról származó beteganyagból izolált vancomycin rezisztens enterococcus (VRE), valamint methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* törzsek (MRSA) epidemiológiai és molekuláris szintű jellemzése volt.

2004 és 2009 között összesen 7271 enterococcust izoláltunk, melyek közül 17 bizonyult vancomycin rezisztensnek. Ezek között 1 *vanA* pozitív *Enterococcus faecalis*, 14 *vanC1* pozitív *E. gallinarum*, és 2 *vanC2* gént hordozó *E. casseliflavus* fajt azonosítottunk molekuláris biológiai módszerekkel. Munkánk során egy új restrikciós analízist dolgoztunk ki *vanC1* és *vanC2* gének elkülönítésére. Epidemiológiai vizsgálataink szerint, - PFGE és MLST adatok alapján- a törzsek nem mutattak genetikai rokonságot egymással. A VRE törzsek E-teszttel illetve VITEK2 készülékkel mért MIC értékeit összehasonlítva megállapítottuk, hogy az automata 3.01-es verziója nem alkalmas az alacsony szintű glikopeptid rezisztencia rutinszerű detektálására. A klinikai izolátumok többsége érzékeny volt a többi tesztelt antibiotikumra, kivéve három gentamicin rezisztens *E. gallinarum* törzset, melyekben sikerült kimutatnunk a bifunkcionális aminoglikozid rezisztencia génjét. Tehát többszörös antibiotikum rezisztencia gént hordozó enterococcusok is előfordultak az egyetem klinikáin. Eredményeink szerint a rezisztens enterococcus törzsek sporadikusan jelentek meg, járványt nem okoztak. Ennek ellenére mind epidemiológiai, mind terápiás szempontból fontos új megközelítést jelent a VRE genotípusok molekuláris genetikai azonosítása.

Az antibiotikum rezisztens *Staphylococcus aureus* sokkal gyakrabban volt kimutatható. A 2005-ben végzett felmérésünk alapján, a Debreceni Egyetem klinikáin az MRSA aránya meghaladta a 7 %-ot. A 102 betegből származó 339 MRSA izolátumot részletes molekuláris biológiai és epidemiológiai elemzésnek vetettük alá. Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok szerint a törzsek 41,8%-ára az 5B mintázat volt jellemző. A törzsek csaknem fele a 617/622/623 fágtípusba tartozott, közel 20% pedig a 629-es fágtípust mutatta. Vizsgálataink során három fő PFGE típust találtunk, melyek közül az A típus volt a leggyakoribb (55%). Ily módon több módszerrel is igazoltuk a kórházi fertőzések klonális jellegét. Az epidemiológiai adatok birtokában a megfelelő infekciókontroll és kórházhigiénés intézkedések segítségével sikerült az MRSA incidencia további növekedését megakadályozni. Munkánk során három különleges, vancomycinre mérsékelten heterorezisztens *S. aureus* (hVISA) törzset is találtunk. MLST és SCCmec vizsgálatok alapján ezek egyike a Magyar ST239-MRSA-III klónt, a másik kettő pedig a New York/Japan ST5-MRSA-II klónt képviselte.

9. SUMMARY

The goal of the present study was the molecular and epidemiological characterization of vancomycin-resistant enterococci (VRE) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from the hospitals of the University of Debrecen.

Between 2004-2009 we isolated overall 7271 Enterococci, of which 17 were resistant to vancomycin. Among the latter we identified 1 *vanA* positive *Enterococcus faecalis*, 14 *vanC1* positive *E. gallinarum*, and 2 *vanC2* gene carrying *E. casseliflavus* strains by molecular biological methods. During this work we developed a new restriction analysis based method to differentiate the *vanC1* and *vanC2* genes from each other. Our epidemiological investigations (PFGE and MLST results) proved that the strains had no genetic relationships with each other. The comparison of the MIC values for the VRE strains obtained by E-test and by the automated VITEK2 system revealed that the version 3.01 software of VITEK2 is not suitable to detect low level glycopeptide resistance. Most of the clinical isolates were sensitive to other antibiotics tested, except for three gentamicin resistant *E. gallinarum* strains. In the latter strains we identified the bifunctional aminoglycoside resistance gene indicating that a few multiple drug resistance gene carrying Enterococci appeared in the hospitals of the University. According to our findings, the resistant enterococcus strains appeared sporadically. Still, from the epidemiologic and therapeutic point of view, it is very important to identify VRE genotypes by molecular genetic methods.

The incidence of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* was significantly higher. According to our survey, the rate of MRSA was 7,23% at the hospitals of the University of Debrecen in 2005. We investigated 339 MRSA strains from 102 patients in detail by epidemiological and molecular biological techniques. The results of the antibiotic sensitivity testing showed that 41,8% of the strains exhibited the 5B resistance pattern. Almost half of the strains belonged to the 617/622/623 phage type, and nearly 20% to the 629 phage type. We revealed three main PFGE types, among which type A was predominant (55%). Thus we confirmed the clonal relationship between the strains with several methods. These epidemiological data allowed us to reduce the incidence of MRSA by introducing appropriate infection control and hospital hygiene measures. During these studies, we also found three interesting cases of heterogeneously vancomycin-intermediate sensitive *S. aureus* (hVISA). According to MLST and SCCmec typing one of the strains belonged to the Hungarian ST239-MRSA-III clone, and two of them represented the New York/Japan ST5-MRSA-II clone.

10. IRODALOMJEGYZÉK

10.1. Hivatkozott közlemények jegyzéke

Aanensen, D.M., and B.G. Spratt. (2005). The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* 33:W728–W733.

Abele-Horn, M., Hommers, L., Trabold, R., Frosch, M. (2006). Validation of VITEK 2 version 4.01 software for detection, identification, and classification of glycopeptide-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 44, 71.

Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410.

Appelbaum PC. (2007), Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents*, 30:398-408.

Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. (1996). Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol*, 4:401–407.

Arthur M, Depardieu F, Cabanie L, Reynolds P, Courvalin P. (1998). Requirement of the VanY and VanX D,D-peptidases for glycopeptide resistance in enterococci. *Mol Microbio*, 30:819–830.

Biavasco F, Vignaroli C, Lazzarini R, Varaldo PE. (2000). Glycopeptide susceptibility profiles of *Staphylococcus haemolyticus* bloodstream isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 44:3122-126.

Blair JE, Williams REO. (1961). Phage typing of staphylococci, *Bull World Health Org*, 24,771–784.

Boelaert, J. R. (1994). *Staphylococcus aureus* infection in haemodialysis patients. Mupirocin as a topical strategy against nasal carriage: a review. *J Chemother* 6 (Suppl 2), 19-24.

Boyd DA., Tim Du, Romeo Hizon, Brynn Kaplen, Travis Murphy, Shaun Tyler, Shirley Brown, Frances Jamieson, Karl Weiss, Michael R. Mulvey, and the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. (2006). VanG-Type Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Strains Isolated in Canada. *Antimicrob Agents Chemother*, 50:217-2221.

Boyd DA, Barbar M. Willey, Darlene Fawcett, Nazira Gillian, and Michael R. Mulvey. (2008). Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* No6-0364 with low-level vancomycin Resistance harboring a novel D-ala-D-Ser Gene Cluster, vanL. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 2667-2672.

Böröcz K., Szilágyi E., Kurcz A., Libbisch B., Glatz K., Gacs M. (2005). First vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak reported in Hungary, *Eur Surveill*, 10, E010527.1

Brown, D. F. J., Brown, N. M., Cookson, B. D., Duckworth, G., Farrington, M., French, G. L., King, L., Lewis, D., Livermore, D. M. & other authors (2006). National glycopeptide-resistant enterococcal bacteraemia surveillance Working Group report to the Department of Health – August (2004). *J Hosp Infect*, 62 (Suppl. 1), 1–27.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. (1997). *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin -United States, *Mor Mortal Wkly Re*, 46, 765-766.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. (2002). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin- United States. *Morb Mortal Wkly Rep*, 51:565-567.

Cekovska Z, Panovski N, Petrovska M, Kristóf K, Rozgonyi F. (2005). Incidence of *Staphylococcus aureus* isolated from patients treated at the Clinical Center of Skopje, Macedonia, with special attention to MRSA, *Acta Microbiol Immunol Hung*, 52,373–384.

Chambers H.F. (1997). Methicillin Resistance in *Staphylococci*: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clin Microb Rev*, Oct. 1997 p.781-791.

Chang, S., Sievert, D. M., Hageman, J. C., Boulton, M. L., Tenover, F. C., Downes, F. P., Shah, S., Rudrik, J. T., Pupp, G. R., Brown, W. J., Cardo, D., Fridkin, S. K. (2003). Infection

with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N England J Med* 348, 1342.

Chenna R, H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T.J. Gibson, D.G. Higgins, and J. D. Thompson. (2003). Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res*, 31:3497-500.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; 20th Informational supplement M100-S20 (2010). CLSI, Wayne, PA, USA.

Courvalin P. (2006). Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clin Inf Dis*, 42: S25-43.

Czirók Éva, (1999). Klinikai és járványügyi bakteriológia. Melánia Kiadó, 1999.

Dahl KH, Simonsen GS, Olsvik O, Sundsfjord A. (1999). Heterogeneity in the *vanB* gene cluster of genomically diverse clinical strains of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*, 43:1105–1110.

De Fátima Silva Lopes, M., Ribeiro, T., Abrantes, M., Figueiredo Marques, J. J., Tenreiro, R. & Crespo, M. T. B. (2005). Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int J Food Microbiol*, 103, 191–198.

de Lencastre H., Severina E. P., H. Milch, M. Konkoly Thege and A. Tomasz. (1997). Wide geographic distribution of a unique methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clone in Hungarian hospitals. *Clin Microb Inf*, 3:3,

Depardieu F, Reynolds PE, Courvalin P. (2003), VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* 10/96A. *Antimicrob Agents Chemother* 47:7–18.

Depardieu F, Kolbert M, Pruul H, Bell J, Courvalin P. (2004a), VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3892–3904.

Depardieu F., Perichon B., Courvalin P. (2004b). Detection of the van alphabet and identification of Enterococci and Staphylococci at the species level by multiplex PCR, *J Clin Microbiol*, 42, 5857-5860.

Dombrádi, Zs., Bodnár, F., Orosi, P., Dombrádi, V., Szabó, J. (2009). A case report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization of a femoral wound in central Europe. *Central Eur J Med* 4, 259.

Dombrádi, Zs., Z. Bihari, K.I. Horváth, and J. Szabó. (2010). Comparison of the VITEK 2 system with the E-test for the determination of glycopeptide susceptibility of *vanA* and *vanC* positive enterococci. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 57:157-163.

EARS-Net, Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe – 2010. Surveillance reports - 17 Nov 2010.

Edwards DD. (2000). Enterococci attract attention of concerned microbiologists. *ASM News* 2000; 66: 540-545.

Eisner, A., Gorkiewicz, G., Feierl, G., Leitner, E., Köfer, J., Kessler, H. H., Marth, E. (2005). Identification of glycopeptide-resistant enterococci by VITEK 2 system and conventional and real-time polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Inf Dis* 53, 17.

Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. (2000). Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*, *J Clin Microbiol*, 38,1008–1015.

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2010). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.1 April 2010. Available at www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (Online)

Euzéby J.P., List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. www.bacterio.net, last updated 2011, febr. 12.

Gacs Mária, (2004). Az enterococcusok és a glikopeptid rezisztencia. *Epinfo*: 11. évf. 42. szám (2004. okt. 22)

Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P. (1999). VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob Agents Chemother*, 43: 2161-2164.

Foulquie Moreno, M. R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. & De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 106, 1–24.

Frieden TR, Munsiff SS, Low DE, et al. (1993), Emergence of vancomycinresistant enterococci in New York City. *Lancet*; 342:76–79.

Froggatt JW, Johnston JL, Galetto DW, Archer GL. (1989). Antimicrobial resistance in nosocomial isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 33:460-466.

Füzi, M. (2006). Védekezési lehetőségek az antibiotikum rezisztencia terjedésének megakadályozására. OEK, Mikrobiológiai Körlevél. 2006, VI. évfolyam, 1. szám.

Garcia-Garrote, F., Cercenado, E., Bouza, E. (2000). Evaluation of a new system, VITEK2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *J Clin Microbiol* 38, 2108.

Garnier, F., Chainier, D., Walsh, T., Karlsson, A., Bolmström, A., Grelaud, C., Mounier, M., Denis, F., Ploy, M. C. (2006). A 1 year surveillance study of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* strains in a French hospital. *J Antimicrob Chemother* 57, 146-149.

Gemmel, C.,G. (2004). Glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*: is it a real threat? *J Infect Chemother* 10, 69-75.

Geraci J.E. (1956). Some laboratory and clinical experiences with a new antibiotic, vancomycin.. p. 90-106. In Antibiotic annual 1955-1956. Medical Encyclopedia, New York, N.Y.

Gergely Lajos. (2003). Orvosi Mikrobiológia. Alliter Kiadói és Oktatásfejlesztő Alapítvány, Budapest, 2003.

Ghidán Á., Csiszár K., Jemei Cs., Maródi C.L., Rozgonyi F., (2000). PCR detection of the vanA gene in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*, *J Antimicrob Chemother*, 46, 325-326.

Ghidán Á., Kaszanyitzky É.J., Dobay O., Nagy K., Amyes S.G.B., and Rozgonyi F. (2008) Distribution and Genetic Relatedness of Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE) Isolated From Healthy Slaughtered Chickens in Hungary From 2001 to 2004. *Acta Veterinaria Hungarica*, 56 (1) pp. 13-25.

Gikas, A., A. Christidou, and E. Scoulica. (2005). Epidemiology and molecular analysis of intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in Greek hospitals. *J Clin Microbiol* 43, 5796-5799.

Gilmore, M. (2002). The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Goldblum, S. E, Reed, W. P, 272 Ulrich, J. A, Goldman, R. S. (1978). Staphylococcal carriage and infections in hemodialysis patients. *Dial Transplant* 7, 1140-1148.

Gould, I. M. (2008). Clinical relevance of increasing glycopeptide MICs against *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 31, 1-9.

Hiramatsu, K., Aritaka, N., Hanaki, H., Kawasaki, S., Hosoda, Y., Hori, S., Fukuchi, Y., Kobayashi, I. (1997a). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*, 350, 1670-1673.

Hiramatsu, K., Hanaki, H., Ino, T., Yabuta, K., Oguri, T., Tenover, F. C. (1997b). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 40, 135-136.

Howden BP, Davies JK, Hohnson PDR, Stinear TP, Grayson ML. (2010). Reduced Vancomycin Susceptibility in *Staphylococcus aureus*, Including Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Strains: Resistance Mechanisms, Laboratory Detection, and Clinical Implications. *Clin Microb Rev*, Jan, 2010, p99-139.

Ippolito G, Leone S, Lauria FN, Nicastrì E, Wenzel RP. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug. *Int J Infect Dis*. 14 Suppl 4:S7-11.

Ito, T., Y. Katayama, and K. Hiramatsu. (1999). Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*. 43:1449–1458.

IWG-SCC, International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements. (2009). Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*): Guidelines for Reporting Novel SCC*mec* Elements. 2009. *Antimicrobial Agents Chemother*, Dec. 2009, p. 4961–4967.

Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. (2004). Use of a genus and species specific multiplex PCR for identification of enterococci, *J Clin Microbol*, 42, 3558-3565.

Knausz M., Gartner B., Fömötör I., Ghidán Á., Kamotsay K., Rozgonyi F. (2003). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization during recovery from *Neisseria meningitidis* cerebrospinal meningitis, *Acta Microbiol Immunol Hung*, 50, 453-457.

Kobayashi, I., Muraoka, H., Iyoda, T., Nishida, M., Hasegawa, M., Yamaguchi, K. (2004). Antimicrobial susceptibility testing of vancomycin-resistant enterococcus by the VITEK 2 system, and comparison with two NCCLS reference methods. *J Med Microbiol* 53, 1229.

Kohner, P. C., Patel, R., Uhl, J. R., Garin, K. M., Hopkins, M. K., Weegenr, L. T., Cockreil, F. R. (1997). Comparison of agar dilution, broth microdilution, E-test, disk diffusion, and automated VITEK methods for testing susceptibilities of *Enterococcus* spp., to vancomycin. *J Clin Microbiol* 35, 3258.

Köck R, Becker K, Cookson B, van Gemert-Pijnen JE, Harbarth S, Kluytmans J, Mielke M, Peters G, Skov RL, Struelens MJ, Tacconelli E, Navarro Torné A, Witte W, Friedrich AW. (2010), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* 2010;15(41):pii=19688.

Kristóf K, Szabó Zs, Cser V, Kardo S, Ghidán Á, Rozgonyi F. (2005). Phenotypical differences in antibiotic resistance between MRSA and MSSA strains isolated from clinical samples of patients treated at the clinics of the Semmelweis University, *Clin Microb Infect*, 11(Suppl 2):305.

Kristóf Katalin. (2010). Egyetemi Doktori Értekezés: Nozokomiális fertőzéseket okozó multirezisztens baktériumok mikrobiológiai jellemzői, Budapest, 2010.

Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. (1988). Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med*, 319: 157-161.

Leclercq R, Dutka-Malen S, Duval J, Courvalin P. (1992). Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 36:2005–2008.

Liu C, Chambers HF. (2003). *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrobial Agents Chemother*, 47: 3040-3045.

Mainardi J.L., Shlaes D.M., Goering R.V., Shlaes J.H., Acar J.R. és Goldstein F.W. (1995). Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, 171:1646-1650.

Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Dupre, I. & Sechi, L. A. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int J Food Microbiol*, 88, 291–304.

McKessar SJ, Berry AM, Bell JM, Turnidge JD, Paton JC. (2000). Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44:3224–3228.

Méndez-Álvarez S., Xiomara Pérez-Hernández, Félix Claverie-Martín. (2000). Glycopeptide resistance in enterococci. *Internatl Microbiol*, 3:71–80.

Navarro F, és Courvalin P. (1994). Analysis of genes encoding d-alanine-d-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. *Antimicrob Agents Chemother*; 38:1788–1793.

Ogston A. (1882). Micrococcus poisoning. *J. Anat.* 17:24-58.

Oliveira, D. C., Lencastre, H. (2002). Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2155-2161.

Parenti F, Beretta M, Arioli V. (1978). Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* nov sp – Description of the producer strain, germentation studies and biooogical properties. *J Antibiot*, 31: 276-283.

Patel, R., J.R. Uhl, P. Kohner, M.K. Hopkins, and F.R. Cockerill 3rd. (1997). Multiplex PCR Detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-I*, and *vanC-2/3* Genes in Enterococci. *J Clin Microbiol* 35:703-707.

Patel R, Uhl JR, Kohner P, et al. (1998). DNA sequence variation within *vanA*, *vanB*, *vanC-I*, and *vanC-2/3* genes of clinical *Enterococcus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 42:202–205.

Patel, R., K. Piper, F. R. Cockerill III, J. M. Steckelberg, and A. A. Yousten. (2000). The biopesticide *Paenibacillus popilliae* has a vancomycin resistance gene cluster homologous to the enterococcal VanA vancomycin resistance gene cluster. *Antimicrob Agents Chemother*, 44:705–709.

Pendle, S., Jelfs, P., Olma, T., Su, Y., Gilroy, N., Gilbert, G. L. (2008). Difficulties in detection and identification of *Enterococcus faecium* with low-level inducible resistance to vancomycin, during hospital outbreak. *Clin Microbiol Infect* 14, 853.

Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. (1997). VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2016-2018.

Ploy, M. C., Grélaud, C., Martin, C. L., de Lumley, Denis, F. (1998). First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet*, 351, 1212.

Poh, C. H., Oh, H. M. L. & Tan, A. L. (2006). Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. *J Infect*, 52, 383–386.

Ramotar, K., Woods, W., Larocque, L., Toye, B. (2000). Comparison of phenotypic methods to identify enterococci intrinsically resistant to vancomycin (*vanC* VRE). *Diagn Microbiol Infect Dis* 36, 119.

Reynolds PE. (1989). Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 8:943–950.

Schleifer KH, Kilpper-Balz R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Sys Bacteriol*, 34:31–34.

Surucuoglu S., Gazi H., Kurutepe S., Ozkutuk N., Ozbakkaloglu B., (2005). Bacteriology of surgical wound infections in a tertiary care hospital in Turkey, *East Afr Med J*, 82:331-6

Szabó, J. (2009). hVISA/VISA: diagnostic and therapeutic problems. *Exp Rev Anti-Infect Ther* 7, 1-3.

Szalka András. (2009). Infekció okozta szisztémás gyulladásos reakció. Ludwig Endre-Szalka András (szerk). Infektológia-Egyetemi tankönyv. Medicina Könyvkiadó, 2009.

Székely E, Lőrinczi L, Bilca D, Fodor E, Sóki J, Sabau M. (2008). Incidence, antibiotic resistance and clonal relations of MRSA strains isolated from a Romanian university hospital. *Acta Microbiol Immunol Hung* 55:1–13.

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.

Tiemersma EW, Bronzwaer SLAM, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H; European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants, (2004). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. *Emerg Infect Dis*, 10,1627–1634.

Tóth, Á., Kispál, G., Ungvári, E., Violka, M., Szeberin, Z., Pászti, J., Molnár, K., Gacs, M., Füzi, M. (2008). First report of heterogenously vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) causing fatal infection in Hungary, *J Chemother*, 20, 655-656.

Uttley A.H., Collins C.H., Naidoo J., George R.C., (1988). Vancomycin-resistant enterococci, *Lancet*, 1,57-58.

van den Braak, N., Goessens, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., Endtz, H. P. (2001). Accuracy of the VITEK 2 system to detect glycopeptide resistance in enterococci. *J Clin Microbiol* 39, 351.

Werner, G., T.M. Coque, A.M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K.G. Kristinsson, R. Leclercq, C.H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L.V. Peixe, E. Sadowy, G.S. Simonsen, J. Top, J. Vuopio-Varkila, R.J. Willems, W. Witte, and N. Woodford. (2008). Emergence and spread of vancomycin resistance among Enterococci in Europe *Euro Surveill* 13(47):pii=19046.

Wright, G. D., (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol* 13:589-594.

Xiaogang Xu, Dongfang Lin, Guoquan Yan, Xinyu Ye, Shi Wu, Yan Guo, Demei Zhu, Fupin Hu, Yingyuan Zhang, Fu Wang, George A. Jacoby, and Minggu Wang. (2010). *vanM*, a New Glycopeptide Resistance Gene Cluster Found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 54:4643-4647.

Yean, C.Y., L.S. Yin, P. Lalitha, and M. Ravichandran. (2007). A nanoplex PCR assay for the rapid detection of vancomycin resistance genes in *Enterococcus* species. *BMC Microbiol*. 7:112.

Ziegler D.W. (1956). Vancomycin, a new antibiotic II. In vitro antibacterial studies. 1956 p. 612-618. In Antibiotic annual 1955-1956. Medical Encyclopedia, New York, N.Y.

Zmudzinska M., Czarnecka-Operacz M., Silny W., (2005). Bacterial flora of leg ulcers in patients admitted to Department of Dermatology, Poznan University of Medical Sciences, during the 1998-2002 period, *Acta Dermatovenerol Croat*, 13:168-172

10.2. Saját közlemények jegyzéke

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Szabó J, **Dombrádi Z**, Dobay O, Orosi P, Kónya J, Nagy K, Rozgonyi F.: Phenotypic and genetic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from the university hospitals of Debrecen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Feb;28(2): 129-36. Epub 2008 Oct 2.

Zsuzsanna Dombrádi, Ferenc Bodnár, Piroska Orosi, Viktor Dombrádi, Judit Szabó: A case report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization of a femoral wound in central europe. *Central European Journal of Medicine*, Volume 4, Number 2,259-261, DOI: 10.2478/s11536-009-0008-7 (2009 June)

Zsuzsanna Dombrádi, Z. Bihari, Katalin Illésné Horváth, Judit Szabó: Comparison of the VITEK 2 System with the E-test for the determination of glycopeptide susceptibility of VanA and VanC positive enterococci, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 57 (3), pp. 157–163 (2010) DOI: 10.1556/AMicr.57.2010.3.1

Zsuzsanna Dombrádi, Orsolya Dobay, Károly Nagy, Anita Kozák, Viktor Dombrádi, Judit Szabó: Prevalence of vanC VRE in the teaching hospitals of the University of Debrecen, Hungary. *Microbial Drug Resistance* (nyomdában)

További közlemény

Trencsényi G, Kertai P, Somogyi C, Nagy G, **Dombrádi Z**, Gacsi M, Banfalvi G.: Chemically induced carcinogenesis affecting chromatin structure in rat hepatocarcinoma cells. *DNA Cell Biol*. 2007 Sep;26(9):649-55

11. TÁRGYSZAVAK

11.1. Tárgyszavak

antibiotikum rezisztencia, epidemiológiai felmérés, vancomycin rezisztens enterococcus (VRE), methicillin rezisztens staphylococcus (MRSA), vancomycinre mérsékelten heterorezisztens *S. aureus* (hVISA), molekuláris diagnosztika, polimeráz láncreakció (PCR), pulzáló erőterű gélelektroforézis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST)

11.2. Keywords

antibiotic resistance, epidemiologic survey, vancomycin resistant enterococci (VRE), methicillin resistant staphylococci (MRSA), heterogeneously vancomycin-intermediate sensitive *S. aureus* (hVISA), molecular diagnosis, polymerase chain reaction (PCR), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST)

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek Dr. Szabó Juditnak, hogy tanácsaival, útmutatásaival mindig segítségemre volt.

Köszönöm Dr. Kónya Józsefnek valamint Gergely Lajos Professzor Úrnak, hogy a DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézetében lehetővé tették számomra a PhD tanulmány elkészítését.

Köszönet illeti az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden munkatársát, különösen a Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumban dolgozók munkáját.

Köszönöm Dr. Dobay Orsolyának a PFGE vizsgálatok elvégzését, a módszer megmutatását, illetve Dr. Kardos Gábornak a módszer használatánál nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Tóth Ákosnak a populáció analízis görbék elkészítését, és szakmai tanácsait.

Köszönöm Ungvári Erikának a staphylococcus törzsek SCCmec valamint MLST tipizálását.

Köszönöm Dr. Horváth Juditnak az MRSA törzsek fágtipizálását.

Köszönettel tartozom Maródi László Professzor Úrnak, hogy a hVISA3 törzs MLST vizsgálatát az Infektológia és Gyermekimmunológiai Tanszéken elvégezhettem.

Köszönöm az Orvosi Vegytani Intézet munkatársainak a segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm barátaim és családom támogatását, különösen édesapámét, akihez szakmai tanácsokért és útmutatásokért is fordulhattam.

13. FÜGGELÉK

13.1. A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár által hitelesített publikációs lista

13.2. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai

Iktatószám: DEENKÉTK /133/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

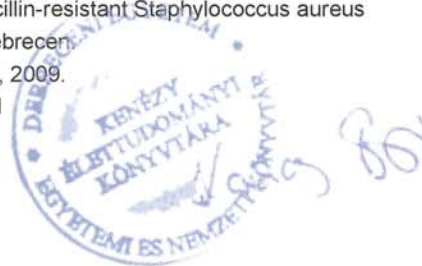
Jelölt: Dombrádi Zsuzsanna

Neptun kód: KWWF8C

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Dombrádi, Zs.**, Dobay, O., Nagy, K., Kozák, A., Dombrádi, V., Szabó, J.: Prevalence of vanC VRE in the teaching hospitals of the University of Debrecen, Hungary.
Microb. Drug Resist. "accepted by publisher", 2011.
IF:1.989 (2009)
2. **Dombrádi, Zs.**, Bihari, Z., Illésné Horváth, K., Szabó, J.: Comparison of the VITEK 2 system with the E-test for the determination of glycopeptide susceptibility of vanA and vanC positive enterococci.
Acta Microbiol. Immunol. Hung. 57 (3), 157-163, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/AMicr.57.2010.3.1>
3. **Dombrádi, Zs.**, Bodnár, F., Orosi, P., Dombrádi, V., Szabó, J.: A case report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization of a femoral wound in central europe.
Cent. Eur. J. Med. 4 (2), 259-261, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2478/s11536-009-0008-7>
IF:0.224
4. Szabó, J., **Dombrádi, Zs.**, Dobay, O., Orosi, P., Kónya, J., Nagy, K., Rozgonyi, F.: Phenotypic and genetic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from the university hospitals of Debrecen.
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 28 (2), 129-136, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-008-0588-1>
IF:2.605



További Közlemények

5. Trencsényi, G., Kertai, P., Somogyi, C., Nagy, G.G., **Dombrádi, Zs.**, Gácsi, M., Bánfalvi, G.:
Chemically induced carcinogenesis affecting chromatin structure in rat
hepatocarcinoma cells.
DNA Cell Biol. 26 (9), 649-655, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2007.0587>
IF:1.861

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött
adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal
Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.05.04



Prevalence of *vanC* Vancomycin-Resistant Enterococci in the Teaching Hospitals of the University of Debrecen, Hungary

Zsuzsanna Dombrádi,¹ Orsolya Dobay,² Károly Nagy,² Anita Kozák,¹ Viktor Dombrádi,³ and Judit Szabó¹

Vancomycin-resistant enterococci (VRE) are common nosocomial pathogens; however, until now they have been rarely encountered in Hungary. In the present study, we investigated the prevalence of VRE in the teaching hospitals of the University of Debrecen. Of 7,271 *Enterococcus*-containing clinical samples collected between 2004 and 2009, we identified 16 VRE. Species-specific polymerase chain reaction was used to detect *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus*, and *Enterococcus gallinarum*. Multiplex polymerase chain reaction was performed to identify the vancomycin resistance genes: *vanA*, *vanB*, *vanC1/C2*, *vanD*, *vanE*, and *vanG*. Restriction digestion with *SalI* and *HindIII* was introduced to differentiate the *vanC1* and *vanC2* genes from each other. Genetic relationships between the strains were investigated by pulsed-field gel electrophoresis. Overall, we identified the *vanC1* resistance gene in 14 *E. gallinarum* and the *vanC2* resistance gene in two *E. casseliflavus* strains. Except for two samples, the isolates had different pulsed-field gel electrophoresis types, suggesting sporadic emergence of the resistant bacteria. In addition, antibiotic resistance profile was determined by E-test. Three *E. gallinarum* strains proved to be resistant to gentamicin because of the presence of the *aacA-aphD* gene. Although the prevalence of VRE in Debrecen is rather low, the appearance of multiple resistances is of concern.

Introduction

OVER THE LAST DECADE, enterococci have emerged as a significant cause of nosocomial infections in many parts of the world. Enterococci represent the third leading cause of bacteremia and the second leading cause of urinary tract infections.⁶ The widespread use and misuse of glycopeptides in humans and in live stock have resulted in the rapid increase of vancomycin-resistant enterococci (VRE) strains.²² The first VRE cases were reported in 1988.^{17,25} The occurrence of VRE in the United States is approximately 20%–30%, whereas in Europe the prevalence varies between 1% and 50%.¹⁰ Within Europe, in 2000, the incidence of *vanA* VRE was the highest in the United Kingdom (2.7%), whereas Slovenia had the highest prevalence of *vanB* VRE (2%) and the *vanC*-carrying VRE was the most frequent in Latvia (14.3%).²¹ In Hungary, the first clinical isolate of *Enterococcus faecalis* harboring the *vanA* gene was reported in 2000, one case of a *vanA*-positive *E. faecalis* colonization was described in 2003, and the first human outbreak caused by a *vanB*-positive *Enterococcus faecium* was reported in 2005.^{3,13,16} We have recently described an infection caused by a *vanA*-type

E. faecalis,⁸ but until now there have been no reports on *vanC* gene-carrying VRE from our country. The aim of the present study was to determine the prevalence of *vanC* VRE in the teaching hospitals of the Medical and Health Science Centre at the University of Debrecen, Hungary. The Bacterial Diagnostic Laboratory of the Center serves 17 clinical departments and analyses approximately 30,000 samples annually. We initiated VRE screening in 2004 and here we report the results of a 6-year survey. The resistant strains were characterized by molecular genetic methods, and their susceptibility to a panel of commonly used antibiotics was also determined.

Materials and Methods

Bacterial strains

Clinical samples were analyzed by routine laboratory procedures.¹² Gram-positive, catalase-negative cocci were tested for growth on bile-esculin agar (Oxoid). Enterococci were further subcultured on brain heart infusion screen agar plates containing 6 mg/L vancomycin (Oxoid). The minimum inhibitory concentrations of vancomycin, teicoplanin,

¹Department of Medical Microbiology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary.

²Institute of Medical Microbiology, Semmelweis University, Budapest, Hungary.

³Department of Medical Chemistry, University of Debrecen, Debrecen, Hungary.

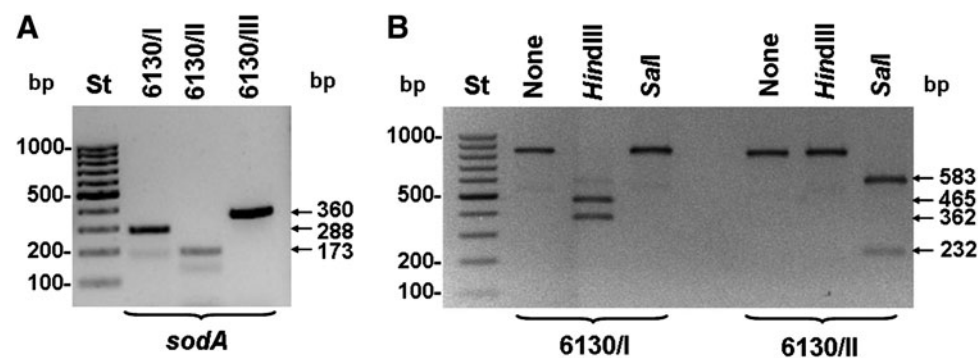


FIG. 1. Identification of enterococci in clinical sample No. 6130. **(A)** Species identification by *sodA*-specific polymerase chain reaction: strains 6130/I, 6130/II, and 6130/III were identified as *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*, and *Enterococcus faecalis*. **(B)** Differentiation between *vanC1* and *vanC2* genes by restriction analysis: polymerase chain reaction products of strains 6130/I and 6130/II were loaded without digestion (None) and after digestion with *HindIII* or *SalI*. St labels the 100-bp DNA ladder in both panels. The sizes of the characteristic bands are indicated by arrows.

linezolid, ampicillin, tigecycline, daptomycin, gentamicin, and amoxicillin/clavulanate were determined by E-tests (AB Biodisk). The results were interpreted according to EUCAST breakpoints¹¹ except for daptomycin, which was evaluated according to CLSI.⁵

Polymerase chain reaction

Cell lysates were prepared by boiling cultured bacteria pellets in DNase-free water for 10 minutes.²⁷ Multiplex polymerase chain reaction (PCR) was performed with the primer pairs specific for the vancomycin resistance genes: *vanA*, *vanB*, *vanC1/C2*, *vanD*, *vane*, and *vanG* as well as the *E. faecalis* and *E. faecium* D-alanine:D-alanine ligase (*ddl*) genes for species identification.⁷ In addition, *E. faecalis*, *Enterococcus casseliflavus*, and *Enterococcus gallinarum* species were identified using superoxide dismutase (*sodA*) gene-specific primers.^{7,15} High-level gentamicin resistance was confirmed by PCR²⁷ with the modified *aacA*-aphD primer pair (*acph*-F: GATTGCGCAGAACATGAATTACAC and *acph*-R: ATCA TAACCACTACCGATTATTTC).

Restriction fragment length polymorphism

To differentiate the *vanC1* and *vanC2* genes from each other, samples producing amplicons of 815 or 827 bp (*vanC1* or *vanC2*) in the multiplex setup were further investigated by a separate PCR performed with *vanC1/C2*-specific primers followed by restriction analysis with 2 U of *SalI* or *HindIII* at 37°C for 2 hours. The *vanC1* PCR product was specifically cleaved by *SalI*, whereas *HindIII* cut only the *vanC2* PCR product (Fig. 1B). DNA sequencing confirmed the validity of our restriction fragment length polymorphism approach (Table 1).

DNA sequencing and multilocus sequence typing

Multilocus sequence typing of one *E. faecalis* species was performed by sequencing internal gene fragments for seven housekeeping genes (*gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt*, *yiqL*) according to Aanensen and Spratt.¹ Each gene was amplified with *Pfu* DNA polymerase. PCR products were purified either with the Microcon Ultracell YM-100 column (Amicon) or with the Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Pro-

mega) and were sequenced on both strands. Gene identification was done by the blastn algorithm,² and DNA sequences were compared with ClustalW2.⁴

Pulsed-field gel electrophoresis

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed as previously described for *Staphylococcus aureus*,²³ with the following modifications: The bacteria were re-

TABLE 1. IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF VANCOMYCIN-RESISTANT ENTEROCOCCI CLINICAL ISOLATES

Sample number	Year of isolation	Specimen type	Species	Resistance gene
11876	2004	Urine	<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>vanC1</i> *
2479	2004	Wound secretion	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i> *
6130/I	2005	Urine	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>vanC2</i> *
6130/II			<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>
6130/III			<i>Enterococcus faecalis</i>	—
13053	2006	Abscess	<i>E. casseliflavus</i>	<i>vanC2</i>
5588	2007	Catheter	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>
24525	2007	Catheter	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i> , <i>aacA-aphD</i>
23610	2007	Urine	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i> , <i>aacA-aphD</i>
24836	2007	Urine	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>
99	2008	Wound secretion	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i> , <i>aacA-aphD</i>
4984	2008	Wound secretion	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>
10048	2008	Ascites	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>
13698	2008	Blood	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>
3834	2009	Ascites	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>
4445	2009	Decubitus	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>
8043	2009	Urine	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>

*Confirmed by DNA sequencing.

suspended in 300 µl of cell suspension buffer (1M NaCl and 10 mM Tris [pH 8.0]) and the plugs were incubated at 37°C for 3 hours in 3 ml of EC lysis buffer, containing 25 U mutanolysin, 0.5 mg/ml lysozyme, and 166 µg/ml of RNase A. The second incubation was at 54°C for 19–20 hours in 3 ml ES buffer (0.5M EDTA and 1% N-lauroyl sarcosine) containing 133.3 µg/ml proteinase K. Each plug was digested with 15 U of *Sma*I (Promega) for 4 hours at 25°C. PFGE profiles were analyzed with the BioNumerics program version 2.5 (Applied Maths BVBA) using the UP-GMA/Dice coefficient with 2% optimization and 2% band position tolerance.

Results

In a 6-year period from 2004 to 2009, our diagnostic laboratory isolated overall 7,271 enterococci from clinical samples and 16 of them grew on VRE screening plates. According to the multiplex PCR, only one isolate harbored the *vanA* gene, which was previously published.⁸ In addition, 15 clinical samples contained the *vanC* resistance gene. The distribution of enterococcal isolates by sample number, year of isolation, specimen type, species, and the detected resistance genes are presented in Table 1. Initially, we confirmed the *vanC* genes by DNA sequencing (Table 1). The sequences of 815 or 827 nucleotides turned out to be identical to the corresponding segments of the published *vanC1* or *vanC2/3* genes of *E. gallinarum* and *E. casseliflavus* (GenBank accession numbers: EU151772 and EU151764, respectively). Later on, we differentiated the two genes with a new method based on restriction analysis. Instead of *Msp*I, which cleaves both *vanC1* and *vanC2* PCR fragments,¹⁷ we introduced two specific restriction enzymes *Sal*I and *Hind*III. With this method we found one clinical sample (No. 6130) that was affected by both enzymes,

suggesting the presence of both *vanC1* and *vanC2*. By spreading the original clinical sample and picking single colonies, we separated three subcultures. According to the *sodA*-specific PCR, we identified them as *E. casseliflavus* (No. 6130/I), *E. gallinarum* (No. 6130/II), and *E. faecalis* (No. 6130/III) (Fig. 1A). As it is unusual that one patient can be affected with three *Enterococcus* species at the same time, we investigated this case in detail. In a subsequent screening with 6 mg/L vancomycin-containing agar plates, only the *E. casseliflavus* and *E. gallinarum* strains proved to be VRE. The restriction analysis revealed that isolate 6130/I contained the *vanC2* and isolate 6130/II harbored the *vanC1* resistance gene (Fig. 1B). The accompanying vancomycin-susceptible *E. faecalis* was genotyped by multilocus sequence typing. It represented a novel ST, because by sequencing the acetyl-CoA acetyltransferase (*yqiL*) gene we found a single-nucleotide replacement of C to T at position 187 when compared with allele *yqiL*-8. The new allele and sequence type were termed *yqiL*-64 and ST-336, respectively.¹ We found 1 more *vanC2*-carrying *E. casseliflavus* and 13 *vanC1*-carrying *E. gallinarum* strains (Table 1). To determine the genetic relatedness of the resistant strains, we performed PFGE (Fig. 2). PFGE patterns were analyzed according to Tenover et al.²⁴ Two *E. gallinarum* isolates (Nos. 8043 and 3834) were found to have indistinguishable genotypes, and six formed one cluster with >90% identity. The rest of the *E. gallinarum* were genetically unrelated and the *E. casseliflavus* strains also had no genetic relationships (Fig. 2). The resistance of the 16 *vanC*-positive isolates was tested against the following panel of antibiotics: linezolid, ampicillin, tigecycline, daptomycin, gentamicin, and amoxicillin/clavulanate. Beside the vancomycin resistance, three *E. gallinarum* were also highly resistant to gentamicin. The bifunctional aminoglycoside resistance gene (*aacA-aphD*) was identified by PCR in the latter samples (Table 1).

F2

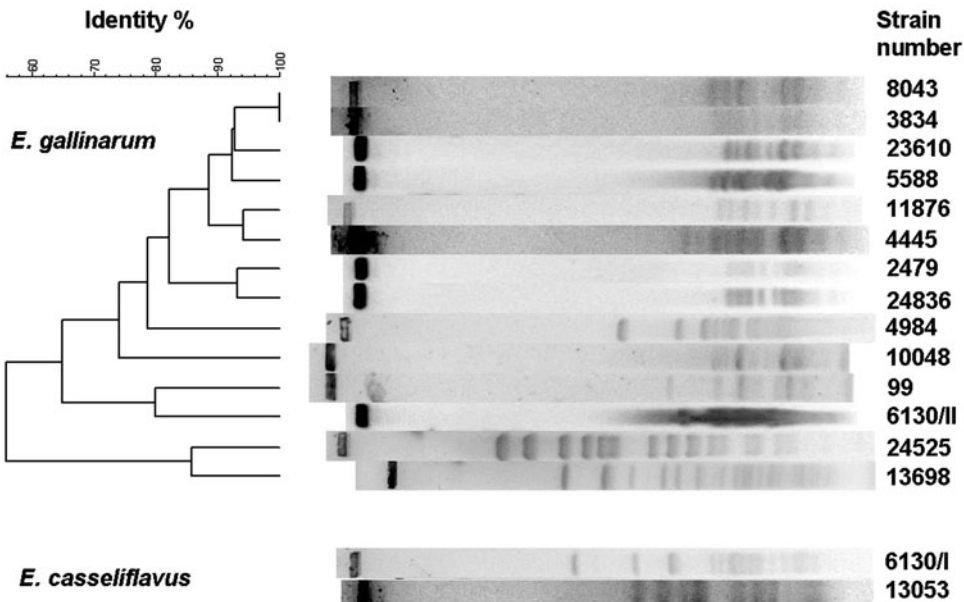


FIG. 2. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of vancomycin-resistant enterococci strains. *VanC1*-containing *E. gallinarum* and *vanC2*-containing *E. casseliflavus* were tested separately. The dendrogram was constructed with the BioNumerics program; the software normalized the positions of the lanes to get a correct comparison.

Discussion

Serious VRE infections occur usually in patients with compromised immune defense. This condition underlines the importance of effective antimicrobial treatment. Rapid detection of resistant phenotypes is essential for adequate empirical therapy and controlling transmission.²⁰ For susceptibility testing, the most appropriate method is the E-test, which requires 24 hours of incubation. Although, the VITEK 2 system provides susceptibility results in approximately 8 hours, its 3.01 software version is not always suitable to identify low-level glycopeptide resistance in *Enterococcus* strains.⁹ Therefore, the best method for the rapid detection of vancomycin resistance is the identification of *van* genes by PCR.

In the clinical practice, the molecular characterization of resistance genes focuses on the identification of *vanA* and *vanB*, because these strains have higher levels of resistance to vancomycin. The *vanA* and *vanB* operons are located on mobile genetic elements, which allow resistance to spread clonally and laterally; therefore, they are of special epidemic concern. In contrast, *vanC*-type strains encode low-level resistance and the gene is located in the bacterial chromosome.²⁶ Although the *vanC* genotype is somewhat neglected, *vanC*-carrying enterococci can cause just as much serious clinical infections as any other VRE.¹⁸ Inadequate empirical use of vancomycin in these cases can result in therapeutic failure, prolonged hospitalization, and increased costs of medical care.

In agreement with earlier European data,¹⁴ our study demonstrates that the prevalence of *vanC1* was higher than *vanC2* in Debrecen, Hungary. A similar ratio between the two genes was found earlier in an American study.¹⁹ Multiple infections caused by different resistant *Enterococcus* species are of special interest, because most of these cases remain unrecognized in conventional routine laboratory testing. The molecular investigation of one clinical sample revealed that one of our patients was affected by three different kinds of enterococci, two of which were VRE. Three other patients were infected by vancomycin-resistant *E. gallinarum*, which were also highly resistant to gentamicin. These strains carried the *aacA-aphD* in addition to the *vanC1* resistance gene. As the three strains were genetically unrelated by PFGE, it is likely that they acquired double antibiotic resistance independently. The PFGE profiles also support the hypothesis that most of the VRE strains appeared sporadically. Only two *E. gallinarum* strains isolated in 2009 had identical PFGE profiles. Both samples (Nos. 3834 and 8043) were collected from the surgery departments of the hospital, but the patients were treated in different wards and in different time periods, and thus a direct contact between them can be excluded. Fortunately, the incidence of *vanC*-harboring enterococci is rather low (0.22%) in Debrecen, Hungary, and multiple resistance was encountered only in a few cases (0.04%). Susceptibility testing identified several antibiotics that were effective, allowing the successful treatment of the patients.

Acknowledgments

The authors are grateful to the staff of the Bacteriological Diagnostic Laboratory, University of Debrecen, Hungary, for the isolation of enterococci from clinical samples. The au-

thors thank Dr. József Kónya (Department of Medical Microbiology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary) for his valuable suggestions during the preparation of the manuscript. The present study was supported by a Postgraduate Research Grant of the University of Debrecen, Hungary.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Aanensen, D.M., and B.G. Spratt. 2005. The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* **33**: W728–W733.
2. Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403–410.
3. Borocz, K., E. Szilagyi, A. Kurcz, B. Libisch, K. Glatz, and M. Gacs. 2005. First vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak reported in Hungary. *Euro. Surveill.* **10**:E050127.
4. Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T.J. Gibson, D.G. Higgins, and J.D. Thompson. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* **31**:3497–3500.
5. CLSI. 2009. M100-S19, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 19th Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
6. de Fátima Silva Lopes, M., T. Ribeiro, M. Abrantes, J.J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro, and M.T.B. Crespo. 2005. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* **103**:191–198.
7. Depardieu, F., B. Perichon, and P. Courvalin. 2004. Detection of the *van* alphabet and identification of Enterococci and Staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**:5857–5860.
8. Dombrádi, Zs., F. Bodnár, P. Orosi, V. Dombrádi, and J. Szabó. 2009. A case report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization of a femoral wound in central Europe. *Cent. Eur. J. Med.* **4**:259–261.
9. Dombrádi, Zs., Z. Bihari, K.I. Horváth, and J. Szabó. 2010. Comparison of the VITEK 2 system with the E-test for the determination of glycopeptide susceptibility of *vanA* and *vanC* positive enterococci. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **57**:157–163.
10. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2009. EARSS Annual Report 2008. Available at www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Documents/2008_EARSS_Annual_Report.pdf. (Online.) ◀AU1
11. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). 2010. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.1 April 2010. Available at www.eucast.org/clinical_breakpoints/. (Online.) ◀AU1
12. Facklam, R.R., and J.A. Washington. 1991. Streptococcus and related catalase-negative gram-positive cocci. In A. Balows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 5th edition. ASM Press, Washington, DC, pp. 238–257.
13. Ghidán, A., C. Jeney, C.L. Maródi, K. Csiszár, and F. Rozgonyi. 2000. PCR detection of the *vanA* gene in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolate from Hungary. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:325–326.

- AU2** ▶ 14. Gikas, A., A. Christidou, and E. Scoulica. 2005. Epidemiology and molecular analysis of intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in Greek hospitals. *J. Clin. Microbiol.* **43**:5796–5799.
15. Jackson, C.R., P.J. Fedorka-Cray, and J.B. Barrett. 2004. Use of a genus and species specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3558–3565.
16. Knausz, M., B. Gartner, I. Fomotor, A. Ghidan, K. Kamotsay, and F. Rozgonyi. 2003. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization during recovery from *Neisseria meningitidis* cerebrospinal meningitis. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **50**:453–457.
17. Ledercq, R., E. Derlot, J. Duval, and P. Courvalin. 1988. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* **319**:157–161.
18. Pappas, G., E. Liberopoulos, E. Tsianos, and M. Elisaf. 2004. *Enterococcus casseliflavus* bacteremia. Case report and literature review. *J. Inf.* **48**:206–208.
19. Patel, R., J.R. Uhl, P. Kohner, M.K. Hopkins, and F.R. Cockerill, 3rd. 1997. Multiplex PCR detection of *vanA*, *vanB*, *vanC-1*, and *vanC-2/3* genes in Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **35**:703–707.
20. Ratanasuwon, W., P.C. Iwen, S.H. Hinrichs, and M.E. Rupp. 1999. Bacteremia due to motile *Enterococcus* species: clinical features and outcomes. *Clin. Inf. Dis.* **28**:1175–1177.
21. Shouten, M.A., J.A. Hoogkamp-Korstanje, J.F. Meis, and A. Voss. 2000. Prevalence of vancomycin resistant Enterococci in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **19**:816–822.
22. Simonsen, G.S., L. Smabrekke, D.L. Monnet, T.L. Sorensen, J.K. Moller, K.G. Kristinsson, A. Lagerqvist-Widh, E. Torrel, A. Digranes, S. Harthug, and A. Sundsfjord. 2003. Prevalence of resistance to ampicillin, gentamicin and vancomycin in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from clinical specimens and use of antimicrobials in five Nordic hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:323–331.
23. Szabó, J., Z. Dombrádi, O. Dobay, P. Orosi, J. Kónya, K. Nagy, and F. Rozgonyi. 2008. Phenotypic and genetic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from the university hospitals of Debrecen. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **28**:129–136.
24. Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233–2239.
25. Uttley, A.H., C.H. Collins, J. Naidoo, and R.C. George. 1988. Vancomycin resistant enterococci. *Lancet* **1**:57–58.
26. Werner, G., T.M. Coque, A.M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, et al. 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among Enterococci in Europe. *Euro. Surveill.* **13**:pii=19046. Available at www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19046. (Online).
27. Yean, C.Y., L.S. Yin, P. Lalitha, and M. Ravichandran. 2007. A nanoplex PCR assay for the rapid detection of vancomycin resistance genes in *Enterococcus* species. *BMC Microbiol.* **7**:112.

Address correspondence to:

Zsuzsanna Dombrádi

Department of Medical Microbiology

University of Debrecen

P.O.B. 17

H-4012 Debrecen

Hungary

E-mail: zsuzsanna.dombradi@gmail.com

◀AU3

COMPARISON OF THE VITEK 2 SYSTEM WITH THE E-TEST FOR THE DETERMINATION OF GLYCOPEPTIDE SUSCEPTIBILITY OF *VANA* AND *VANC* POSITIVE ENTEROCOCCI

ZSUZSANNA DOMBRÁDI*, Z. BIHARI, KATALIN ILLÉSNÉ HORVÁTH
and JUDIT SZABÓ

Institute of Medical Microbiology, Medical and Health Science Center, Debrecen University,
Debrecen, Hungary

(Received: 2 July 2010; revised: 7 July 2010; accepted: 22 July 2010)

The performance of the VITEK 2 System (bioMérieux) version 3.01 software was compared to that of the E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) for antibiotic susceptibility testing of 17 clinical isolates of vancomycin resistant enterococcus (VRE). Antibiotic Susceptibility Testing (AST) by VITEK 2 produced 10 minor (59%) errors, resulting in false phenotypes. Reporting of vancomycin resistance in enterococcal strains has enormous therapeutic and epidemiological consequences. Therefore, at laboratories using automated systems (e.g. VITEK 2) for routine microbiological susceptibility testing data must be confirmed by independent validated methods, e.g. E-test, or microdilution.

Keywords: enterococci, antibiotic susceptibility, VRE, *vanA*, *vanC*

Introduction

Vancomycin-resistant enterococci (VRE) have emerged as important nosocomial pathogens in the United States and in Europe [3, 7]. Rapid detection of VRE is essential for the implementation of appropriate control measures to prevent the spread of VRE [12]. The rapid increase of glycopeptide resistance among enterococci causes great concern because of limited treatment options in case of human infections. Moreover, VRE strains are able to transfer glycopeptide resis-

* Corresponding author; E-mail: zsuzsanna.dombradi@gmail.com

tance determinants located on mobile genetic elements to other pathogens such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [4]. Several glycopeptide resistance genes are known in enterococci, out of these the *vanA*, *vanB*, and *vanC* genes are the most relevant clinically [8]. The *vanA* genotype is the predominant type of resistance reported in Europe; it confers high-level resistance to both vancomycin and teicoplanin. The *vanB* positive isolates are resistant to vancomycin and susceptible to teicoplanin. The *vanC* genotype provides constitutive, low-level resistance to vancomycin but is sensitive to teicoplanin [8]. In Hungary, the first *vanA* containing *E. faecalis* strain was isolated in 2000 [11], since then two case reports and one outbreak have been published [2, 6, 13]. The frequency of VRE infections in Hungary is fortunately very low.

The VITEK 2 system is a recently developed automated method for rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. The usefulness of the VITEK 2 system for identifying *Enterococcus* species has already been reported [1]. However, difficulties in detecting bacterial resistance to vancomycin with several automated susceptibility test systems have been emphasized [8, 15, 16, 18]. Better screening and confirmation methods for detection of low-level vancomycin resistance are needed to improve surveillance and prevent transmission of VRE [12].

The accuracy of 2 different methods, the VITEK 2 automated system (bioMérieux) and the E-test (AB Biodisk), was compared for resistance determination of 17 VRE isolates with two glycopeptide resistance types including 1 *vanA* gene and 16 *vanC* gene harboring isolates.

Materials and Methods

Isolation and identification of enterococci

Between 2004 and 2009 17 vancomycin resistant enterococcus (VRE) strains were isolated from different units of the University of Debrecen. According to molecular genotyping, one strain carried the *vanA* resistance gene [6], and 16 strains harbored the *vanC* gene (unpublished data).

All enterococcal isolates had previously been identified in a routine microbiology laboratory on the basis of colony morphology, Gram-staining, catalase production, pyrrolidonyl arylamidase detection, Lancefield group D antigen testing, motility testing yellow pigment production, and by the Rapid ID32 Strep tests (bioMérieux).

Determination of resistance against vancomycin and teicoplanin

MICs for vancomycin and teicoplanin were determined by the E-test method (AB Biodisk, Solna, Sweden) according to the manufacturer's instructions. The E-test inoculum was prepared in brain heart infusion broth (Becton Dickinson) and was diluted to an inoculum density of 2 McFarland. One hundred ml of this suspension was pipetted onto brain heart infusion agar (Becton Dickinson) and the plates were incubated at 35 °C in ambient air for 24 h. MICs were confirmed after 48 h of incubation. Interpretation of MIC results was done based on the criteria recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute [5].

The VITEK 2 (bioMérieux) is an automated system for species identification and antimicrobial susceptibility testing. Isolates were subcultured onto sheep blood agar and incubated for 24 h at 37 °C before testing by the VITEK 2 system (software version 3.01). The inoculum was prepared by diluting bacteria in 0.45% sodium chloride solution to a density of 0.5 McFarland. The AST-P524 card was used for the antimicrobial susceptibility testing. In this study, the performance of the VITEK 2 system was evaluated for testing susceptibility against vancomycin and teicoplanin only. The AST-P524 card contains the following concentrations of the antibiotics: vancomycin, 2, 4, and 8 µg/ml; teicoplanin, 0.5, 1, 2, 4, 8, and 16 µg/ml.

Calculation of interpretation errors

CLSI breakpoints were used to calculate very major, major, and minor interpretation errors between the VITEK 2 system and the E-test. Very major errors were defined when the results were obtained as susceptible by the VITEK 2 system, but resistant by the E-test. Major errors were defined when the results were obtained as resistant by the VITEK 2 system, but susceptible by the E-test. A minor error was defined as discrepancy between the results of the E-test and the VITEK 2 system that differed only by one interpretation category (for example: resistant instead of intermediate, or susceptible instead of intermediate) [18]. One of the clinical isolates, the *vanA* positive *E. faecalis* (resistant positive control strain) and the ATCC 29212 *E. faecalis* (sensitive negative control strain) were used in the control experiments. Each measurement was repeated three times. All independent experiments gave the same results.

Results

First, the results of the VITEK 2 system were compared to the results of the E-tests. Table 1 shows the MIC results of vancomycin and teicoplanin obtained by the VITEK 2 system and the E-test for 17 enterococci. The *vanA* strain was classified correctly by both systems. In this study, no problems were found in the evaluation of teicoplanin MIC levels either. All *vanC* positive strains were susceptible (MIC = 8 mg/l) to teicoplanin by both methods. However, the teicoplanin MICs for 15 strains were in the range of 0.5–2 mg/l in the susceptibility region when determined by the VITEK 2 system, but these MICs showed a broad distribution between concentrations of 0.25–4 mg/l when determined by E-test. Thus, the E-test proved to be more discriminative. As for vancomycin, minor errors were found in 10 cases. Vancomycin MICs in the resistance region (MIC $\geq$ 32 mg/l) were obtained in 5 of the 17 strains, and 6 of the 17 strains were determined as susceptible (MIC = 4 mg/l) using the VITEK 2 system. The latter 6 strains that were intermediate sensitive by the E-test appeared to be susceptible according to the VITEK 2 system. In 4 cases the intermediate sensitive strains (MIC 8–16 mg/l) were determined by VITEK 2 as resistant with interpretation of *vanB* phenotype (Table II). Taken together, the vancomycin susceptibilities were mistakenly determined in 10 (59%) of the 17 strains by the VITEK 2 system.

Conclusions

VITEK 2 systems have been acquired recently by many microbiological laboratories for rapid identification and determination of antimicrobial resistance of different types of bacteria, including enterococci [9]. When testing enterococcus infections it is necessary to confirm the speed and accuracy of the VITEK 2 system in determining MICs of glycopeptides. Rapid detection of resistant phenotypes is essential for effective antibiotic treatment and controlling transmission [12]. For identification and susceptibility testing, most of the conventional methods require a full 24 h of incubation, while VITEK 2 provides susceptibility results in approximately 8 h. Rapid reporting of susceptibility results may have important benefits in terms of patient outcome and cost-effectiveness [18].

The aim of this study was to compare the reliability of 2 different laboratory tests (VITEK 2, and E-test) in determining glycopeptide resistance of enterococcus strains. Several reports have described discrepancies regarding detection of glycopeptide resistance by the VITEK 2 in enterococci [8, 15, 16, 18]. Other

Table I
Determination of vancomycin and teicoplanin MICs for 17 VRE using the VITEK 2 system versus the E-test*

Isolate (no.)	Method	No. of isolates with the following vancomycin MIC (mg/l)					No. of isolates with the following teicoplanin MIC (mg/l)						
		≤1	2	4	8	16	≥32	≤0.25	0.5	1	2	4	≥32
<i>vanA</i> (1)	VITEK 2						1						1
	E-test						1						1
<i>vanC</i> (16)	VITEK 2	1	2	3	6		4		14	1	1		
	E-test				13	3		1	3	6	4	2	
ATCC 29212 (1)	VITEK 2	1						1					
	E-test	1						1					

* Clinical Laboratory Standards Institute breakpoints (2009): vancomycin resistant = ≥32, intermediate sensitive = 8–16, susceptible = ≤4, teicoplanin resistant = ≥32, intermediate sensitive = 16, susceptible = ≤8.
The numbers represent the results of three independent experiments.

Table II
Discrepancies between the classification of VRE genotypes with the VITEK 2 system and PCR

No. of strains tested	Genotype determined by PCR	Correct	Discordant phenotype	VITEK2
1	<i>vanA</i>	1	0	<i>vanA</i>
16	<i>vanC</i>	6	10	<i>vanB</i> (4), sensitive (6)
Total: 17	–	Total: 7 (41%)	10 (59%)	–

studies, however, reported a reliable accuracy of this system for detecting *vanA*, and *vanB* strains [10, 14, 17]. In this work, the VITEK 2 AST-P524 card correctly identified teicoplanin resistance or sensitivity in all strains tested from the PCR proven glycopeptid resistant culture collection, but failed to detect the low-level vancomycin resistance (minor error) in 59% of VRE strains containing the *vanC* resistance gene that resulted in the misidentification of the resistance type. The *vanC* phenotypes were interpreted as *vanB* phenotypes in 24% of the samples, and as vancomycin sensitive in 35% by the VITEK 2 system.

To our knowledge, very few studies have evaluated the VITEK 2 system for the detection of *vanC* phenotypes. These data indicate that the VITEK 2 version 3.01 software is not able to identify low-level glycopeptide resistance of enterococcus strains correctly. However, it is possible that the new 4.01 version of the VITEK 2 system would perform better in the tests, since according to the data of Abele-Horn et al., it appears to be a more reliable tool for the detection of glycopeptide-resistant enterococci [1].

References

1. Abele-Horn, M., Hommers, L., Trabold, R., Frosch, M.: Validation of VITEK 2 version 4.01 software for detection, identification, and classification of glycopeptide-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 71 (2006).
2. Böröcz, K., Szilágyi, E., Kurcz, A., Libbisch, B., Glatz, K., Gacs, M.: First vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak reported in Hungary. *Eur. Surveill.* **10**, E010527 (2005).
3. Centers for Disease Control and Prevention. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report. *Am. J. Infect. Control* **29**, 404 (2001).
4. Chang, S., Sievert, D. M., Hageman, J. C., Boulton, M. L., Tenover, F. C., Downes, F. P., Shah, S., Rudrik, J. T., Pupp, G. R., Brown, W. J., Cardo, D., Fridkin, S. K.: Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N. England J. Med.* **348**, 1342 (2003).
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; 19th Informational supplement M100-S15 (2009). CLSI, Wayne, PA, USA.
6. Dombrádi, Zs., Bodnár, F., Orosi, P., Dombrádi, V., Szabó, J.: A case report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization of a femoral wound in central Europe. *Central Eur. J. Med.* **4**, 259 (2009).
7. EARSS Management Team. EARSS annual reports. EARSS Management Team, Bilthoven, The Netherlands 2001–2006.
8. Eisner, A., Gorkiewich, G., Feierl, G., Leitner, E., Köfer, J., Kessler, H. H., Marth, E.: Identification of glycopeptide-resistant enterococci by VITEK 2 system and conventional and real-time polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Inf. Dis.* **53**, 17 (2005).

9. Endtz, H. P., van den Braak, N., van belkum, A., Goessens, W. H., Kreft, D., Stroebe, A. B., Verburgh, H. A.: Comparison of eight methods to detect vancomycin resistance in enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 592 (1998).
10. Garcia-Garrote, F., Cercenado, E., Bouza, E.: Evaluation of a new system, VITEK2, for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2108 (2000).
11. Ghidán, Á., Csiszár, K., Jenei, Cs., Maródi, C. L., Rozgonyi, F.: PCR detection of the *vanA* gene in a vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, 325 (2000).
12. Hayden, M. K.: Insights into the epidemiology and control of infection with vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Infect. Dis.* **31**, 1058 (2000).
13. Knausz, M., Gartner, B., Fömmötör, I., Ghidán, Á., Kamotsay, K., Rozgonyi, F.: Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization during recovery from *Neisseria meningitidis* cerebrospinal meningitis. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **50**, 453 (2003).
14. Kobayashi, I., Muraoka, H., Iyoda, T., Nishida, M., Hasegawa, M., Yamaguchi, K.: Antimicrobial susceptibility testing of vancomycin-resistant enterococcus by the VITEK 2 system, and comparison with two NCCLS reference methods. *J. Med. Microbiol.* **53**, 1229 (2004).
15. Kohner, P. C., Patel, R., Uhl, J. R., Garin, K. M., Hopkins, M. K., Weegen, L. T., Cockrell, F. R.: Comparison of agar dilution, broth microdilution, E-test, disk diffusion, and automated VITEK methods for testing susceptibilities of *Enterococcus* spp., to vancomycin. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 3258 (1997).
16. Pendle, S., Jelfs, P., Olma, T., Su, Y., Gilroy, N., Gilbert, G. L.: Difficulties in detection and identification of *Enterococcus faecium* with low-level inducible resistance to vancomycin, during hospital outbreak. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 853 (2008).
17. Ramotar, K., Woods, W., Larocque, L., Toye, B.: Comparison of phenotypic methods to identify enterococci intrinsically resistant to vancomycin (*vanC* VRE). *Diagn. Microbiol. Inf. Dis.* **36**, 119 (2000).
18. van den Braak, N., Goessens, W., van Belkum, A., Verburgh, H. A., Endtz, H. P.: Accuracy of the VITEK 2 system to detect glycopeptide resistance in enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 351 (2001).

A case report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization of a femoral wound in central europe

Case Report

Zsuzsanna Dombrádi¹, Ferenc Bodnár², Piroska Orosi³, Viktor Dombrádi⁴,
Judit Szabó^{1*}

¹ Department of Medical Microbiology, Medical and Health Centre,
University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary

² Department of Cardiac Surgery, Medical and Health Centre,
University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary

³ Clinical Hygiene Ward, Medical and Health Centre, University of Debrecen,
4032 Debrecen, Hungary

⁴ Cell Biology and Signaling Group of the Hungarian Academy of Sciences,
Department of Medical Chemistry, Research Centre for Molecular Medicine,
University of Debrecen, 4032 Debrecen, Hungary

Received 17 June 2008; Accepted 9 January 2009

Abstract: Wound infection and colonization following cardiac surgery is well known but rarely caused by vancomycin-resistant enterococci (VRE). A case of femoral wound colonization by *vanA* carrying *Enterococcus faecalis* in a patient following mitral prolapse surgery is described in this report.

Keywords: Femoral wound • Colonization • VRE • Cardiac surgery

© Versita Warsaw and Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

1. Case report

A 50-year-old woman with known mitral valve prolapse was admitted to hospital for elective surgery. The patient's additional significant medical history included a gastric ulcer, hypertension, acute myocardial infarction, and cardiac asthma. The surgery lasted for 5 hours; cefuroxime plus tobramycin were administered as antibiotic prophylaxis prior to surgery, according to the local protocols. Postoperatively the patient had to be resuscitated; an intra-aortic balloon pump was required to wean the patient off of the heart-lung machine. After the patient was successfully resuscitated, she was transferred to the intensive care unit, where she remained intubated and ventilated for 29 hours. Eight days after the operation *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* were

isolated from the femoral wound, but antimicrobial treatment was not applied. The patient was afebrile. Her white cell count was $8,4 \times 10^9/\text{liter}$, C reactive protein level was at 78 mg/liter and the sedimentation rate was 84 mm/hr. Two days later, the patient had a leukocyte count of $14.75 \times 10^9/\text{l}$, a CRP of 38.42 mg/l, and a WE of 60 mm/h were measured. The patient was transported to second hospital for closer proximity to her domicile. At that time the femoral wound required binding. Six months later, no wound infection was detected at the control examination.

1.1. Microbiology

The *E. coli* and *P. aeruginosa* in the clinical sample were identified by standard conventional biochemical methods [1]. The femoral wound isolate also contained a Gram-positive, non-spore-forming coccus arranged in chains.

* E-mail: szabjud@dote.hu

Table 1. Antibiotic susceptibility of the vancomycin-resistant *E. faecalis* isolate.

Antibiotic	MIC (μg/ml)	Interpretation ^a
Ampicillin	≤ 2	S
Ampicillin/Sulbactam	≤ 2	S
Imipenem	≤ 1	S
Gentamicin High Level (synergy)	SYN-S	S
Streptomycin High Level (synergy)	SYN-R	R
Ciprofloxacin	≤ 0.5	S
Moxifloxacin	≤ 0.25	S
Erythromycin	0.5	S
Linezolid	2	S
Teicoplanin	≥ 32	R
Vancomycin	≥ 32	R
Tetracycline	≥ 16	R

^a S, susceptible; R, resistant; SYN, synergy expected.

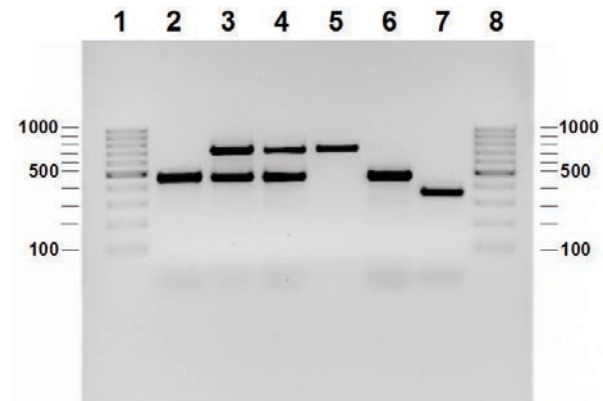
The isolate grew on sheep blood agar as nonhemolytic, gray colonies 1 mm in diameter after 24 h incubation at 37 °C in ambient air. It also grew well on chocolate and bile esculin agar. In addition, the isolate was catalase negative and resistant to optochin and bacitracin. Lancefield serogrouping was performed using Streptex (Murex Biotech Ltd., Dartford, United Kingdom). The isolate was positive for Streptococcus group D antigen by latex agglutination. The strain growing on 6 μg/ml vancomycin agar plate was isolated and investigated in detail. The VITEK2 system (bioMérieux) was used for the identification and the determination of antibiotic susceptibility (Table 1). Antimicrobial susceptibility was also determined by disk diffusion test according to CLSI guidelines [2]. Minimal inhibitory concentrations (MICs) of vancomycin and teicoplanin were both >256 mg/L as determined by an E-test.

The above findings led us to identify the strain as *E. faecalis*, more precisely; a suspected VRE that we intended to confirm by using molecular biological examinations.

1.2. PCR and DNA sequencing

The vancomycin resistance gene was identified by multiplex PCR [3]. The PCR products corresponding to the glycopeptide resistance gene *vanA* (730 bp) and to the wild type D-alanine-D-alanine ligase, *ddl* (470 bp) of *E. faecalis* were detected by agarose gel electrophoresis (Figure 1). *E. faecalis* ATCC 29212 (wild type, negative control strain), and *vanA* containing *E. faecalis* (positive control strain) were used in the control experiments. The molecular identification of the species and the resistance gene was confirmed using PCR primers specific for the *E. faecalis ddl* (470 bp) and *sodA* (360 bp) genes, as well as for the *vanA* gene

Figure 1. PCR analysis of the vancomycin-resistant *E. faecalis* isolate. The DNA purified from the isolate (lane 4), the negative control *E. faecalis* ATCC 29212 (lane 2), and the positive control *E. faecalis* strain (lane 3) were tested by multiplex PCR. Then specific PCR was carried out to detect the *vanA* (lane 5), *ddl* (lane 6), and *sodA* (lane 7) genes from the isolate. Lanes 1 and 8 contain a 100-bp DNA ladder (Invitrogen). The size of the markers is given in bp.



[3,4]. In addition, the 732-bp *vanA* PCR product was purified by the Microcon Ultracell YM-100 kit (Amicon) and was sequenced by the chain termination method (Gödöllő, Hungary). The sequence of 647 nucleotides, that was determined on both strands, turned out to be identical to the corresponding segment of the *vanA* gene in the pLW043, pVEF1, and pVEF2 plasmids (accession numbers: NC_005054, NC_008768, and NC_008821). pVEF plasmids are more frequently found in *E. faecium*, however the species was identified by several independent methods as *E. faecalis*.

2. Discussion

Over the last two decades, *Enterococcus* spp. have emerged as important nosocomial pathogens that usually cause infections in severely debilitated patients hospitalized for long periods of time [5]. Enterococcal infections have recently amounted to approx. 10% for all nosocomial infections [5]. The colonizing infection can be of endogenous origin arising from the patient's normal flora, or it may have arisen exogenously from environmental contamination, including from the hands of medical staff [6]. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) have been isolated since the late 1980s in Europe [7] and in the United States [8]. In Hungary, the first *vanA* containing *Enterococcus faecalis* strain was isolated in 2000 from a toe ulcer of a 64 year old diabetic male patient [9]. Since then one case report and one outbreak have been published [10,11]. Fortunately, the frequency of VRE infections is very low in Hungary. Country-wide statistical data are not available. The disc diffusion

method is not suitable to determine the glycopeptid resistance, therefore, we have been screening each enterococcus strain on vancomycin containing screening plate since 2004. Up to now, we tested more than 3,900 strains and only this single strain proved to be highly glycopeptid-resistant.

Enterococci, most often *E. faecalis*, cause 5 to 20% of wound colonization and infection [12,13]. However, the rate of VRE of cardiac surgical wound colonization and infection is unknown. This is the first report of isolation of *vanA* carrying *E. faecalis* in a teaching hospital of Debrecen, and this is the first demonstration of *vanA* carrying *E. faecalis* in Hungary confirmed by sequence analysis. Surprisingly, this patient never received vancomycin. It is also possible that the vancomycin resistance emerged in the medical staff members and was nosocomially transmitted to the patient. However, the environmental, staff and patient screening were negative for VRE. Although, the patient had never received vancomycin therapy, she may have been more susceptible to environmental pathogen bacteria due to multiplied severe concomitant diseases.

References

Indeed the patient was also found to be colonized with *P. aeruginosa* and *E. coli* in addition to VRE. Fortunately, no life threatening wound infection has developed.

In Western Europe and North America, VRE is not an uncommon contaminant or cause of sepsis, whereas it is still uncommon in Central Europe. Although the current frequency of VRE is less than 1% in Hungary, extensive use of vancomycin may result in the increasing (hetero-vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*) strains (unpublished observations) indicating that these organisms have the potential to become endemic in Hungary. To avoid this situation, local and national therapeutic protocols should be updated in terms of prudent use of vancomycin and other preventive measurements may also be necessary.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. Ákos Tóth from the National Center for Epidemiology, Budapest, Hungary for providing the *vanA* containing *E. faecalis* positive control strain.

- [1] Murray P.R., Baron E.J., Tenover F.C., Tenover F.C., Yolkow R.H. (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1999
- [2] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th informational supplement, 25: M100-S12. CLSI, Wayne, Pa., 2005
- [3] Depardieu F., Perichon B., Courvalin P., Detection of the van alphabet and identification of Enterococci and Staphylococci at the species level by multiplex PCR, J. Clin. Microbiol., 2004, 42, 5857-60
- [4] Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B., Use of a genus and species specific multiplex PCR for identification of enterococci, J. Clin. Microbiol., 2004, 42, 3558-65
- [5] Cetinkaya Y., Falk P., Mayhall C.G., Vancomycin-resistant enterococci, Clin. Microbiol. Rev., 2000, 13, 686-707
- [6] Edmond M.B., Enterococcal species, In: Wenzel R., Edmond M.B., Pittet D., Devaster J.M., Brewer T., Geddes A., et al, editors. A guide to infection control in the hospital. B. C. Decker inc. Hamilton, London, 1998, pp.132-5
- [7] Uttley A.H., Collins C.H., Naidoo J., George R.C., Vancomycin-resistant enterococci, Lancet, 1988, 1, 57-8.
- [8] Sahm D.F., Kissing J., Gilmore M.S., Murray P.R., Mulder R., Solliday J., et al., In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant Enterococcus faecalis, Antimicrob. Agents Chemother., 1999, 33, 1588-91
- [9] Ghidán Á., Csizsár K., Jemei Cs., Maródi C.L., Rozgonyi F., PCR detection of the vanA gene in a vancomycin-resistant Enterococcus faecalis, J. Antimicrob. Chemother., 2000, 46, 325-6
- [10] Knausz M., Gartner B., Fömötör I., Ghidán Á., Kamotsay K., Rozgonyi F., Vancomycin-resistant Enterococcus faecalis colonization during recovery from Neisseria meningitidis cerebrospinal meningitis, Acta Microbiol. Immunol. Hung., 2003, 50, 453-7
- [11] Böröcz K., Szilágyi E., Kurcz A., Libbisch B., Glatz K., Gacs M., First vancomycin-resistant Enterococcus faecium outbreak reported in Hungary, Eur. Surveill., 2005, 10, E010527.1
- [12] Surucuoglu S., Gazi H., Kurutepe S., Ozkutuk N., Ozbakkaloglu B., Bacteriology of surgical wound infections in a tertiary care hospital in Turkey, East Afr. Med. J., 2005, 82, 331-6
- [13] Zmudzinska M., Czarnańska-Operacz M., Silny W., Bacterial flora of leg ulcers in patients admitted to Department of Dermatology, Poznan University of Medical Sciences, during the 1998-2002 period, Acta Dermatovenerol. Croat., 2005, 13, 168-72

Phenotypic and genetic characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from the university hospitals of Debrecen

J. Szabó · Z. Dombrádi · O. Dobay · P. Orosi ·
J. Kónya · K. Nagy · F. Rozgonyi

Received: 19 March 2008 / Accepted: 16 June 2008 / Published online: 2 October 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract The purpose of this study was to characterise methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated in 2005 at the university hospitals of Debrecen, Hungary. Three hundred and thirty-nine MRSA strains were isolated from 102 patients at 18 different clinics. Their sensitivity to oxacillin and ten other antibiotics was determined. For genotypic analysis, phage typing and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed. The rate of MRSA strains increased to 7.2% in 2005, especially at the clinics of surgery, pulmonology and paediatrics. No vancomycin- or teicoplanin-resistant strains were found. The resistance to erythromycin, clindamycin and ciprofloxacin was nearly 100% and multi-resistance was very frequent. Fifty-eight percent of the isolates belonged to mixed phage types and 8% was non-typable.

One PFGE clone contained 58.2% of all strains and two further major clones were found at a separately located clinical block, indicating intra-hospital spread. We can conclude that MRSA exhibits an increasing nosocomial problem also in Hungary.

Introduction

The emergence and spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in Hungarian hospitals is of concern [1]. MRSA was initially associated with large teaching hospitals, but has also now been found in nursing homes and in the community. MRSA strains are often resistant to a wide range of antimicrobial agents, tetracyclines, macrolides, lincosamides, aminoglycosides and fluoroquinolones [2]. The spread of the strains, referred to as epidemic MRSA (EMRSA), is of particular concern because of the difficulty in eradicating them once they are established in a hospital unit. Moreover, their presence means a reduction in the therapeutic options and a higher cost of treating infections [3, 4].

To control the spread of MRSA strains, it is often necessary to type them in order to understand their epidemiology and ascertain whether the spread is due to a single or multiple clones [5, 6]. Several molecular epidemiological techniques have been used to type MRSA isolates. These include staphylococcal cassette chromosome *mec* (SSC*mec*) typing [7], pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) [8] and multi-locus sequence typing (MLST) [9]. Of these, PFGE is the most frequently used.

The aim of this study was to determine the antibiotics resistance patterns, phage type and the genetic relatedness of the MRSA strains isolated from patients admitted to the university hospitals of Debrecen, Hungary.

Szuzsa Dombrádi contributed equally to the first authorship.

J. Szabó (✉) · Z. Dombrádi · J. Kónya
Department of Medical Microbiology, Medical and Health Centre,
University of Debrecen,
P. O. B. 17, 4012 Debrecen, Hungary
e-mail: szabjud@dote.hu

O. Dobay · K. Nagy · F. Rozgonyi
Institute of Medical Microbiology, Semmelweis University,
Budapest, Hungary

P. Orosi
Division of Hospital Hygiene, Medical and Health Centre,
University of Debrecen,
Debrecen, Hungary

F. Rozgonyi
Microbiology Laboratory, Department of Dermatology,
Venerology and Dermatoooncology, Semmelweis University,
Budapest, Hungary

Materials and methods

Bacterial strains

The isolates were identified by routine laboratory procedures. Gram-positive, catalase-positive cocci were tested for mannitol fermentation on salt mannitol agar plates. Clumping factor was detected by using the Staphaurex kit (Remel, Santa Fe, KS) and microorganisms were confirmed to be *S. aureus* by the tube coagulase test [10].

Antibiotics susceptibility testing

Susceptibility to oxacillin, ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, tobramycin, erythromycin, clindamycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline, vancomycin and teicoplanin was performed by the disk diffusion method with Oxoid disks (Hampshire, UK) according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards/Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS/CLSI) guidelines [11, 12]. The degree of methicillin resistance was determined using oxacillin E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden). Interpretation of the minimum inhibitory concentration (MIC) values was also carried out according to the NCCLS/CLSI guidelines [11, 12]. MRSA isolates were stored at -80°C in 15% glycerol. They were subcultured in brain heart infusion (BHI) broth and on BHI agar (Oxoid, Hampshire, UK), when required.

When preparing the statistics, we have taken into account the results of the first isolate only from each patient.

Phenotypic resistance patterns

Resistance phenotypes of the strains were defined by a number (representing the number of antibiotics to which the strain was resistant) with a letter subscript (indicating the particular combination of antibiotics to which the isolate was resistant) on the basis of resistance to oxacillin, clindamycin, erythromycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, tetracycline, amikacin, gentamicin, tobramycin and ciprofloxacin. Isolates showing an intermediate zone of susceptibility were classified as resistant. Multidrug-resistance was defined as resistance to oxacillin and at least to two antibiotics classes other than β -lactams.

Bacteriophage typing

Bacteriophage typing of 272 selected strains isolated in six subsequent years was performed by the Microbiology Laboratory of the National Public Health and Medical Officer Service, Szeged, Hungary, with an international set of *S. aureus* typing phages [13].

Pulsed-field gel electrophoresis

PFGE was performed on 84 MRSA strains isolated in 2005 [14]. For the release of chromosomal DNA, a loopful of bacteria from blood agar plates were first washed in 1 ml PBS and then resuspended in 300 μl of EC lysis buffer (1 M NaCl, 100 mM EDTA, 6 mM TRIS, 0.5% Brij58, 0.2% deoxycholate and 0.5% N-lauroyl sarcosine, pH=7.6) containing 20 μl lysostaphin of the 1-mg/L stock (freshly added). This bacterial suspension was mixed with an equal volume of 2% chromosomal-grade low-melting agarose (Bio-Rad, Hercules, CA) prepared in EC lysis buffer and dispensed into plug moulds. After solidification, the plugs were first incubated at 37°C for 1 h in 3 ml of EC lysis buffer, and then at 55°C for 3 h in 3 ml of ESTN buffer (0.5M EDTA, 1% N-lauroyl sarcosine, 10 mM TRIS and 20 mM NaCl, pH=8.0), freshly supplemented with 20 μl proteinase K of the 20-mg/L stock. The plugs were then washed first in 3 ml TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=8.0) containing 7 μl PMSF at 50°C for 30 min and then three times in TE buffer at room temperature.

One third of each plug was digested with 30 U of *Sma*I restriction enzyme in buffer SA for 2 h at 25°C . The fragments were separated in 1% pulsed-field certified agarose gel (Bio-Rad) prepared in $0.5\times\text{TBE}$ (45 mM Tris, 2 mM EDTA, 45 mM boric acid), in a CHEF-DR[®] II apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA) at 14°C , 6 V/cm, for 10 h with pulse times of 5 s to 15 s, and for 11.5 h with pulse times of 15 s to 60 s. The NO34OS λ ladder PFG marker (New England Biolabs Ltd., Hitchin, Hertfordshire, UK) was used as the molecular weight control.

The PFGE profiles were analysed with the Bionumerics program version 2.5 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium). A PFGE genotype was defined as isolates that showed at least 90% similarity in the dendrogram created by the UPGMA/Dice coefficients, with a band position tolerance of 1.0%. All reagents and enzymes, if not otherwise stated, were purchased from Sigma-Aldrich Company Ltd., Poole, Dorset, UK.

Results

Incidence of MRSA strains

Until 2003, MRSA strains occurred sporadically at the university hospitals of Debrecen, and their prevalence varied between 2.3–3.2%. In 2004, the incidence of MRSA strains increased to nearly 4% and, despite the activity of the nosocomial surveillance system, exceeded 7% in 2005 (Table 1). In the period from January to December 2005, a total of 339 strains were isolated from 102 patients treated at 18 different clinics. When preparing the statistics, and

Table 1 Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains between 2000–2005 in the university hospitals of Debrecen

Year	Number of <i>S. aureus</i> isolates	MRSA ^a	
		<i>n</i>	%
2000	1,102	25	2.27
2001	1,257	28	2.23
2002	1,247	41	3.28
2003	1,106	26	2.35
2004	1,269	50	3.94
2005	1,411	102	7.23

^a Determined with a 1-μg oxacillin disc

performing the subsequent examinations, we have taken into account only the data of the first isolate from each patient. As seen in Table 2, the rate of MRSA strains was very high at the clinics of surgery, pulmonology and paediatrics. Strict implementation of the MRSA infection control protocol was used to control MRSA spread in the high-risk departments.

The specimen distribution of 102 MRSA strains was as follows: bronchial exudate 23.5%, wound 17.6%, nasal discharge 13.7%, canule 9.8%, pharyngeal exudate 9.8% and, also, the number of blood cultures and abscesses were as much as 7.8%, respectively.

Antibiotics resistance pattern

All isolates were resistant to β-lactams, and 97 of them required an oxacillin MIC of 256 mg/L. All 102 strains were susceptible to vancomycin and teicoplanin. Resistance to erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin and trimethoprim/sulfamethoxazole was found in 99, 99, 97 and 69% of the isolates, respectively; 61% and 51% of the isolates were resistant to amikacin and tetracycline, respectively.

Phage types

The laboratory has had phage typing results available to it from 2002 onwards. The proportion of non-typable strains decreased over the years, while that of mixed strains increased, and phage-group V was gradually overtaken by group III. In 2005, more than half of the isolates (57.85%) was mixed, 34.31% of them was of group III and 7.85% was non-typable (Table 3). Almost half of the strains belonged to phage type 617/622/623, while nearly 20% was typable by phage 629 only.

Clonal relations

The genetic relationship among MRSA strains was determined by PFGE. Out of the 84 MRSA isolates examined,

Table 2 Distribution of the 102 MRSA strains isolated in the year 2005, according to departments

Department	Number of MRSA strains	% of MRSA strains
Surgery II	21	20.59
Surgery I	14	13.73
Pulmonology	12	11.76
Paediatrics	11	10.78
Internal Medicine III	9	8.82
Internal Medicine I	8	7.84
Cardiac Surgery	6	5.88
Neurology	4	3.92
Dermatology	4	3.92
Orthopaedic Surgery	3	2.94
Internal Medicine II	2	1.96
Obstetrics and Gynaecology	2	1.96
Urology	2	1.96
Neurosurgery	1	0.98
Otolaryngology	1	0.98
Cardiology	1	0.98
Ophthalmology	1	0.98
Total	102	100

79 belonged to three main different PFGE types (A, B and C) and the others were unrelated. The dendograms of these PFGE types are shown in Figs. 1, 2 and 3. Isolates belonging to the same cluster (>90% similarity on the dendrogram) also fulfilled the criteria of Tenover et al. [8]. The PFGE types were selected for further analysis. The predominant PFGE type A included 46 strains. These strains were all sensitive to glycopeptides, but all of them were resistant to erythromycin, clindamycin and ciprofloxacin. Most frequently, they were sensitive to amikacin, trimethoprim/sulphamethoxazole and tetracycline. The vast majority of these isolates characteristically belonged to the mixed phage group. The dominant phage types were 617, 622 and 623 of the mixed group. The origin of the strains according to the clinics was very variable.

Table 3 Distribution of 102 MRSA strains isolated in the year 2005, according to the phage groups and types

Phage group	Phage type	Number of strains	%
III	629	20	19.61
III	623	4	3.92
III	623,629	11	10.78
Mixed	617, 622, 623	49	48.04
Mixed	622, 623	7	6.86
Mixed	616, 618, 622	2	1.96
Mixed	622, 623	1	0.98
Non-typable	–	8	7.85
Total		102	100

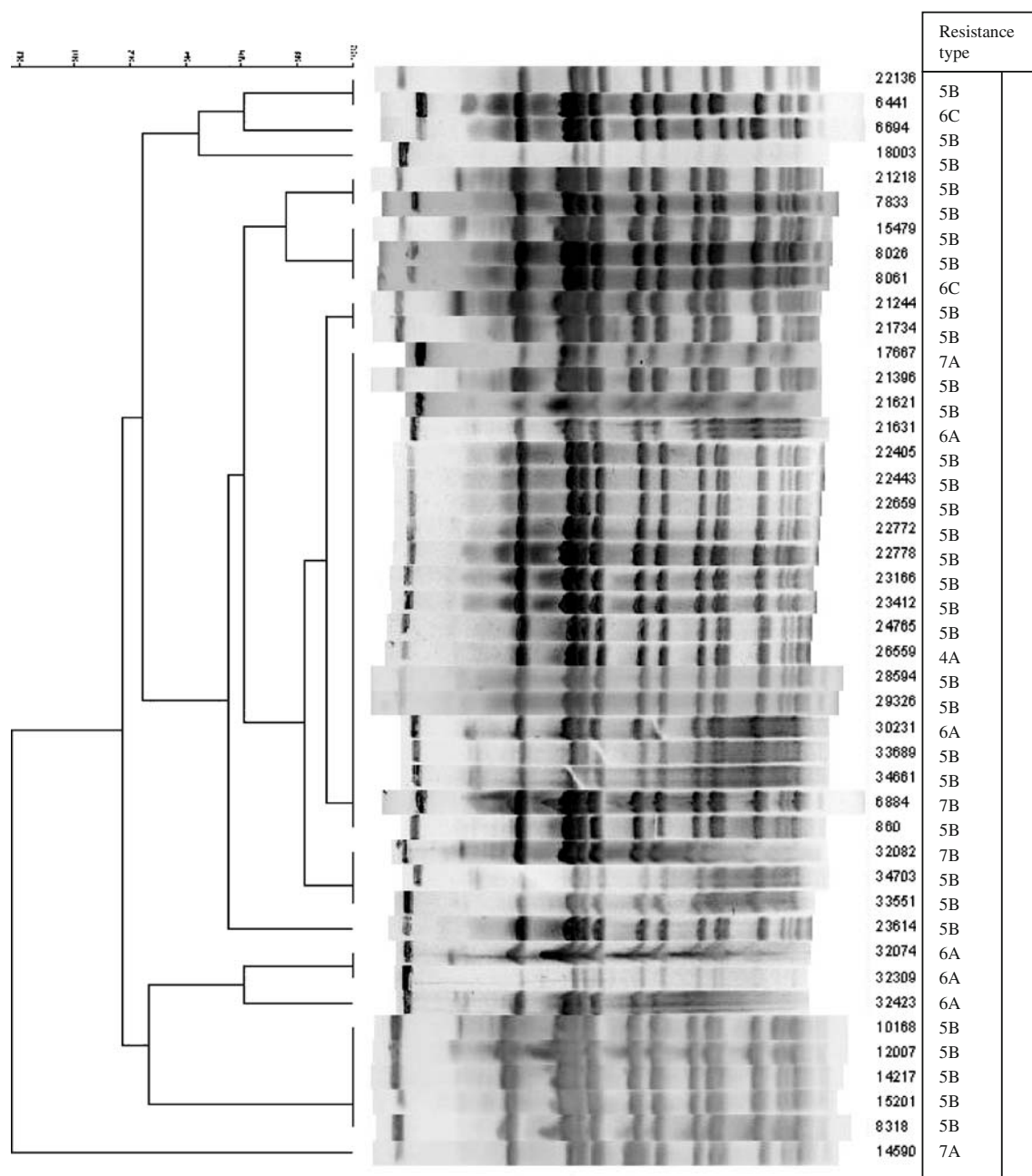


Fig. 1 Dendrogram of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) type A isolates

The PFGE type B isolates ($n=13$) also had unique antibiotics resistance profiles; while most of them were sensitive to trimethoprim/sulphamethoxazole and tetracycline, all but one were also resistant to amikacin (Table 4). Of the strains, 72.7% belonged to phage group III. The dominant phage type was 629.

The majority of the PFGE type C isolates ($n=20$) belonged to phage group III. They were variable in their resistance pattern, but, generally, these isolates showed the highest proportion of multiresistance, characterised by an erythromycin-clindamycin-ciprofloxacin-amikacin-gentamicin-tobramycin (6B) resistance pattern (Table 4). Two of

them were panresistant, except vancomycin and teicoplanin (both of phage group III, resistance pattern 8A).

Remarkably, more than half of the PFGE type B and C isolates were derived from the departments of Surgery II, Internal Medicine III, Pulmonology and Cardiac Surgery. They are located in the same building with close connection, separated from the other clinics.

Performing the analysis based on the phage types, a conspicuous observation was that all but one of the paediatric strains belonged to phage group III, with the predominance of phage type 623, while the other major source of these isolates was the above-mentioned separated

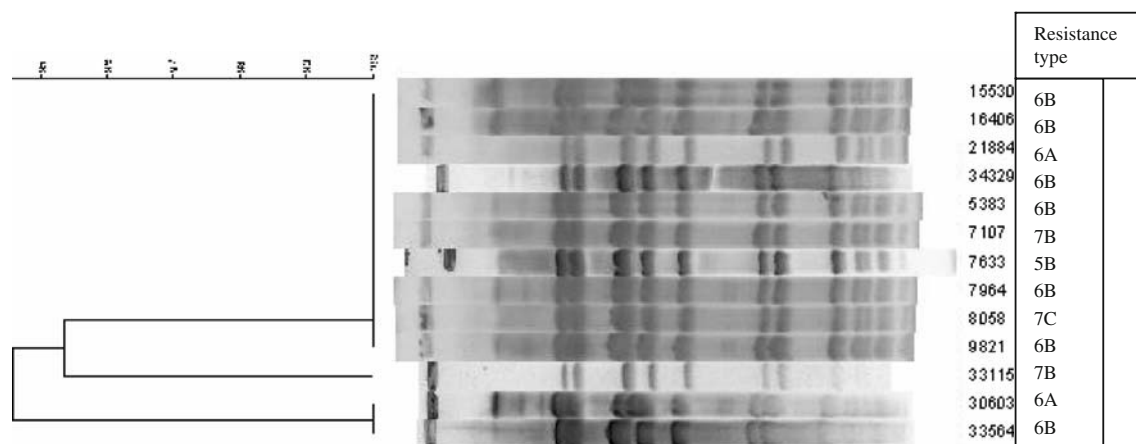


Fig. 2 Dendrogram of PFGE type B isolates

clinical block. The majority of these strains were of PFGE type C, and they had variable resistance patterns. Among the isolates of the mixed phage group, the most prevalent was PFGE type A, with the characteristic erythromycin-clindamycin-ciprofloxacin-gentamicin-tobramycin (5B) resistance pattern (Table 4). The non-typable group was very variable by all means.

Discussion

An international multicentre study [15] reported low rates of MRSA in the hospitals of Northern Europe (<1%), increasing proportions in Middle European countries, USA,

New Zealand and Australia (6–22%), and very high rates in Southern European countries and in parts of the USA, Asia and South Africa (28–63%). Intensive care units (ICUs) contained the highest proportions of MRSA. Strains from the lower respiratory tract showed the highest multiple resistance, while blood isolates the lowest. Another European study by the European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants (EARSSP) on 50,759 strains from 496 hospitals in 26 countries showed the MRSA incidence to vary 100-fold, from <1% in Northern Europe to >40% in Southern and Western Europe [16]. In the hospitals of the Semmelweis University, Budapest, having a pavilion style building system, the frequency of MRSA was, on average, 25.6% between 1997 and 2000

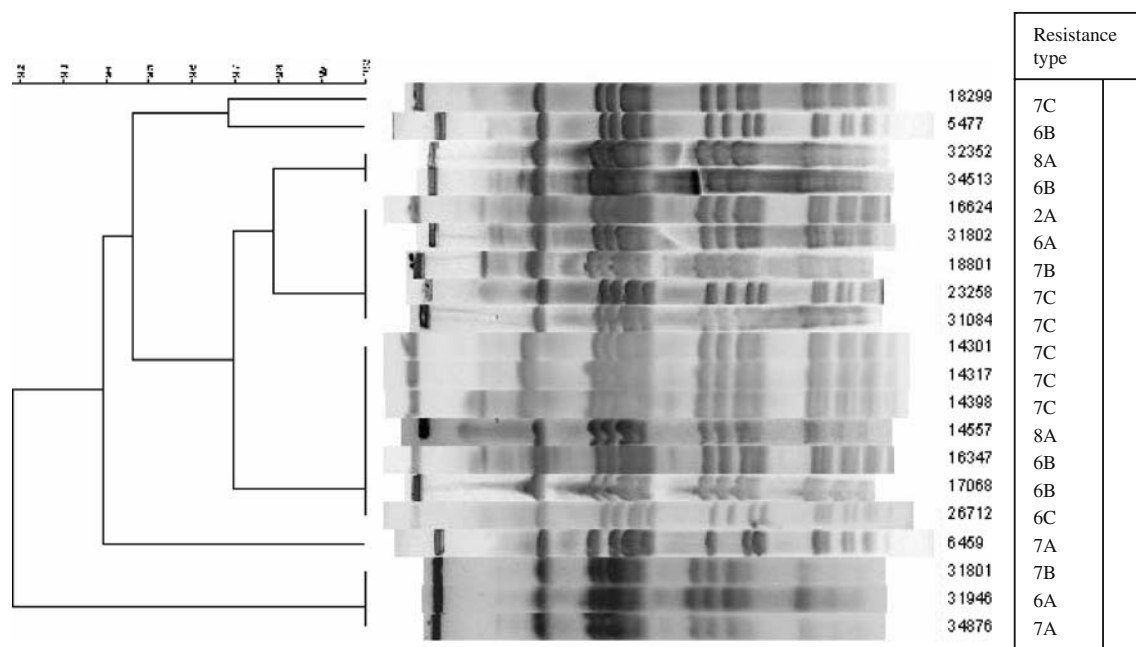


Fig. 3 Dendrogram of PFGE type C isolates

Table 4 Genetic distribution of 79 MRSA strains according to the antibiotics resistance patterns

PFGE type	Resistance pattern ^a	Code	<i>n</i>	%
C	GEN, TOB	2A	1	1.3
A	ERY, CLIN, GEN, TOB	4A	1	1.3
A	ERY, CLIN, AMI, GEN, TOB	5A	1	1.3
A	ERY, CLIN, CIP, GEN, TOB	5B	33	41.8
B	ERY, CLIN, CIP, GEN, TOB	5B	1	1.3
A	ERY, CLIN, CIP, TET, GEN, TOB	6A	5	6.3
B	ERY, CLIN, CIP, TET, GEN, TOB	6A	2	2.5
C	ERY, CLIN, CIP, TET, GEN, TOB	6A	2	2.5
B	ERY, CLIN, CIP, AMI, GEN, TOB	6B	7	8.9
C	ERY, CLIN, CIP, AMI, GEN, TOB	6B	4	5.1
A	ERY, CLIN, CIP, SXT, GEN, TOB	6C	2	2.5
C	ERY, CLIN, CIP, SXT, GEN, TOB	6C	1	1.3
A	ERY, CLIN, TET, SXT, CIP, GEN, TOB	7A	2	2.5
C	ERY, CLIN, TET, SXT, CIP, GEN, TOB	7A	2	2.5
A	ERY, CLIN, TET, CIP, AMI, GEN, TOB	7B	2	2.5
B	ERY, CLIN, TET, CIP, AMI, GEN, TOB	7B	2	2.5
C	ERY, CLIN, TET, CIP, AMI, GEN, TOB	7B	2	2.5
B	ERY, CLIN, SXT, CIP, AMI, GEN, TOB	7C	1	1.3
C	ERY, CLIN, SXT, CIP, AMI, GEN, TOB	7C	6	7.6
C	ERY, CLIN, SXT, TET, CIP, AMI, GEN, TOB	8A	2	2.5
Total			79	100

^a ERY=erythromycin; CLIN=clindamycin; GEN=gentamicin; TOB=tobramycin; CIP=ciprofloxacin; AMI=amikacin; TET=tetracycline; SXT=trimethoprim/sulphamethoxazole

[17]. In the university-affiliated hospitals in Chicago, IL, the annual rate of methicillin resistance increased from 13% in 1986 to 28% in 2000, and has not yet plateaued [18].

According to the nationwide yearly resistance data collection, and the EARSSP data, it was estimated that MRSA strains accounted for approximately 20% of hospital-acquired *S. aureus* isolates in Hungary in 2002 [16]. The prevalence of methicillin (oxacillin) resistance was 16.8% in inpatients generally, but only 4.1% in outpatients. However, the MRSA ratio was higher in both invasive infections and at the ICUs (20.2% and 26.5%, respectively).

In our present study, the incidence of MRSA in the Debrecen hospitals reached 7.23%, which is slightly lower than that observed in other parts of Hungary [19] or that reported recently by the National Center for Epidemiology of Hungary (OEK) [1]. Moreover, this MRSA frequency has been proved to be much lower than that in Macedonia (31.5%) [20] or in Romania (49.9%) [21].

Although our MRSA strains were distributed to eight phage types, the predominant phage type was 617/622/623, involving nearly 50% of the isolates. The other epidemic phage type was type 629, involving nearly 20%. Interestingly, the majority of the MRSA strains possessed receptors for phage types 622 and 623, proving the phage typing to have some limitations for a precise epidemiological discrimination in this cluster of strains.

Our strains were distributed to 20 antibiotics resistance patterns. However, 41.8% of them belonged to pattern 5B, characterised phenotypically by erythromycin-clindamycin-ciprofloxacin-gentamicin-tobramycin resistance, indicating the well known phenomenon that MRSA strains are multi-drug resistant on one hand, and that antibiotics resistance patterns also have considerable limitations in the examination of epidemiological relationships on the other hand.

Considering the results of the PFGE analysis, the genotypic diversity of the strains was much less than the phenotypic diversity. Only three main PFGE types played a considerable role in this MRSA epidemic and the predominant genotype was PFGE type A (55%). This prevalence differs significantly from the 12% of Czech [22], 29% of Greek [23] and 18% of Danish [24] MRSA strains, indicating that different genotypes may be locally dominant in different areas of Europe. The PFGE results also show that phenotypically seemingly unrelated strains may have a very close clonal relation.

Thus, we can conclude that MRSA strains showing the same phage type or antibiotics resistance pattern may indicate close clonal relatedness; however, differences in these properties do not exclude the same clonality.

It is clear that ICUs play a significant role in transferring MRSA isolates to other wards [20]. It is more difficult to control the spread of MRSA in ICUs because patients are frequently subjected to invasive procedures and cohort

nursing is not always possible [25]. All of our departments having high MRSA incidence possess an ICU; moreover, the paediatrics department has a haematology malignancy profile.

Strict microbiological monitoring and epidemiological investigation are essential for controlling MRSA in hospitals [4]. The antibiotics resistance pattern provides useful information for routine surveillance [6], but in outbreaks suspected of being caused by MRSA, additional typing should be performed. Phage typing has frequently been used to type *S. aureus* strains; however, there are many non-typable or mixed isolates and, according to our observations, the ratio of these is gradually but definitely increasing. PFGE analysis has proven to be valuable for determining the epidemiology of non-phage-typable or mixed MRSA isolates, because an apparent outbreak may, in fact, be due to different strains. Therefore, the use of this genotyping method becomes more and more important.

In Debrecen, similarly to the worldwide experiences, we could observe an increasing prevalence of MRSA among nosocomial infections. Most cases were derived from the ICUs of the surgery, pulmonology and paediatrics departments, in accordance with the origin of specimen types (mostly bronchial and wound exudates). Unfortunately, the number of haemoculture and abscess specimens was also relatively high. The MRSA isolates were resistant to all β -lactams, but fully sensitive to vancomycin and teicoplanin. The resistance to macrolides and ciprofloxacin was also almost 100%. Following the confirmation of MRSA strains by phenotypic characteristics, all wards were visited by members of the infection control team. Patient isolation, strict hand disinfection, the use of barrier precautions and nasal treatment of MRSA carriers with mupirocin ointment and chlorhexidine baths probably could have prevented the further spread of MRSA. However, unfortunately, the isolation of patients is not possible in all clinics, and, moreover, the frequency of hand washing is not always satisfactory. Therefore, the infection control policies were repeatedly explained and reinforced.

In this study, we observed the emergence and spread of at least three major PFGE types of MRSA to several departments of the University of Debrecen. The predominant genotype circulating in our hospital was genotype A. There was a relatively strong correlation between the PFGE types and the phage types or the antibiotics resistance patterns of the same strains, e.g. almost all paediatric isolates had mixed phage type and belonged to PFGE type C. The isolates belonging to the PFGE types B and C were definitely more resistant and were derived mostly from four clinics that are located in the same building, separately from the other departments, which had lower incidence. This observation further supports the hypothesis that the spread of MRSA strains is strongly related to the close proximity

of patients within a hospital, enabling certain clones to spread instead of the independent emergence of several different clones.

Acknowledgement We would like to thank Mrs. Erzsébet Papp Falusi and Zsolt Hartman for their skilful assistance. We are especially grateful to Dr. Judit Horváth for performing the phage typing.

This work was presented in part at the Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology, Keszthely, Hungary, October 2006.

This work was supported by the Hungarian Ministry of Health, Social and Family Affairs, grant no. 221/2003, and by the National Scientific Research Fund (OTKA), grant nos. M36764, T46186 and F61665.

References

1. Antibiotic resistance. Based on the data reported in the frame of the national surveillance system in 2006. National Center for Epidemiology of Hungary (OEK). Available online at: <http://www.oek.hu/oek.web?nid=666&pid=1>
2. Jeljaszewicz J, Mlynarczyk G, Mlynarczyk A (2000) Antibiotic resistance in Gram-positive cocci. *Int J Antimicrob Agents* 16:473–478
3. Ayliffe GAJ (1997) The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 24: S74–S79
4. Boyce JM (1992) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and long-term care facilities: microbiology, epidemiology, and preventive measures. *Infect Control Hosp Epidemiol* 13:725–732
5. MacKinnon MM, Allen KD (2000) Long-term MRSA carriage in hospital patients. *J Hosp Infect* 46:216–221
6. Farrington M, Redpath C, Trundle C, Coomber S, Brown NM (1998) Winning the battle but losing the war: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection at a teaching hospital. *QJM* 91:539–548
7. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, Hiramatsu K (2002) Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1147–1152
8. 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
9. Enright MC, Day NPJ, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG (2000) Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 38:1008–1015
10. Brown DFJ, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, Wren MWD (2005) Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother* 56:1000–1018
11. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2005) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement M100-S15. CLSI, Wayne, PA
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2002) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 12th informational supplement M100-S12. NCCLS, Wayne, PA

13. Blair JE, Williams REO (1961) Phage typing of staphylococci. Bull World Health Org 24:771–784
14. Stephen M, Kaufmann ME, Deplano A, de Ryck R, Struelens M, Zinn CE, Fussing V, Salmenlinna S, Vuopio-Varkila J, El Solh N, Cuny C, Witte W, Tassios PT, Legakis N, van Leeuwen W, van Belkum A, Vindel A, Laconcha I, Garaizar J, Haeggman S, Olsson-Liljequist B, Ransjo U, Coombes G, Cookson B (2003) Harmonization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for epidemiological typing of strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a single approach developed by consensus in 10 European laboratories and its application for tracing the spread of related strains. J Clin Microbiol 41:1574–1585
15. Zinn CS, Westh H, Rosdahl VT; Sarisa Study Group (2004) An international multicenter study of antimicrobial resistance and typing of hospital *Staphylococcus aureus* isolates from 21 laboratories in 19 countries or states. Microb Drug Resist 10:160–168
16. Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, Monen J, Witte W, Grundman H; European Antimicrobial Resistance Surveillance System Participants (2004) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. Emerg Infect Dis 10:1627–1634
17. Rozgonyi F, Ostorházi E, Maródi LC, Ghidán Á (2001) Resistance to beta-lactams and glycopeptides in staphylococci and streptococci. Acta Microbiol Immunol Hung 48:359–391
18. Seal JB, Moreira B, Bethel CD, Daum RS (2003) Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* at the University of Chicago Hospitals: a 15-year longitudinal assessment in a large university-based hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 24:403–406
19. Kristóf K, Szabó Zs, Cser V, Kardo S, Ghidán Á, Rozgonyi F (2005) Phenotypical differences in antibiotic resistance between MRSA and MSSA strains isolated from clinical samples of patients treated at the clinics of the Semmelweis University. Clin Microb Infect 11(Suppl 2):305
20. Cekovska Z, Panovski N, Petrovska M, Kristóf K, Rozgonyi F (2005) Incidence of *Staphylococcus aureus* isolated from patients treated at the Clinical Center of Skopje, Macedonia, with special attention to MRSA. Acta Microbiol Immunol Hung 52:373–384
21. Székely E, Lőrinczi L, Bilca D, Fodor E, Sóki J, Sabau M (2008) Incidence, antibiotic resistance and clonal relations of MRSA strains isolated from a Romanian university hospital. Acta Microbiol Immunol Hung 55:1–13
22. Melter O, Aires de Sousa M, Urbásková P, Jakubů V, Zemlicková H, de Lencastre H (2003) Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. J Clin Microbiol 41:4998–5005
23. Aires de Sousa M, Bartzavali C, Spiliopoulou I, Sanches IS, Crisóstomo MI, de Lencastre H (2003) Two international methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones endemic in a university hospital in Patras, Greece. J Clin Microbiol 41:2027–2032
24. Faria NA, Oliveira DC, Westh H, Monnet DL, Larsen AR, Skov R, de Lencastre H (2005) Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. J Clin Microbiol 43:1836–1842
25. Harrington G, Watson K, Bailey M, Land G, Borrell S, Houston L, Kehoe R, Bass P, Cockcroft E, Marshall C, Mijch A, Spelman D (2007) Reduction in hospitalwide incidence of infection or colonization with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with use of antimicrobial hand-hygiene gel and statistical process control charts. Infect Control Hosp Epidemiol 28:837–844