

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Antibiotikum rezisztens Gram-pozitív coccusok epidemiológiai jellemzése

Dombrádi Zsuzsanna Rita

Témavezető: Dr. Szabó Judit



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2011

Antibiotikum rezisztens

Gram-pozitív coccusok epidemiológiai jellemzése

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományok tudományágban

Írta:

Dombrádi Zsuzsanna Rita
okleveles molekuláris biológus/mikrobiológus

Készült a
Debreceni Egyetem
Gyógyszerészeti Tudományok
doktori iskolája
Mikrobiológia és Farmakológia
programja keretében

Témavezető: Dr. Szabó Judit

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Pásti Gabriella, Ph.D.
Dr. Aradi János, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja:

2011.09.30. 11:00

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Emődy Levente, az MTA doktora
Dr. Bácsi Attila, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tósaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Dr. Pásti Gabriella, Ph.D.
Dr. Aradi János, Ph.D.
Prof. Dr. Emődy Levente, az MTA doktora
Dr. Bácsi Attila, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja:

2011.09.30. 13:00

I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. 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. 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. Úgy tűnik, hogy az elkövetkező időkben a most rendelkezésünkre álló antibiotikum spektrumot kell hatékonyabban és célszerűbben felhasználni. Ismert, hogy a rezisztencia kialakulásának egyik oka, hogy egyes betegek hosszantartó kezelésére széles spektrumú antibiotikumokat használnak, melyeket empirikus úton választanak meg. Gyakori, hogy felső légúti virális infekciókban fölösleges antibiotikum kezelésre kerül sor. Az antibiotikumok kiterjedt használata az elmúlt 50 évben olyan szelekciós nyomást eredményezett, amely a bakteriális rezisztencia megjelenéséhez illetve a rezisztencia gének szétszóródásához vezetett. 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. A különböző hatóanyagok szinergizmusán alapuló kombinált terápiák már nem hozhatnak megnyugtató megoldást, ugyanis a multirezisztens baktériumok mára igen elterjedtek nemcsak a kórházakban, mint nozokómiális kórokozók, hanem már a közösségben szerzett fertőzések nagy részét is ezek okozzák. Szerencsére jelenleg még a legújabb, Gram-pozitív baktériumok ellen kifejlesztett antibiotikumok hatásosak, a kutatók pedig biztató eredményeket érnek el az új típusú (antitest, szignál-molekula, quorum sensing inhibitor alapú) gyógyszerek tesztelése során. Ebben a helyzetben felértékelődött a bakteriális diagnosztika jelentősége. A rezisztens baktériumok gyors és megbízható kimutatása elengedhetetlen a megfelelő antibiotikum terápia megválasztásához, illetve a megfelelő infekciókontroll intézkedések bevezetéséhez. A modern eljárások közül különösen jelentősek a molekuláris biológiai megközelítések, amelyek a baktérium genotípusa alapján akár egy napon belül egyértelmű azonosítást tesznek lehetővé. Munkámmal én is ehhez a területhez kívántam hozzájárulni azáltal, hogy új molekuláris biológiai alapú diagnosztikai eljárásokat

teszteltem a DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumában.

1.1. Vancomycin rezisztencia enterococcusokban

A glikopeptidekkel szembeni másodlagos rezisztenciának jelenleg elsősorban az *Enterococcus* és a *Staphylococcus* genusba tartozó speciesek esetében van klinikai jelentősége. Az első vancomycin rezisztens enterococcus (VRE) fajok megjelenését Európában 1988-ban közölték. Hasonló törzseket találtak később az Egyesült Államok keleti partjainál. A VRE epidemiológiáját tekintve megállapítható, hogy más eredetű a megjelenése és elterjedése az Amerikai Egyesült Államokban és más Európában. Míg az USA-ban a nagymértékű antibiotikum fogyasztás játszik szerepet, Európában az avoparcin hozamfokozó állati takarmányba keverése miatt jelent meg a kórokozó az állatok, majd az ember béltraktusában. 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. Az első hazai PCR technikával igazolt VRE esetet Ghidán és mtsai közölték 2000-ben. Knausz és mtsai 2003-ban ugyancsak PCR-rel igazolt VRE izolálásáról számoltak be. 2005-ben Böröcz és mtsai írták le az első hazai vancomycin rezisztens *E. faecium* által okozott epidémiát.

A vancomycin rezisztencia kétféle módon valósulhat meg: egyrészt a célmolekulák megváltozásával, másrészt az érzékeny célmolekulák eltávolítása révén. 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. Az érzékeny célmolekuláknak, a D-alaninra végződő prekursoroknak az eltávolítását 2 enzim végezheti: a VanX D,D-dipeptidáz, a D-alanin-D-alanin dipeptidek hidrolízisét végzi, a VanY D,D-karboxipeptidáz pedig a késői peptidoglikán prekursorok C-terminális végeiről hasítja le a D-alanint. A D-alanin-D-szerin ligáz termelő törzsek esetén ezt a 2 funkciót a VanXY látja el. A rezisztencia osztályozása tehát a ligázok struktúrális génjeinek szekvenciáin alapul. Eddig 9 *van* gént írtak le. A leggyakoribb VanA típusú rezisztenciát, (amely elsősorban az *E. faecalis* és az *E. faecium* fajokra jellemző), magas szintű vancomycin és teicoplanin rezisztencia jellemzi. A VanB típusú rezisztencia esetén a törzsek vancomycinnel szemben mérsékelten, vagy magas fokban rezisztensek, míg teicoplanin iránt érzékenynek tűnnek. A szerzett, VanD típusú rezisztencia a konstitutívan termelődő D-alanin-D-laktát peptidoglikán prekursoroknak tulajdonítható, a törzsek

mérsékelt rezisztensek mindkét glikopeptidre. A *vanF* gén klasztert enterococcusokban eddig még nem mutatták ki. A legújabban felfedezett *van* gén klasztert, a *vanM*-et 2010-ben jellemezték egy *E. faecium* törzsből. A *vanM* rezisztencia gént hordozó törzsek vancomycinre és teicoplaninra is magas fokban rezisztensek. A glikopeptidekkel szembeni VanC típusú rezisztenciáért a D-alanin-D-szerin ligáz a felelős. Elsőként a *vanCI* rezisztencia gént *Enterococcus gallinarum*, később a *vanC2/3* gént *Enterococcus casseliflavus/flavescens* fajokban írták le. Ez a típusú rezisztencia kizárólag vancomycinnel szembeni, konstitutív vagy indukálható, alacsony szintű rezisztenciát jelent. A VanE, VanG és VanL típusú rezisztencia esetén az *E. faecalis* törzsek csak vancomycinnel szemben mutatnak alacsony szintű rezisztenciát. Míg a *vanA* és *vanB* operonok plazmidon vagy kromoszómálisan kódoltak, addig a többi *van* operont eddig még csak kromoszómában írták le. Néhány VanA illetve VanB típusú enterococcusnál már beszámoltak ún. vancomycin-dependenciáról is. Ezeknek a törzseknek szükségük van a glikopeptidek jelenlétére a növekedéshez, mivel különféle mutációk következtében nincs normálisan működő D-alanin-D-alanin ligázuk.

1.2. Vancomycin rezisztencia staphylococcusokban

A vancomycint 1958-ban vezették be a klinikai gyakorlatba, de a kutatóknak már ezt megelőzően sikerült laboratóriumi körülmények között kifejleszteni a vancomycin rezisztenciát staphylococcusokban. Jelentős aggodalomra adott okot, amikor 1997-ben Japánban leírták az első vancomycinre csökkent érzékenységet mutató *S. aureus*-t. Az első 1997-es 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 (hetero-vancomycin-intermediate sensitive *S. aureus*: hVISA). A második 1997-es közleményben egy VISA (vancomycin-intermediate sensitive *S. aureus*) 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 publikációkat hamarosan újabbak követték a világ különböző tájairól. Az első hazai hVISA törzset 2008-ban írták le Tóth és mtsai. 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. Egészen mostanáig, összesen 9 amerikai, egy indiai és egy iráni VRSA esetről számoltak be.

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. Hátterében, 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. A homogén szintű mérsékelt érzékenység kialakulása több lépcsőben megy végbe, mint a heterogén, így ritkábban is fordul elő. Míg a VISA törzsek előfordulása ritka, addig a vizsgált MRSA törzsek 5-6%-át találták hVISA fenotípusúnak.

1.3. Methicillin rezisztencia staphylococcusokban

A methicillint először 1959-ben vezették be, a penicillin-rezisztens *S. aureus* által okozott infekciók kezelésére. Az első MRSA törzset két évvel később, 1961-ben izolálták Angliában, és azóta is egyre nő az incidenciája. Az Európai Unióban évi több mint 150,000-re becsülik az MRSA infekciók előfordulását. Magyarországon az első MRSA által okozott járvány 1993-1994-ben volt. Az MRSA törzsek egy olyan módosult penicillin-kötő fehérjét termelnek (PBP2a vagy más néven PBP2'), amelynek csökkent az affinitása a legtöbb félszintetikus penicillin, valamint a legtöbb cephem antibiotikum iránt. A PBP2a-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 legalább XI. 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 illetve komplementer szekvenciákat. Ezek 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 a különböző szubtypusokat osztályozzák. A heterogén rezisztenciát mutató törzsek esetén a sejtek többsége 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. A diagnosztika során gondot okozhat, hogy a heterogén törzsek gyakran homogénnek tűnhetnek bizonyos tenyésztési körülmények között.

2. 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 hátterében 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 glycopeptid 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.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Anyagok

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 december 31-ig 7271 enterococcus tenyésztett ki. A vizsgálatainkba bevont MRSA törzseket 2005 január 1. és 2005 december 31. között gyűjtöttük. A hVISA esetekből származó törzseket 2007, 2008 és 2009 években izoláltuk.

A baktériumok tenyésztéséhez használt táptalajokat az Oxoid, Bio-Rad, Beckton-Dickinson valamint a Merck cégektől vásároltuk. Az antibiotikum korongokat az Oxoid-tól, az E-teszteket az AB Biodisk-től vettük. A többi vegyszer illetve kit nagy részét a Sigma, Promega, Fermentas, és Invitrogen cégektől szereztük be. Az SP6 és T7 primereket a DNS szekvenáláshoz az MTA SZBK szekvenáló laboratóriuma biztosította. A többi oligonukleotid primert az Integrated DNA Technologies Inc.-től rendeltük.

3.2. Módszerek

3.2.1. Klinikai minták szűrése, tenyésztése

A laborba érkezett vizsgálati anyagokat általában dúsítjuk Brain-Heart Infusion (BHI) tápoldatban, majd kioltjuk véres, csokoládé és eozin-metilénkék agar táptalajokra. A 16-18 órás inkubálás után véres agaron kinőtt Gram-pozitív, kataláz negatív enterococcusokat szelektív bile-eszkulin-azid agarra oltottuk. A szénhidrát bontás vizsgálatát arabinóz és szorbit táptalajokban néztük. A vancomycin rezisztencia vizsgálata 6 µg/ml vancomycint tartalmazó BHI szűrőlemezen történt. A 16-18 órás inkubálás után véres agaron növekvő Gram-pozitív, kataláz pozitív staphylococcusok mannit fermentálását, só mannit agaron vizsgáltuk. A sejtfelszínhez kötött koaguláz, vagy „clumping factor” detektálását Staphaurex kittel végeztük. A *S. aureus* gyanús törzsek faji azonosítását cső koaguláz teszttel is megerősítettük. A methicillin-rezisztencia kimutatásához oxacillin korong diffúziót indítottunk, majd oxacillin E-tesztet végeztünk a pontos MIC meghatározás érdekében. Az MRSA gyanús törzseket MRSASelect szűrőlemezre oltottuk, amelyen 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

VISA/hVISA gyanús törzseket módosított populáció analízis vizsgálatra küldtük az Országos Epidemiológiai Központba.

3.2.2. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatára használt módszerek

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.

Néhány esetben azonban az E-teszt a legjobb módszer a MIC megállapítására, mivel korongdiffúzió alkalmazásakor a nagyméretű molekulák diffúziója nem megfelelő, mikrodilúció esetén pedig az alacsony inokulum koncentráció szub-optimális 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 felszínére az antibiotikumot meghatározott koncentráció grádiensnek megfelelően vitték fel. 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.

A VITEK2 automata baktériumok identifikálására, valamint érzékenységi vizsgálatára szolgáló rendszer, melynek a 3.01 szoftver verzióját használtuk. Az enterococcusok identifikálásához VITEK2 Gram-pozitív identifikáló kártyát használtunk, az érzékenység meghatározásához pedig AST (antibiotikum érzékenységi teszt) kártyát. A végeredmény körülbelül 8 óra elteltével állt rendelkezésre.

3.2.3. Molekuláris biológiai vizsgálatok

Polimeráz láncreakció (PCR) és restrikciós analízis

A PCR reakciók templátjaként, a baktériumokból készített lizátumokat használtuk, melyet a baktériumtenyésztet forralásos módszerével nyertünk. A Multiplex PCR reakcióban használt, az *E. faecalis* és *E. faecium* *ddl* génekre, valamint a *van* génekre (*vanA*, *vanB*, *vanC1/2*, *vanD*, *vanE* és *vanG*) specifikus primereket Depardieu és mtsai alapján terveztük (J Clin Microbiol 2004, 42: 5857-60). Ezeken kívül az *E. faecalis*, *E. casseliflavus* és *E. gallinarum* fajokat a szuperoxid dizmutáz (*sodA*) génre specifikus primerekkel is azonosítottuk Jackson és mtsai alapján (J Clin Microbiol 2004, 42:3558-65). A magas fokú gentamicin rezisztenciát szintén PCR-rel erősítettük meg. A bifunkcionális aminoglikozid rezisztencia génre (*aacA-aphD*), tervezett primerpárt néhány bázisban módosítottuk (Yean és

mtsai, BMC Microbiol 2007, 7:112). Az MLST kísérletek során használt primereket a www.mlst.net webhely szerint alkalmaztuk.

A *vanC* gének amplifikációjakor keletkezett PCR termékeket közvetlenül emésztettük *HindIII* valamint *SalI* enzimmal. A PCR reakciók eredményét valamint az emésztett fragmentumok méretét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

PCR termék klónozása és szekvenálása

A *vanA* PCR terméket agaróz gélből Qiagen gél extrakciós kittel izoláltuk, a tisztított DNS-t T4 DNS ligázzal pGEM-T Easy vektorba ligáltuk, majd a ligálási elegyet kompetens *E. coli DH5α* sejtekbe transzformáltuk. A transzformált sejtekből a plazmidot QIAprep készlettel izoláltuk és *EcoRI* restrikciós emésztéssel ellenőriztük. A klónok tesztelésére az inzertált DNS mindkét szálát megszekvenáltattuk az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpontjában. Közvetlen szekvenáláshoz a PCR termékeket közvetlenül tisztítottuk Microcon Ultracel YM-100 kittel, majd a szekvenálást az amplifikációhoz használt primerekkel végezték Gödöllőn a BIOMI Kft-nél, illetve a DEOEC Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézetében. A hVISA3 törzs szekvenálását az Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszéken végeztük.

3.2.4. Epidemiológiai vizsgálatok

Multilocus sequence typing (MLST)

Az *E. faecalis* törzsek MLST vizsgálata során 7 háztartási gén (*gdh*, *gyd*, *pstS*, *gki*, *aroE*, *xpt*, *yqiL*) belső génfragmentumának szekvenálása történt. A *S. aureus* törzsek esetén a 7 vizsgált gén a következő volt: *arc*, *aro*, *glp*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*. 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.

Pulzáló erőterű gél-elektroforézis (PFGE)

A *S. aureus* törzsek PFGE vizsgálatát egy irodalomban leírt módszer alapján végeztük, a SOTE Orvosi Mikrobiológiai Intézetében, kisebb módosításokkal (Stephen és mtsai. J Clin Microbiol 2003, 41:1574-85). 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 enterococcus törzsek PFGE vizsgálatát a *S. aureus* törzsekhez hasonló módon végeztük, kisebb módosításokkal. A dendrogrammok készítésénél 2% optimalizációt és 2% sáv pozíció toleranciát választottunk.

Bakteriofág tipizálás

Az MRSA törzsek tipizálása a Csongrád megyei ANTSZ-ben történt, Blair és Williams munkássága alapján (Bull World Health Org 1961, 24:771–784). A módszer segítségével egy baktérium fajon belül, biokémiai és szerológiai módszerrel tovább nem differenciálható törzsek, különböző típusokba oszthatók. A fág típus-meghatározáshoz használt fágok, az ún. típusfágok a tipizálandó baktériumtörzseket azok érzékenysége esetén lizálják. A típusfágokkal kapott oldások alapján állapítható meg a fág típus/fágkép.

Módosított populáció analízis profil (PAP)

A csökkent vancomycin érzékenységre gyanús staphylococcus törzseket módosított populáció analízis vizsgálatra küldtük az Országos Epidemiológiai Központba (Tóth és mtsai, J Chemother 2008, 20: 655-656). Különböző vancomycin koncentráció melletti inkubálás után a baktérium telepeket a vancomycin hígítás függvényében féllogaritmikusan kell ábrázolni, majd meghatározni a görbe alatti területeket (PAP-AUC= area under curve). Ezután a VISA/hVISA gyanús törzsek PAP-AUC értékének és a párhuzamosan vizsgált pozitív kontroll törzs PAP-AUC értékének arányát kell megvizsgálni. Ha ez ≥ 0.9 , akkor hVISA törzsről, ha ≥ 1.3 , akkor VISA törzsről beszélünk.

Staphylococcus chromosomal cassette mec (SCCmec) tipizálás

A Debrecenben izolált 3 hVISA törzs SCCmec kazetta tipizálása multiplex PCR segítségével történt az Országos Epidemiológiai Központban (Oliveira és mtsai, Antimicrob Agents Chemother 2002, 46: 2155-2161). A reakció 8 primer párt tartalmaz, a *mec* gén komplex 8 lókuszára tervezve. A kapott termékek száma és mérete egy mintázatot határoz meg (SCCmec típus).

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

4.1. 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 screen lemezen növekvő törzsek közül a multiplex PCR reakciók alapján egyetlen *E. faecalis* izolátum hordozta a *vanA* rezisztencia gént. Ezen kívül 15 klinikai mintából tudtuk kimutatni *vanC* pozitív enterococcusok jelenlétét.

4.1.1. A *vanC* pozitív VRE törzsek jellemzése

A 16 *vanC* gént hordozó törzsből összesen 2 volt *vanC2* pozitív *E. casseliflavus*, a többi 14 pedig *vanC1* pozitív *E. gallinarum*. Az általunk használt *vanC* specifikus primerek mind a *vanC1*, mind a *vanC2* gének amplifikálására alkalmasak, ezért kezdetben ezeket DNS szekvenálással különböztettük meg. Később a két gén elkülönítésére restrikciós analízist dolgoztunk ki. A mások által használt *MspI* enzim helyett, amely mindkét terméket hasítja, mi a *SalI* és *HindIII* enzimeket használtuk. A *SalI* enzim specifikusan csak a *vanC1* PCR terméket hasítja, míg a *HindIII* csak a *vanC2* PCR terméket. Ezzel a módszerrel azt tapasztaltuk, hogy az egyik mintát (6130-as) mindkét enzim hasította, felvetve ezáltal mindkét gén jelenlétét. Az eredeti mintából származó lefagyasztott törzs felnövésztésével, és az egyes telepek szétszélesztésével három szubkultúrát különítettünk el. A fajspecifikus *sodA* PCR alapján a három szélesztés három fajt reprezentált. A 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 az *E. casseliflavus* a *vanC2*, az *E. gallinarum* pedig a *vanC1* gént hordozta.

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. Három *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. Szerencsére a VRE törzsek a többi vizsgált antibiotikumra érzékenyek bizonyultak.

A 6130-as mintából kitenyésztett vancomycin érzékeny *E. faecalis* törzset MLST módszerrel genotipizáltuk. Az acetyl-CoA acetyltransferáz (*yiqL*) gén szekvenálása során az *yiqL*-8 allélhoz képest a 187-es pozícióban egy C→T nukleotid cserét találtunk. Ezek alapján az MLST kurátora az új allélhoz az *yiqL*-64, az új szekvencia típusához pedig az ST-336 számot rendelte.

A rezisztens törzsek genetikai rokonságának feltárásához pulzáló erőterű gélelektroforézist használtunk. A dendrogrammok alapján 2 *E. gallinarum* mintázata teljes mértékben megegyezett. Mindkét törzs 2009-ben, de az egyik az I. Sebészetről, a másik a II. Sebészetről érkezett. Az első 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 szepszise kialakulásában, amire az alkalmazott Vancocin nem hatott. A két beteg között direkt kontaktus nem történhetett. 6 további törzset egy klaszterbe lehetett sorolni, mivel a PFGE mintázatuk több mint 90%-ban megegyezett. A törzsek különböző időszakokból, és különböző klinikákról származtak.

4.1.2. Egy *vanA* pozitív eset ismertetése

Az 50 éves beteg mitrális billentyű prolapszus elektív műtete miatt került a kórházba. A helyi protokoll szerint cefuroxim és tobramycin profilaxist alkalmaztak. 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 kórokozók valószínűleg csak kolonizálták a sebet. Az izolátumokat hagyományos biokémiai módszerekkel identifikáltuk. A 6 µg/ml vancomycin tartalmú szűrőlemezen kinőtt *E. faecalis* telepeket tovább vizsgáltuk. Az antibiotikum érzékenység meghatározásához a VITEK2 automatát használtuk; a törzs rezisztensnek bizonyult streptomycinre, tetracyclinre, valamint vancomycinre és teicoplaninra. A Multiplex PCR reakció során 2 sávot kaptunk, melyek az *E. faecalis ddl* valamint a *vanA* glikopeptid rezisztencia géneknek feleltek meg. A faji szintű azonosítást megerősítettük az *E. faecalis ddl* illetve *sodA* génjeire specifikus primerekkel végzett külön PCR reakciókkal. A rezisztencia gén identifikálását szintén megerősítettük egy specifikus PCR reakcióval. A PCR termék klónozásával kapott plazmid DNS-t T7 valamint SP6 primerekkel szekvenáltattuk az MTA SZBK Szekvenáló Laboratóriumában. A

megszekvenált szakasz 1 nukleotid kivételével teljesen megegyezett az adatbázisban lévő *vanA* gén szekvenciájával. A mutáció ellenőrzésére a *vanA* PCR terméket közvetlen tisztítás után is megszekvenáltattuk, és 100%-ban azonosnak találtuk a pLW043, pVEF1 illetve pVEF2 plazmidokra jellemző *vanA* gén megfelelő fragmentjével. A pVEF plazmidok gyakrabban fordulnak elő *E. faecium* fajokban, habár a mi esetünkben több független kísérlet is *E. faecalis*-nak azonosította a baktériumot.

4.1.3. VITEK 2 automatával végzett vizsgálatok

Vizsgálataink során össze kívántuk hasonlítani a VITEK2 automata 3.01. szoftver verziójával (bioMérieux), valamint az E-tesztel (AB Biodisk) kapott eredményeket a *vanA* pozitív törzs, illetve a *vanC* pozitív törzsek glikopeptid érzékenységeire vonatkozóan. A két módszer közötti különbségeket a CLSI határértékek alapján 3 csoportra osztottuk: nagyon súlyos, súlyos, illetve kisebb jelentőségű interpretációs hibákat definiáltunk. 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, illetve az érzékeny ATCC 29212 *E. faecalis* törzset használtuk. 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, 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, 6 volt érzékeny, és 6 volt közepesen érzékeny. 6 E-tesztel közepesen érzékenynek kapott törzset a VITEK2 érzékenynek detektált, míg 4 esetben a közepesen érzékeny törzseket 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.

4.2. 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, és a nozokómiális surveillance rendszer tevékenysége ellenére 2005-ben már meghaladta a 7%-ot.

A 2005 január-december közötti időszakban összesen 339 MRSA törzset izolált a Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratórium, melyek 102 betegről, 17 különböző klinikáról származtak. A kiértékelésnél csak az első izolátumot vettük figyelembe minden betegnél. Az MRSA aránya igen magas volt a Sebészeti klinikákon, a Tüdőklinikán és a Gyermekklinikán. 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% pedig egyéb mintából származott).

4.2.1. MRSA törzsek antibiotikum rezisztencia mintázata

Minden izolátum béta-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.

4.2.2. MRSA törzsek epidemiológiája

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

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 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 fágtypus a 617/622/ 623 volt. A törzsek a legkülönbözőbb klinikákról származtak. A B típusba sorolható

törzsek (n=13) szintén egyedi antibiotikum rezisztencia mintázattal rendelkeztek; a legtöbb érzékeny volt trimethoprim/sulfamethoxazolra, míg három kivétellel rezisztensek voltak amikacinra. 72,7% a III fágcsoporthoz tartozott. A domináns fágtípus a 629-es volt. A legtöbb C típusú izolátum szintén a III fágcsoporthoz tartozott. Ezek között volt a legtöbb multirezisztens izolátum. Két izolátumról kijelenthetjük, hogy a vancomycin illetve teicoplanin kivételével pánrezisztensek voltak, mindeket a III fágcsoporthoz és 8A rezisztencia mintázattal képviselte. 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 fágtípusok analízise során azt tapasztaltuk, hogy a Gyermekklinikáról származó törzsek egy kivétellel a III fágcsoporthoz tartoztak, és a 623-as fágtípus volt túlsúlyban, míg ezen izolátumok másik fő forrása a fent említett különálló klinikai blokk volt. A törzsek többsége (n=20) a C PFGE típusba tartozott, változatos rezisztencia mintázatokkal. A kevert fágcsoporthoz tartozó 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.

4.2.3. hVISA törzsek jellemzése

A Debrecenbeni hVISA törzseket 2007, 2008 és 2009 években izoláltuk. Három új törzset tudunk kimutatni 3 különböző betegből, ezekkel együtt a hVISA izolátumok száma Magyarországon 5-re nőtt.

Az első beteg submandibularis-parapharyngealis tályog miatt került a kórházba, majd haemodialízis programba kellett felvenni. A beteg haemokultúrájából MRSA tenyésztett ki, amely vancomycin érzékeny volt, ezért az amikacin terápiát vancomycinnel később pedig rifampicinnel kombinálták. Posztmortem haemokultúrájából azonban már csökkent vancomycin érzékenységgel MRSA tenyésztett ki (hVISA1). A második beteg szomatomentális retardációban szenvedett. Tüdőgyulladás és akut légzési elégtelenséggel került kórházba. Később orrváladékból, haemokultúrából és bronchusváladékból MRSA tenyésztett ki. A bronchusváladékból izolált MRSA hVISA törzsnek bizonyult (hVISA2). A célzott kezelések ellenére állapotát nem sikerült javítani. A harmadik beteg égési sérüléseket szenvedett a teljes testfelületének kb 40%-án. Többszörös nekrotómiára és bőráltatásokra volt szüksége.

Bőrléziójából hVISA törzs tenyésztett ki (hVISA3), ezért tigeccyclinnel kezelték. Ő volt az egyetlen beteg, aki gyógyultán távozott a kórházból.

A törzsek antibiotikum érzékenységét először a CLSI ajánlása alapján korongdiffúzióval vizsgáltuk meg. A methicillin rezisztenciát oxacillin E-tesztel néztük, és az E-teszt alapján a törzsek rezisztensek voltak a következő antibiotikumokra is: erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin, gentamicin, amikacin. Ezeken kívül a hVISA2 törzs rezisztens volt rifampicinre. Az első beteg 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 határértékek a következők voltak: vancomycin 8 mg/L, teicoplanin 12 mg/L. A PAP-AUC arány 1,01 volt. Az MLST és az SCCmec tipizálás alapján a törzs a Magyar ST239-MRSA-III klónt képviselte. A második beteg 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. Az MLST és SCCmec tipizálás alapján a törzs a New York/Japan ST5-MRSA-II klónhoz tartozott. A harmadik beteg bőrléziójából kitenyésztett MRSA törzs esetén a makro E-teszt és populáció analízis alátámasztotta a hVISA gyanút (hVISA3). A makro E-teszt során kapott vancomycin és teicoplanin határérték 8 mg/L volt. A PAP-AUC arány ennél a törzsnél 0,93 volt. A molekuláris tipizálás beigazolta, hogy ez az izolátum is a New York/Japan ST5-MRSA-II klónhoz tartozott.

Végső konklúzióként elmondható, hogy mind a VRE mind az MRSA incidenciája nemzetközi összehasonlításban alacsony a Debreceni Egyetem klinikáin. Ez elsősorban a jó kórházhigiénés helyzetnek, illetve a gyors és megbízható diagnosztikai eredményeknek köszönhető. A helyzet további javítása érdekében fejlesztési törekvéseink közé tartozik a molekuláris diagnosztikai módszerek még szélesebb körű bevezetése a napi diagnosztikai rutin munkába.

5. 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.

6. KÖZLEMÉNYEK

6.1. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

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. *Microbial Drug Resistance*, “accepted by publisher”, 2011.

IF:1.989

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 Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 57 (3), 157–163, 2010. DOI: 10.1556/AMicr.57.2010.3.1

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 European Journal of Medicine*, 4 (2), 259-261, 2009. DOI: 10.2478/s11536-009-0008-7

IF:0.224

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), 129-36, 2009. DOI: 10.1007/s10096-008-0588-1

IF:2.605

6.2. Az értekezéshez kapcsolódó konferencia prezentációk

Dombrádi, Zs., Bodnár, F., Péterffy, Á., Kónya, J., Orosi, P., Dombrádi, V., Szabó, J.: Molecular analysis of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated in Debrecen. 15th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Budapest, Hungary, 2007. 07. 18-20.

Zs. Dombrádi, J. Szabó: Molecular analysis of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated in Debrecen. Scientific-practical conference with international participation of students and young scientists. Uzhorod, Ukraine, 2008. 04. 16.

Zs. Dombrádi, J. Szabó: Phenotypic and genotypic characterisation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from university of Debrecen. Scientific-practical conference with international participation of students and young scientists. Uzhorod, Ukraine, 2008. 04. 16.

Zs. Dombrádi, A. Szarka, H. K. Illésné, J. Szabó: Occurrence of heterogeneously vancomycin-intermediate sensitive *Staphylococcus aureus* (hVISA) strains in Debrecen (Hungary). Ukrainian-Hungarian Days for the Extending of the Bilateral Cooperation Participated countries: Ukraine, Hungary, Slovak republic, Romania, Czech Republic. Uzhorod, Ukraine, 2009. 11. 3-4.

Dombrádi Zs., Dombrádi V, Szabó J.: *VanC* pozitív enterococcus törzsek előfordulása a Debreceni Egyetem Klinikáin. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2008. 10. 15-17.

Rákóczi, É., Tóth, Á., **Dombrádi, Zs.**, Kárpáti, I., Mátyus, J., Veress, K., Zeher, M., Maródi, L., Orosi, P., Szabó, J.: Vancomycinre mérsékelt szinten heterorezisztens *Staphylococcus aureus* esetek megjelenése. A Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság XXXVII. Kongresszusa, Szeged, 2009. 10. 1-3.

Dombrádi, Zs., Dobay, O., Nagy, K., Kónya J., Dombrádi, V., Szabó J.: 2004-2009 között izolált vancomycin rezisztens Enterococcus (VRE) törzsek jellemzése. A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2010. 10. 12-15.

6.3. Az értekezéshez kapcsolódó poszterek

S. Dombradi, J. Kónya, V. Dombradi, J. Szabó: Molecular analysis of vancomycin resistant enterococci isolated in Debrecen, Hungary. 18th ECCMID, Barcelona, Spain, 2008. 04. 18.-22. p 2122.

Zs. Dombrádi, Á. Tóth, E. Ungvári, É. Rákóczi, I. Kárpáti, J. Mátyus, K. Veres, M. Zeher, P. Orosi, L. Maródi, J. Szabó.: Fatal sepsis caused by heterogeneously vancomycin-intermediate sensitive *Staphylococcus aureus* (hVISA) strains in two Hungarian patients, A Magyar Mikrobiológiai Társaság Nagygyűlése, Keszthely, 2009. 10. 7-9.

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 tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.05.04

