

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Az antibiotikum fogyasztás és a rezisztenciamechanizmusok
epidemiológiájának kapcsolata nem fermentáló nozokomiális
kórokozók esetében**

Mózes Julianna

Témavezető: Dr. Kardos Gábor



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2015

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	4
I. Bevezetés	6
II. Irodalmi áttekintés	8
II.1. A nem fermentáló nozokomiális Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzések epidemiológiája	8
II.1.1. A nem fermentáló nozokomiális Gram-negatívok okozta fertőzések patogenezise	9
II.1.2. A nem fermentáló nozokomiális Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzések kezelése	12
II.2. Az aminoglikozid antibiotikumok	12
II.2.1. Az aminoglikozidok kémiai szerkezete	12
II.2.2. Az aminoglikozidok hatásának mechanizmusa	13
II.2.3. Az aminoglikozidokkal szembeni rezisztenciamechanizmusok.....	14
II.3. A karbapenem antibiotikumok	18
II.3.1. A karbapenemek kémiai szerkezete	18
II.3.2. A karbapenemek hatásának mechanizmusa	19
II.3.3. A karbapenemekkel szembeni rezisztenciai mechanizmusok.....	20
II. 4. Az integronok felépítése és szerepük a rezisztenciában	23
III. Célkitűzések	26
IV. Anyagok és módszerek	27
IV.1. Izolátumok	27
IV.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> izolátumok	27
IV.1.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> izolátumok	27
IV.2. Az antibiotikum érzékenység meghatározása	28
IV.3. DNS izolálása.....	28
IV.4. A vizsgált gének.....	28
IV.4.1. Aminoglikozid rezisztencia gének vizsgálata <i>P. aeruginosa</i> és <i>A. baumannii</i> izolátumok körében	28
IV.4.2. Karbapenem rezisztencia gének vizsgálata <i>A. baumannii</i> izolátumok körében ..	29
IV.4.3. Virulencia gének vizsgálata <i>P. aeruginosa</i> izolátumok körében.....	29
IV.4.4. Az amplikonok detektálása	32
IV.4.5. Integronok vizsgálata	32
IV.5. Klonalitás vizsgálata	34
IV.6. Az antibiotikum fogyás mérése.....	35
IV.7. Statisztikai analízis.....	35
IV.7.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
IV.7.2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	35
V. Eredmények.....	38
V.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
V.1.1. Az aminoglikozid rezisztencia gének és az integronok előfordulása.....	38
V.1.2. Virulencia gének.....	39
V.1.3. A klonalitás vizsgálata.....	39
V.1.4. Az antibiotikum fogyás	47
V.2. <i>Acinetobacter baumannii</i>	48
V.2.1. Rezisztencia előfordulása	48
V.2.2. Az aminoglikozid rezisztencia gének megoszlása és az integronok típusai	48
V.2.3. Karbapenem rezisztencia gének megoszlása.....	49

V.2.4. A klonalitás vizsgálata.....	50
V.2.5. Klaszterek megoszlása a különböző fekvőbeteg osztályok között.....	59
V.2.6. Összefüggés vizsgálata az antibiotikum felhasználás, a prevalencia, és a rezisztencia kialakulása közötti.....	59
V.2.7. Különbségek az antibiotikum felhasználásban, prevalenciában és karbapenem rezisztenciában fekvőbeteg osztályonként	60
VI. Megbeszélés	64
VII. Összefoglalás	72
VIII. Summary	73
IX. Irodalomjegyzék.....	74
X. Tárgyszavak-Keywords.....	90
XI. Köszönetnyilvánítás	91
XII.Függelék	92

Rövidítések jegyzéke

AAC	aminoglikozid acetiltransferázok
ANT	aminoglikozid nukleotidil-transferázok
APH	aminoglikozid foszfortranszferázok
bp	bázispár
CFU	telepképző egység (Colony Forming Unit)
CHDL	karbapenem-hidrolizáló β -laktamáz (karbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases)
COPD	krónikus obstruktív tüdőbetegség (chronic obstructive pulmonary disease)
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
DDD	ajánlott napi terápiás dózis (Defined Daily Dose)
DHBA	2,3-dihidroxi-benzoészav
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxiribonukleotid trifoszfát
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
ESBL	széles spektrumú β -laktamáz
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ITO	intenzív terápiás osztály
MALDI-TOF	mátrix asszisztált lézer deszorpció ionizáció-repülési idő analízis Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight
MDR	multirezisztens (multidrug-resistant)
MRSA	meticillin rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
OMP	külső membrán fehérje (outer membrane proteins)
OXA	oxacillináz
PBP	penicillin kötő protein (penicillin binding protein)
PCR	polimeráz lánreakció

	(polymerase chain reaction)
PFGE	pulzáló mezéjű gélelektroforézis (pulsied-field gel electrophoresis)
PDR	pánrezisztens (pandrug- resistant)
RFLP	restrikciós fragment hossz polimorfizmus (restriction fragment lenght polymorphism)
rRNS	riboszómális ribonukleinsav
UPGMA	súlyozatlan pár-csoport módszer aritmetikai átlagokkal (unweighted pair group method with arithmetic averages)
VAP	gépi lélegeztetéssel összefüggő pneumonia (ventilator-associated pneumonia)
XDR	kiterjedten rezisztens (extensively drug- resistant)

I. Bevezetés

Bár korábban a multirezisztens Gram-pozitív baktériumok (meticillin rezisztens *Staphylococcus aureus*, MRSA; vancomycin rezisztens *Enterococcus*, VRE, vancomycinnel szemben mérsékelten érzékeny *Staphylococcus aureus*, VISA, penicillin rezisztens *Streptococcus pneumoniae*) jelentették a legfontosabb és legnehezebben kezelhető problémát, ma már a multirezisztens Gram-negatív baktériumok, így a multirezisztens *Pseudomonas aeruginosa*, a multirezisztens *Acinetobacter baumannii*, valamint a széles spektrumú β -laktamázt (ESBL-t) termelő bélbaktériumok váltak a legfontosabb kórházi patogénekké (Chawla és mtsai, 2013). Ezen kórokozók körében megjelent és terjedni kezdett a pánrezisztencia, továbbá az általuk okozott nozokomiális fertőzések (pneumonia, bacteriaemia, secunder meningitis) igen magas letalitási arányt mutatnak (30-90%; Di Bonito és mtsai, 2012). A béta-laktámokkal szembeni rezisztencia súlyos problémát jelent az egészségügyi ellátásban és a velük szembeni multirezisztencia következtében a terápiában használható más antibiotikumok alkalmazása felértékelődött, különösen a széles spektrumú, baktericid aminoglikozidok és fluorokinolonok használata, de más multirezisztens kórokozókkal szemben hatásosságukat megőrző szercsoportok, így a tigecyclin, polymyxinek használata is (Peleg és mtsai 2008). Ennek következtében ezen szerek felhasználása is növekszik, így a velük szembeni rezisztencia mértéke is nő. Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia terjedésében fontos szerepe van a mobilis genetikai elemeknek (plazmidoknak, transzpozonoknak és integronoknak), melyek horizontális géntranszfer útján jelentősen felgyorsítják a szerzett rezisztencia terjedését a különböző baktérium fajok között (Collis és Hall, 1998).

Fontos megjegyezni, hogy a terápia során a helytelenül megválasztott antibiotikum, valamint a széles spektrumú antibiotikumok indokolatlanul gyakori alkalmazása nemcsak az integronok terjedéséhez járul hozzá, hanem a rezisztencia kialakulásán keresztül a rezisztens klónok szelekciójához. A multirezisztens, illetve a kiterjedten rezisztens törzsek szelektálódása komoly egészségügyi problémákhoz vezet, mivel ezekkel szemben a terápiás lehetőségek beszűkültek, a tigecyclinen és a colistinon kívül más szer nem hatásos (Montero és mtsai, 2013; Moskowitz, 2012).

Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia arány alakulását tekintve Magyarország a kritikus területek közé tartozik Európában. Az aminoglikozid-rezisztens invazív *Klebsiella pneumoniae* és *P. aeruginosa* izolátumok aránya 25-50% közé tehető, míg az *A. baumannii*

esetében ez az arány már az 50%-t is meghaladja. Hasonló előfordulási arány tapasztalható a karbapenem-rezisztens *P. aeruginosa* és *A. baumannii*, valamint a fluorokinolon-rezisztens *P. aeruginosa* izolátumok esetében is. A fluorokinolon-rezisztens *A. baumannii* aránya szintén meghaladja az 50%-t. (EARS-NET, 2013). A 2013-as monitor rendszer adatai alapján az *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* komplexbe tartozó izolátumoknak az 1,9%-a colistin esetében 4 feletti MIC értékkel rendelkezett (OEK, 2013).

II. Irodalmi áttekintés

II.1. A nem fermentáló nozokomiális Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzések epidemiológiája

A nem fermentáló Gram-negatív baktériumok az egészségügyi ellátással összefüggő, nozokomiális fertőzést okozó patogénként jelentek meg az elmúlt évtizedekben (Malini és mtsai, 2009; Memis és mtsai, 2012; Chawla és mtsai, 2013). A *Pseudomonas aeruginosa* és az *Acinetobacter* fajok a leggyakrabban izolált kórokozók. Ubikviter jellegük miatt előfordulnak természetes vizekben, talajban, gyakran kórházi eszközökön (katéter, lélegeztető gép, flexibilis bronchoszkóp, mellpumpa külső felszíne) is, de képesek kolonizálni az emberi bőrt, légutakat, valamint az emésztőrendszert is (Apisarnthanarak és mtsai, 2011; Mulin és mtsai, 1995; DiazGranados és mtsai, 2009). A kolonizált páciensek kontaminálhatják a kórházi személyzet kezét is, amely segíti a fertőzés átvitelét. A kórokozók átvitelében fontos szerepe van még a kontaminált kesztyűknek, köpenyeknek és a szappanadagoló készülékeknek is (Morgan és mtsai, 2010; Lanini és mtsai, 2011). Opportunista kórokozóként az immunrendszerben lévő lokális vagy szisztémás zavart kihasználva súlyos, gyakran életveszélyes fertőzések kialakításra képesek. A fertőzés kialakulásában fontos prediszponáló tényező az immunszupprimált állapot, amely kialakulhat például daganatos megbetegedések (hematológiai malignitások) talaján és az égési sérülésekhez kapcsolódóan (Sood és mtsai, 2012; Tekin és mtsai, 2014).

Az összes nozokomiális fertőzés mintegy 14%-át a *P. aeruginosa* és 2-10%-át az *A. baumannii* okozza (Barrios és mtsai, 2014; Nathwani és mtsai, 2014; Richet és Fournier, 2006). A gépi lélegeztetéssel összefüggő pneumonia (ventilator-associated pneumonia; VAP) általában 48-72 órán belül alakul ki az endotracheális intubációt követően és a letalitása akár a 70%-ot is elérheti az intenzív osztályokon (Di Bonito és mtsai, 2012; Nathwani és mtsai, 2014). Jelentősek még az általuk okozott nozokomiális véráramfertőzések, melyek 34%-ért felelnek (Chiang és mtsai, 2012), míg a katéter viselés következtében kialakult húgyúti infekciók 40%-a (Sabharwal és mtsai, 2014), valamint az égési sérülések és a sebészeti beavatkozások következtében létrejött sebfertőzések 20%-a köszönhető ezeknek a törzseknek. Nem ritka az *A. baumannii* által okozott másodlagos meningitis is, mely idegsebészeti műtétet követően alakul ki és hasonló letalitási aránnyal bír, mint a VAP (Peleg és mtsai, 2008).

II.1.1. A nem fermentáló nozokomiális Gram-negatívok okozta fertőzések patogenezise

II.1.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Hosszú ideig képes perzisztálni kórházi környezetben, mely a nedvességtűrő tulajdonságának köszönhető. Fertőtlenítőszerrel szembeni rezisztenciája jól ismert, ami a kórházi környezetben való fennmaradásához szintén hozzájárul (de Abreu és mtsai, 2014).

Nagyszámú virulencia faktora lehetővé teszi, hogy bármilyen szervet megfertőzzön, emellett patogén különböző növény, illetve gerinces és gerinctelen állatfajokra (Walker és mtsai, 2004; Haenni és mtsai, 2015). A baktérium pilusokkal és egyéb adhezinekkal kötődik a nyálkahártyához, valamint más felszínhez. Az adhéziót követően a kórokozó extracelluláris, viszkózus exopoliszacharidot, más néven alginátot termel. Az alginát fontos szerepet tölt be a fertőzés első fázisában – különösen a kolonizációban – és védelmet nyújt az antibiotikumokkal szemben azáltal, hogy részt vesz a biofilm képzésben (Lau és mtsai, 2005). A biofilm mátrixa mannózban gazdag poliszacharidból (Psl) épül fel, emellett tartalmaz fehérjét és exogén DNÁznak ellenálló extracelluláris DNS-t is (Borlee és mtsai, 2010). A biofilm képes csökkenteni a polimorfonukleáris sejtek kemotaxisát, a komplement aktiválódást és a fagocitózist (Oliver és Weir, 1985; Learn és mtsai, 2005; Pedersem és mtsai, 1990; Leid és mtsai, 2005). Az epithelialis sejtekhez történő kötődés során a III. típusú szekréciós rendszer (type three secretion system; T3SS) aktiválódik. A komplex T3SS rendszer funkcionálisan öt részre osztható: tú komplex, transzlokációs apparátus, szabályozó fehérjék (exsA, exsD, exsC, exsE), effektor proteinek (exoS, exoU, exoT, exoY) és chaperonok. Az apparátus segítségével a baktérium különböző effektor proteineket fecskendez be közvetlenül a gazdasejtek citoplazmájába. Ezek az effektor proteinek károsítják vagy elpusztítják a fagocitákat, melynek hatására más baktériumok is képesek felülfertőzni a tüdőt. Továbbá az epithelialis és endothelialis barrierék károsításával lehetővé teszik, hogy a *P. aeruginosa* betörjön a véráramba, melynek következtében bacteriaemia és szeptikus sokk alakul ki. Az effektor proteinek közül az exoU rendelkezik a legnagyobb sejtkárosító hatással, mivel az alveoláris makrofágok interleukin (IL)-1 β és IL-18 termelésének gátlásán kívül indukálja az eikozanoid zsírsavak felszabadulását, ezáltal felerősíti a késői gyulladással és szövetkárosodást idéző elő (Hauser, 2009). Emellett a mikroba szöveti invázióját sziderofórijai, extracelluláris enzimeik és toxinjai teszik lehetővé. Az elasztáz egy metalloproteáz (pseudolizin, lasB és lasA, staphylolizin), ami az elasztint és a kollagént hasítja, inaktíválja az immunglobulin IgG-t és az IgA-t, valamint gátolja a mikrobát eltávolító csillószőrök mozgását. Amikor a sejtek a növekedés késői logaritmusos fázisában vannak

vagy, amikor a denzitásuk nagy, akkor jóval több elasztáz termelésére hajlamosak (Hamood és mtsai, 1996). Az alkalikus proteáz (aprA, aeruginolizin) gátolja a fibrinképződést, továbbá képes lebontani a komplement rendszer C1q és C3 komponenseit, a citokineket és a kemokineket, tehát a fertőzés során immunmoduláns hatása van. A foszfolipáz C a sejtek membránját károsítja és a szaruhártya-gyulladásban igen fontos virulencia faktor (Kida, 2008). A *P. aeruginosa* vashiányos körülmények során sziderofór (pioverdin) termelésére képes, melyet a TonB-dependens receptor (fpvA-I, fpvA-II, fpvA-III) ismer fel (Chial és mtsai, 2003). A szöveti invázióban fontos szerepe van még az exotoxin-A-nak, ami egy specifikus receptorhoz (low-density receptor related protein; LRP) történő kötődés következtében bejut a sejtekbe, ahol egy C-terminális toxin fragmenssé átalakulva retrogárd transzport útján bejut az endoplazmatikus retikulumba (ER). Az ER-ből a sec61 csatornán keresztül a citoszolba retrotranszlokálódik és gátolja a fehérje szintézist a kettős elongációs faktor ADP ribozilációjával, melynek eredményeképpen a sejtek elpusztulnak. Az exotoxin-A képes megakadályozni a tumor nekrozis faktor (TNF), IL-10, IL-6 és IL-8 felszabadulását is (Morlon és mtsai, 2009).

II.1.1.2. Acinetobacter baumannii

Az *Acinetobacter* genusba tartozó fajok többségét csak genotipizálási módszerrel lehet elkülöníteni. Klinikai szempontból a legjelentősebb fajai az *Acinetobacter calcoaceticus* – *baumannii* komplex tagjai, melyek gyakran izolálhatók infekciókból. Ebbe a csoportba négy species tartozik: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *Acinetobacter* genospecies 3 (*A. pittii*) és az *Acinetobacter* genospecies 13TU (*A. nosocomialis*) (Nemec és mtsai, 2011). Az *A. baumannii* jól elkülöníthető az említett három fajtól azáltal, hogy kromozómáisan hordoz egy β -laktamáz kódoló *bla*_{OXA51-like} gént. A normál flóra tagjaként előfordulhat az *A. lwoffii*, az *A. johnsonii* és az *A. junii* is (Peleg és mtsai, 2008).

A legnagyobb egészségügyi problémát a multirezisztens (multidrug resistant, MDR) és a kiterjedten rezisztens (extensively drug resistant, XDR) *A. baumannii* által okozott fertőzések jelentik. Az ilyen törzsek jellegzetessége a jelentős mértékű klonalitás, az elhúzódó kórházi járványok háttérében az esetek többségében néhány klón áll. Európában az elmúlt évtizedben három epidémiás klón elterjedését igazolták: Európai klón I, Európai klón II és Európai klón III (EU I, EU II illetve EU III; Peleg és mtsai, 2008; Zarilli és mtsai, 2009). Diancourt és munkatársai által végzett multi-lókuszos szekvencia tipizálás (multilocus sequence typing, MLST) alapján a korábbi EU I, EU II és EU III klónok a CC1, CC2 és CC3 komplex klónoknak felelnek meg (Diancourt, 2010).

Az *A. baumannii* csillótlan coccobacillus, spórát sem képez. A *P. aeruginosa*-hoz hasonlóan hosszú ideig képes perzisztálni kórházi környezetben, mely a biofilm képző tulajdonsága mellett a szárazságtűrésének is köszönhető (Peleg és mtsai, 2008). Az *A. baumannii* virulencia mechanizmusai jelen pillanatban még kevésbé ismertek. A humán epithelialis sejtekhez, valamint abiogén felületekhez (például katéter) fimbriák vagy poliszacharid tokja segítségével kötődik. Az adhéziót követően, a baktérium poli- β -1-6-N-acetil-glükózamint (PNAG) termel és szekretál, mely exopoliszacharidként fontos eleme a biofilm képződésének. A sejtfelszíni adhéziót, valamint a biofilm képződést az OmpA külső membrán protein is segíti, ami hozzájárul még az epithelialis sejtekbe történő invázióhoz is. Ez a fehérje a sejtek apoptózisát képes indukálni a proapoptopikus molekulák (citokróm C) és az apoptózist indukáló faktorok felszabadulásán keresztül, aminek eredményeképpen károsodnak a különböző eukarióta sejtek (HeLa, Hep-2, Cos-7, makrofágok; Cerqueira és mtsai, 2011). Mindezek mellett az OmpA részt vesz a szérumrezisztencia kialakításában azáltal, hogy kölcsönhatásba lép az alternatív komplement útvonal szolubilis inhibitoraival, amelynek köszönhetően a baktérium elkerüli a komplement-mediált ölést. A szérumrezisztencia kialakításában szintén fontos szerepet játszik a lipopoliszacharidja is. Bizonyos törzsek poliszacharid tokkal is rendelkeznek, mely védi az *A. baumannii*-t a gazdaszervezet immunválaszával szemben. A kolonizációt és az adhéziót követően, a fertőzést fenntartását és a baktérium szövetekben való terjedését a foszfolipázok (C és D) teszik lehetővé. Az OmpA mellett a foszfolipáz D is fontos szerepet játszik a szérumrezisztencia kialakításában, míg a foszfolipáz C fokozza a hámsejtekre gyakorolt citotoxikus hatást (Antunes és mtsai, 2011). A baktérium külső membrán vezikulákat (outer membrane vesicle; OMV) képez, amelyek külső membránból, periplazmatikus fehérjékből, foszfolipidekből és LPS-ből állnak. Az OMV kölcsönhatásban lép a plazma membránban lévő lipidraftokkal, majd virulencia faktorokat (például OmpA) juttat a gazdasejt belsejébe, sejthalált okozva ezzel (Jin és mtsai, 2011). Továbbá képes antibiotikum rezisztencia gének (például *bla*_{OXA24-like}) horizontális transzferére is, melynek köszönhetően hozzájárul az antibiotikum rezisztencia terjedéséhez az *A. baumannii* törzsek között (Rumbo és mtsai, 2011).

A kórokozó nagy affinitású vasfelvételi rendszerrel rendelkezik, melyben a rendszert alkotó elemek a polimer vas-oxi-hidroxidokat szolubilis vaskelátokká (2,3-dihidroxi-benzoészav, DHBA) alakítják át. A DHBA rendszeren kívül az *A. baumannii* egy pirokatekin típusú siderofórral (acinetobactin) is rendelkezik (Braun, 2004). A vas által szabályozott külső membrán fehérjék siderofór receptorként működnek, melyek felismerik és megkötik a vas-

kelátokat (Braun, 2004). A fent bemutatott ismeretek ellenére még mindig nem teljesen tisztázott a fertőzés patogenezisében résztvevő virulencia faktoroknak a szerepe.

II.1.2. A nem fermentáló nozokomiális Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzések kezelése

Az empirikus terápia során hatásosak velük szemben az aminoglikozidok (amikacin, gentamicin, tobramycin), a karbapenemek (imipenem, meropenem), a fluorokinolonok (ciprofloxacín). A *P. aeruginosa* emellett érzékeny lehet még széles spektrumú penicillin származékokra és cefalosporinokra (ceftazidim, cefepim) (EUCAST, 2015).

A karbapenemek (imipenem, meropenem, doripenem) a széles spektrumú aktivitásuknak, valamint a β -laktamázokkal szembeni stabilitásuknak köszönhetően a legfontosabb antimikrobiális szerek az MDR *P. aeruginosa* és MDR *A. baumannii* által okozott súlyos fertőzések kezelésében (Khuntayaporn és mtsai, 2012). A fokozódó karbapenem használatával párhuzamosan megjelentek a karbapenem rezisztens *P. aeruginosa* és *A. baumannii* törzsek is. A karbapenem rezisztens törzsekkel szemben gyakran már csak a polymyxinek hatásosak. A helyzet súlyosságát jól mutatja, hogy egyre több régióban fordul elő pánrezisztens törzs, melyekkel szemben a polymyxinek sem nyújtanak már védelmet (Montero és mtsai, 2013; Moskowitz, 2012).

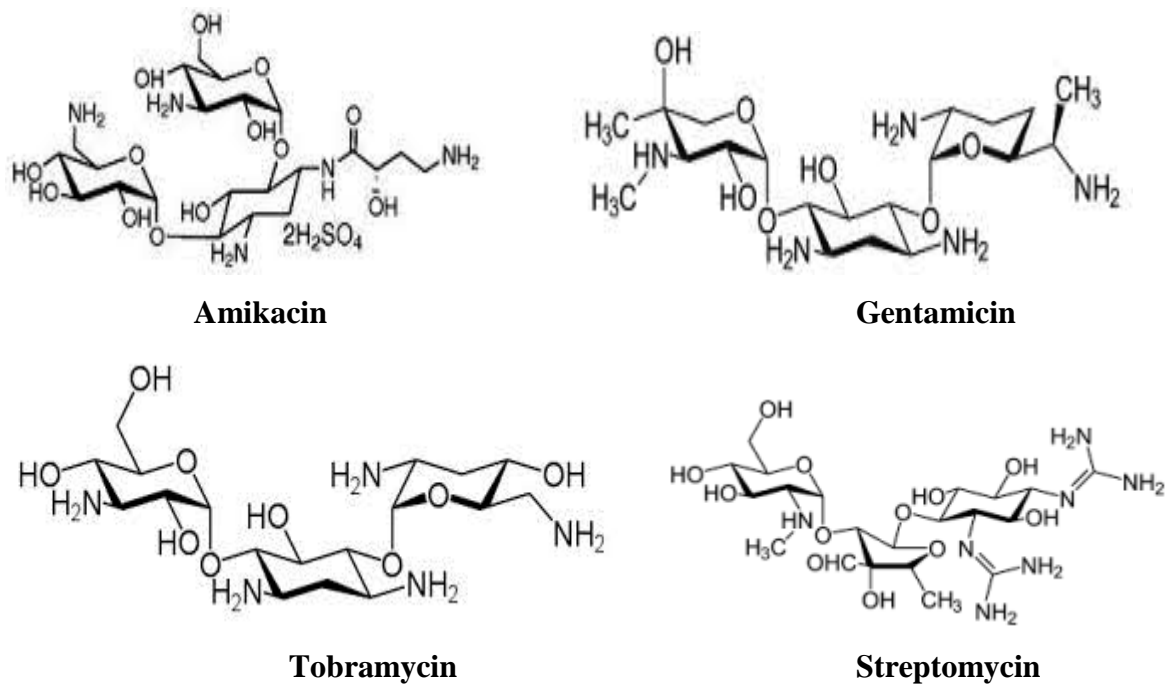
II.2. Az aminoglikozid antibiotikumok

II.2.1. Az aminoglikozidok kémiai szerkezete

Az első aminoglikozidot 1944-ben Schatz és Waksman fedezte fel, melyet a *Streptomyces griseus*-ból izoláltak (Schatz, 1944). Azonban a kialakult rezisztencia miatt megindult az aminoglikozidoknak a fejlesztése, és az 1970-es évek után sorra jelentek meg az újabbnál újabb természetesen előforduló aminoglikozidok és szemiszintetikus származékok (netilmicin, dibekacin, amikacin, kanamycin, gentamicin, tobramycin) (Brogden, 1976; Lode, 1972).

Az aminoglikozidok egy konzervált aminociklitol (ami leggyakrabban 2-deoxistreptamin) gyűrűből állnak, melyhez különböző aminocukrok kapcsolódnak a 2-deoxistreptamin hidroxil csoportjain keresztül. A glikozidos kötés elhelyezkedése alapján a klinikailag jelentős aminoglikozidok 4,6-diszubsztituált 2-deoxistreptamin csoportba tartoznak (amikacin, gentamicin, tobramycin, netilmicin, arbekacin). A streptomycin és spectinomycin annyiban tér el a többi aminoglikozidtól, hogy a streptomycin vázában centrálisan egy streptidin

molekula helyezkedik el, míg a spectinomycin nem tartalmaz aminocukrokat (1. ábra; Chittapragada, 2009).



1. ábra

Az aminoglikozidok kémiai szerkezete

II.2.2. Az aminoglikozidok hatásának mechanizmusa

A bakteriális sejtekbe való bejutás három lépésben valósul meg. A Gram-negatív baktériumok külső membránján történő áthaladásuk során, az erős poláros jellegüknek köszönhetően felbontják a szomszédos lipopoliszacharid molekulák közötti Mg^{2+} hidakat. Mivel a nagy molekula méretük miatt nem képesek a porin csatornákon keresztül átjutni, ezért a második lépés - a citoplazma membránon történő áthaladás - energia igényes folyamat. Ezt a sebesség meghatározó folyamatot gátolhatják a kétértékű kationok, hiperozmolaritás, az alacsony pH és az anaerob körülmények. A harmadik lépésben, ami szintén energiaigényes folyamat, a citoszolban a riboszóma 30S alegységéhez kötődve (16S rRNS) interferálnak a fehérjeszintézissel, mely során téves transzlációt okoznak és működésképtelen fehérjék képződnek. Ez a lépés a membrán károsodását is eredményezi, melynek következtében további aminoglikozidok jutnak be a bakteriális sejtekbe. A sejtekben megnövekedett aminoglikozid koncentráció, valamint a működésképtelen fehérjéknek a szintézise együttesen a baktérium pusztulásához vezetnek (Mingeot-Lelclercq, 1999). Baktericid hatásuk mellett

posztantibiotikus hatás is megfigyelhető. A sejtfalszintézist gátló antibiotikumok hatását potenciózzák.

Mind Gram-negatív, mind Gram-pozitív aerob és fakultatív anaerob baktériumok ellen hatásosak, mint *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Morganella spp.*, *Staphylococcus spp.* Gyengén hatnak a haemophilusokra, mycoplasmákra, *Serratia ssp.*-re (Vakulenko és mtsai, 2003). Mivel az aminoglikozidok csak aerob módon hatnak, ezért az anaerob baktériumok intrinszik rezisztenciával rendelkeznek velük szemben. A streptomycint és az amikacint másodvonalbeli antituberkulotikumként is alkalmazzák (Brossier, 2010).

Orálisan adva rosszul szívódnak fel, viszont jól abszorbeálódnak a hashártyáról, a pleuraürből, az ízületekből és a hámfosztott bőrről. Jól oszlanak meg az extracelluláris térben, kivéve az üvegtestet, a liquort, a légúti váladékokat és az epét. Glomerularis filtrációval választódnak ki a vesén keresztül. Valamennyi aminoglikozid nefrotoxikus (reverzibilisen), ototoxikus (irreverzibilisen) és neurotoxikus (Vakulenko, 2003; Prayle, 2009).

II.2.3. Az aminoglikozidokkal szembeni rezisztenciamechanizmusok

Az aminoglikozidokkal szembeni rezisztencia kialakulást többféle mechanizmus eredményezi: enzimatisz modifikáció, csökkent membrán permeabilitás, a 16S rRNS metilációja, a riboszomális proteinek, illetve a 16S rRNS mutációja, valamint az aktív efflux.

II.2.3.1. Enzimatisz modifikáció

Klinikai szempontból a legfontosabb rezisztenciamechanizmus az aminoglikozidok enzimatisz modifikációja. Az aminoglikozid modifikáló enzimeknek három típusa ismert: aminoglikozid acetiltranszferázok (AAC), aminoglikozid foszotranszferázok (APH) és az aminoglikozid nukleotidil-transzferázok (ANT). Ezek az enzimek egy funkciós csoport átvitelét katalizálják az aminoglikozidokban található amino- és hidroxil-csoportokra (acetiláció, foszforiláció, adeniláció), melynek eredményeképpen a target rRNS-hez történő kötődés elmarad (Shaw és mtsai, 1993).

Az acetiltranszferázok [AAC(1'); AAC(2'); AAC(3'); AAC(6')] az acetil-CoA-ból származó acetil-csoport átvitelét katalizálják az aminoglikozid amino-csoportjára (Houghton és mtsai, 2010; Tolmasky, 2007). A 6'-N-acetiltranszferáz IV. típusát (AAC (6')-Ib) mutatták ki legelőször baktériumban. Az enzimet kódoló *aac(6)-Ib* génhordozás gyakori *Pseudomonas ssp.*, *Acinetobacter ssp.* és Gram-negatív bélbaktériumok körében (Ramirez és mtsai, 2013; Cho és mtsai, 2009; Coelho és mtsai, 2012). Az *aac(6)-Ib* gén rezisztenciát biztosít a tobramycinnel, amikacinnal, netilmicinnel és sisomicinnel szemben (Shaw és mtsai, 1993), a

variánsa, az *aac(6)-Ib-cr* pedig - a piperazinil-csoport N-acetilézésével - ciprofloxacinnal és más fluorokinolonokkal szemben is (Park és mtsai, 2006). Az *aac(6)-Ib-cr* és az *aac(6)-Ib* két aminosav cserében tér el egymástól (Trp102Arg, illetve Asp179Tyr) (Robicsek és mtsai, 2006). Gyakran kinolon rezisztencia génekkal (*qnrA1*, *qnrB2*, *qnrB4*, *qnrB6*, *qnrB10*, *qnrS1*, *qnrS2*) vagy β -laktamáz génekkal (*bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-14}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{CTX-M-24}*, *bla_{DHA-1}*, *bla_{SHV-12}*) együtt fordul elő a különböző integronok vagy transzpozonok variábilis régiójában (Stravilehitz, 2009). A másik jelentős enzimescsoport az AAC(3')-I, melyek szűk rezisztencia spektrummal rendelkeznek (gentamicin, fortimicin), azonban szintén gyakran megtalálhatóak a Gram-negatív baktériumokban. Az AAC(3)-I enzimekkel ellentétben az AAC(3)-II enzimek már a gentamicin mellett, a tobramycinnal, dibekacinnal és netilmicinnel szemben is rezisztenciát biztosítanak (Wright, 1999). Hasonló rezisztencia profillal rendelkeznek az AAC(2')-I enzimek is. Előfordulhat, hogy a génkazetták között fúzió jön létre, ilyenkor többfunkciós enzimek jönnek létre. Ilyen esetről először 2002-ben számoltak be *P. aeruginosa*-nál, amikor is az I. típusú integronban lévő *aac(3')-Ib* és *aac(6')-Ib* géneknek a fúziója egy szélesebb rezisztencia spektrumot (gentamicin, fortimicin, amikacin, kanamycin, tobramycin, netilmicin, dibekacin) eredményezett (Dubois, 2002). Előfordulhat fúzió különböző funkciós csoporton ható enzimek esetében is, így a Gram-pozitív baktériumok körében elterjedt *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* bifunkciós enzim, amely a legtöbb klinikumban alkalmazott aminoglikoziddal szemben rezisztenciát biztosít. Ez a rezisztencia olyan nagymértékű, hogy más antibiotikumokkal mutatott szinergista hatása teljesen elvész (Smith és mtsai, 2014).

Az aminoglikozid foszfortranszferázok [APH (2''); APH(3'); , APH(3''); APH(4); APH(7''); APH (6) és APH (9)] az ATP foszfát csoportjának átvitelét katalizálják az aminoglikozid hidroxil-csoportjára (Wright, 1999). Az APH(3')-I és az APH(2'')-II foszforiláz enzimek a Gram-negatív kórokozókban fordulnak elő, az APH(3')-III enzimek pedig a Gram-pozitívokban, főleg a *S. aureus* és *E. faecalis* törzsek körében. Az APH(3)-VI foszfortranszferázok elsődlegesen az *Acinetobacter spp.* fordulnak elő és rezisztenciát biztosítanak az amikacinnal, kanamycinnal, neomycinnal, paromomycinnal és gentamicinnel szemben. Az APH(3''), APH(4) és APH(6) enzimek elsősorban az aminoglikozid termelő *Streptomyces* fajokban találhatóak meg, azonban klinikai jelentőségük jelenleg nincs (Vakulenko és Mobashery, 2003).

Az aminoglikozid nukleotidil-transzferázok [ANT(2''); ANT(3''); ANT(4'); ANT(6); ANT(9)] nukleotid átvitelét katalizálják, ATP jelenlétében adenilálják a szerek egyik hidroxil-csoportját. Klinikai szempontból az ANT(2'') és ANT(4') enzimek a legfontosabbak (Wright,

1999). Az ANT(2'')-I enzimek nem fermentáló Gram-negatív baktériumokban (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*), valamint a bélbaktériumokban fordulnak elő és a gentamicinnel, tobramycinnel, kanamycinnel, dibekacinnal és a sisomicinnel szemben biztosítanak rezisztenciát (Kotra, 2000; Shaw, 1993). Az ANT(4')-I nukleotidiltranszferázok elsősorban Gram-pozitív baktériumokban (*Staphylococcus ssp.*, *Enterococcus ssp.*, *Bacillus ssp.*) vannak jelen és az amikacinnal, tobramycinnel és dibekacinnal szemben biztosítanak rezisztenciát. A klinikai izolátumok körében nagyon gyakran kimutatható az ANT(3'')-I enzimeket kódoló *ant(3'')-I* gének, melyek a streptomycinnel és spectinomycinnel szemben eredményeznek rezisztenciát, azonban klinikai szempontból ezek is kevésbé relevánsak, mivel ezeket a szereket ma már ritkán alkalmazzák (Tolmasky, 2007; Vakulenko és Mobashery, 2003; Shaw, 1993).

Az aminoglikozid rezisztencia gének integronokon (*ant(2'')-Ia*; *aac(6')-Ib*), plazmidokon (*ant(4')-I*, *aac(3)-IIa*) vagy transzpozonokba (*ant(4')-Iib*) integrálva helyezkedhetnek el, ami a multirezisztencia gyors terjedését segíti elő fajokon belül, valamint különböző fajok között (Gallego és Towner, 2001; Sabtcheva, 2003; Schmitz, 1999).

II.2.3.2. 16S rRNS metilázok

Az aminoglikozid rezisztencia új mechanizmusaként leírt 16S rRNS metilázt (*armA*) 2002-ben először Lengyelországban találták meg egy *Citrobacter freundii* klinikai izolátumban (Szymański, nem publikált eredmény; génbanki azonosító AF 550415). Ezt követően 2003-ban már a *P. aeruginosa* és *K. pneumoniae* törzsekben is ki lehetett mutatni (Galimand és mtsai, 2003; Yokoyama és mtsai, 2003). A 16S rRNS G1405 szakaszának poszttranszkripcióos módosításával az *armA* által kódolt metiláz széles körű rezisztenciát biztosít a 4,6-diszubsztituált deoxistreptamin tartalmú aminoglikozidokkal (amikacin, gentamicin, tobramycin, kanamycin, netilmicin) szemben, viszont nem véd a streptomycinnel, neomycinnel és paromomycinnel szemben (Doi és Arakawa, 2007). Az *armA* gén egy Tn1548 transzpozonon található, ezért a horizontális géntranszfer révén gyorsan disszeminálódik (Bogaerts és mtsai, 2007). Később további öt új 16S rRNS metilázt kódoló gént fedeztek fel a Gram-negatív baktériumok körében. Az *rmtB*-t Japánban a *Serratia marcescens*-ben írták le, mely 82%-os aminosav szekvencia azonosságot mutat *rmtA*-val, melyet szintén Japánban írtak le (Yokoyama és mtsai, 2003). Ez a gén egy nagyméretű, transzferábilis plazmidon lévő T3-szerű transzpozonon található (Doi és Arakawa, 2007). Az *rmtC* metilázt a *P. mirabilis* klinikai törzsben mutatták ki. Az *rmtD* génhordozás igen jelentős a *P. aeruginosa* izolátumok körében (Doi és Arakawa 2007). A metilázokat kódoló gének nagyon gyakran fordulnak elő a

β -laktamáz kódoló génekkel együtt, mint például *bla_{CTX-M}*, *bla_{SPM-1}*, *bla_{SHV}* (Samuelsen és mtsai, 2011; Hopkins és mtsai, 2010).

A horizontális géntranszfer révén gyorsan disszeminálódnak ezek a gének a különböző baktérium fajok körében (*Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter ssp.*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*) Nyugat- és Kelet-Európában.

II.2.3.3. Nem enzimikus mechanizmuson alapuló rezisztencia

Az effluxon alapuló rezisztencia leggyakrabban nem fermentáló baktériumok esetén fordul elő (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*). Az efflux pumpák öt fő csoportját különböztetjük meg: MFS (major facilitator superfamily), az SMR (small multidrug resistance), ABC (ATP binding cassette), a MATE (multi-drug and toxic compound extrusion) és az RND (resistance-nodulation-division) (Sun és mtsai, 2014). A Gram-negatív nem fermentáló baktériumok körében az RND rendszer a felelős leggyakrabban a multidrug rezisztencia kialakításáért. Egyes pumpák porinokkal komplexet alkotva fejtik ki hatásukat (Fernando és Kumar, 2013).

Az aminoglikozidokkal szembeni rezisztencia kialakításában *P. aeruginosa* esetében fontos szerepe van a MexXY-OprM pumpa túltermelésének, mely a *mexXY* gén fokozott expressziója révén valósul meg. Ennek a génnek az expresszióját indukálja az aminoglikozid használat, amelynek eredményeképpen nem csak az aminoglikozidok, hanem más antibiotikumok, mint például a III. és IV. generációs cefalosporinok (cefotaxim, cefepim), a fluorokinolonok (levofloxacin, ciprofloxacin), tetracyclinek, valamint karbapenemek is kipumpálódnak, ezáltal a velük szembeni rezisztencia is fokozódhat (Poonsuk K, 2013). Az *E. coli* esetében a rezisztenciáért az AcrD transzporter a felelős. Az efflux fehérjét kódoló *acrD* gén a *mexXY* génhez hasonlóan, rezisztenciát alakít ki amikacinnal, gentamicinnel, tobramycinnel, kanamycinnel és streptomycinnel szemben (Rosenberg és mtsai, 2000; Shidu, 2012). A *P. aeruginosa* esetében további négy olyan gént találtak még (*nuoG*, *rplY*, *mexZ*, *galU*), amelyeknek a funkcionális zavara következtében fokozódott az aminoglikozidokkal szembeni rezisztencia. Az *rplY* gén által kódolt L25 riboszómális fehérje a riboszómális transzlációt biztosítja stressz hatása alatt. Az *rplY* gén inaktiválódása az MexXY-OprM efflux rendszer expresszióját kis mértékben fokozta (El'Garch, 2007; Poonsuk K, 2013).

Az UDP-glükóz pirofoszforilázt (a glükóz-1- foszfát átalakulását katalizálja UDP-glükózzá, amely nélkülözhetetlen a teljes LPS külső magjának szintéziséhez) kódoló *galU* génnek az inaktivációja magas szintű rezisztenciát eredményezett az amikacinnal, gentamicinnel, tobramycinnel, netilmicinnel és kanamycinnel szemben. A *nuoG* gén csendesítése csökkent

aktív transzportozhoz vezetett, ezáltal fokozódott az aminoglikozidokkal szembeni rezisztencia (El'Garch, 2007).

A *M. tuberculosis* esetében a streptomycinnel szembeni rezisztencia az S12 riboszómális fehérjében bekövetkező vagy a 16S rRNS primer szerkezetének megváltozását eredményező mutációval magyarázható (Finken, 1993). A *Salmonella Typhimurium* esetében az S4 riboszómális fehérjében bekövetkező mutáció ad streptomycin rezisztenciát (Maisnier-Patin, 2002).

II.3. A karbapenem antibiotikumok

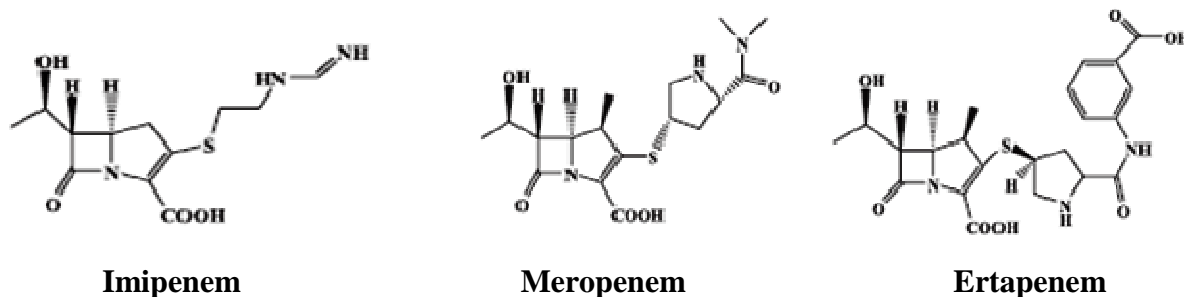
II.3.1. A karbapenemek kémiai szerkezete

Az 1960-as évek végén megjelenő bakteriális β -laktamázok a penicillin hatékonyságát fenyegették, ezért megindult a β -laktamázokkal szembeni inhibitoroknak a keresése. Az első β -laktamáz inhibitor 1976-ban Brown és munkatársai fedezték fel, mely a *Streptomyces olivaceus* által termelt olivánsav volt (Brown, 1976). A kémiai instabilitása, valamint a baktérium sejtekbe való gyenge penetrációja miatt alkalmatlan volt terápiás célra (Brown, 1976). Később további két másik β -laktamáz inhibitor sikerült azonosítani, a klavulánsavat (*Streptomyces clavuligerus*) és a tienamycint (*Streptomyces cattleya*), melyek közül az utóbbi a mai karbapenem antibiotikumok analógiájul szolgáló vegyület.

A karbapenemek (imipenem, meropenem, ertapenem és doripenem) β -laktám típusú antibiotikumok, ezért az alapvázuk hasonlít a penicillinekéhez, 4 vagy 5 kondezált β -laktám gyűrűből állnak, melyben a penicillinek kén atomját szén helyettesíti a C-1 pozícióban, ami a karbapenemek széles spektrumáért, valamint a β -laktamázokkal szembeni stabilitásért felel. A C-2 és C-3 között egy kettős kötés található. A tienamycin hidroxietil oldalláncának sztereokémiája határozza meg a karbapenemek aktivitását, emiatt más β -laktámokkal összehasonlítva egyedinek számítanak (Papp-Wallace KM, 2011).

Az ertapenem szerkezete annyiban tér el az imipenemétől és a meropenemétől, hogy egy meta-helyzetű benzoésav szubsztituens tartalmaz (2. ábra). Ez a szubsztituens kritikus szerepet játszik a farmakológiai és antibakteriális hatás kialakításában: az aromás gyűrű növeli az ertapenem molekulásúlyát, lipofilitását, emellett egy további karbonsav csoporttal is rendelkezik. Farmakológiai szempontból ez magas plazma-fehérjekötődést és hosszabb plazma felezési időt eredményez, ami lehetővé teszi a napi egyszeri terápiás dózisban való alkalmazását. Az antibakteriális hatását tekintve kevésbé hatékony, mint az imipenem és a meropenem, mivel a periplazmatikus térben a koncentrációja jóval alacsonyabb. Ennek az egyik magyarázata az lehet, hogy az ertapenem anionos jellege miatt a specifikus porin

(OprD) által képzett csatornán keresztül nehezebben jut be a periplazmatikus térbe. A másik magyarázata pedig az lehet, hogy az ertapenem jobb szubsztrátként funkcionál az efflux pumpák számára (Hammond, 2004).



2. ábra

A karbapenemek kémiai szerkezete

II.3.2. A karbapenemek hatásának mechanizmusa

A karbapenemek a bakteriális sejtfal szintézisét gátolják azért, hogy egy vagy több különböző penicillin-kötő proteinhez (penicillin binding protein, PBP) kötődnek, melyek a transzpeptidációért felelősek (transzglykoláz, transzpeptidáz, karboxipeptidáz) a peptidoglikán szintézise során. Mivel a karbapenemek nehezen diffundálnak át a bakteriális sejtfalon, ezért a külső membrán fehérjék által alkotott csatornákon keresztül (outer membrane proteins, OMP) - más néven porinok - jutnak be a baktériumokba (Martinez L, 2008). A porinok két strukturális tulajdonsággal jellemezhetőek. A pozitív töltésű bázikus létra utat biztosít a negatív töltésű vegyületek számára az általa képzett csatorna mentén, míg a periplazmatikus tér végén található negatív töltésű zseb pozitív töltésű szubsztrátok kötődését teszi lehetővé. Ennek a szerkezetnek köszönhetően képesek a baktériumok a bázikus aminosavak felvételére (arginin, hisztidin, lizin és ornitin) (Catel-Ferreira, 2012). A karbapenemek a periplazmatikus térbe kerülve irreverzibilisen acilálják a PBP-ket, gátolva ezzel a transzpeptidációt, valamint a peptid oldalláncok közötti keresztkötések kialakulását. A sejtfalszintézis egy dinamikus folyamat, mely során a képződés és az autólízis egyszerre zajlik. Amikor a PBP-k gátlódnak, akkor az autólízis folytatódik, ami a peptidoglikán szerkezetének meggyengüléséhez vezet és az ozmotikus nyomás következtében a sejtek szétesnek (Papp-Wallace KM, 2011).

A többi β -laktámmal ellentétben a karbapenemek posztantibiotikus hatással rendelkeznek és széles spektrumúak, a legtöbb β -laktamáznak ellenállnak (Nadler és mtsai, 1989). Szinergista hatást mutatnak aminoglikozidokkal kombinálva (Tamma és mtsai, 2012). Korábban hatásosak voltak a legtöbb Gram-pozitív és Gram-negatív aerob és anaerob baktériummal (kivéve *Stenotrophomonas maltophilia*, *Clostridium difficile*, mycoplasmák, chlamydiák,

rickettsiák, bartonellák) szemben, azonban a szerzett rezisztencia terjedése korlátozza a használatukat. Mára már hatástalanokká váltak az MRSA-val, multirezisztens *P. aeruginosa*-val, XDR és pánrezisztens *A. baumannii*-val, valamint *E. faecium*-mal szemben (Gales és mtsai, 2003; Gupta és mtsai, 2011; Falagas és mtsai, 2014; Higgins és mtsai, 2010). Mivel a gasztrointestinális membránokon nem tudnak átjutni, ezért intravénásan (imipenem-cilastatin, meropenem) vagy intramusculárisan (ertapenem) kell őket alkalmazni a terápiák során (Nix D, 2004; Rodloff, 2006). Az imipenemet a vese dehidropeptidáza lebontja, ezért az ezt gátló cilastatinnal kombinálják, hogy az emberi szervezetben biztosítsák a stabilitását (Nilsson és mtsai, 1991). A Gram-negatív baktériumok által okozott meningitis kezelésében a meropenem bizonyul hatásosnak, mivel képes a gyulladt meninxeken keresztül bejutni a liquorba. További tulajdonságaik közé tartozik, hogy az ertapenemmel szemben a fehérje kötődésük kicsi, szövetekben, testfolyadékokban jól oszlanak meg. Kiválasztódásuk a vesén keresztül, glomerularis filtrációval történik (Zhanel és mtsai, 2007).

II.3.3. A karbapenemekkel szembeni rezisztenciamechanizmusok

A karbapenemekkel szembeni rezisztenciamechanizmusok háttérében a β -laktamáz termelés, a porinok vagy a PBP-k megváltozása, valamint az efflux pumpák működése állhat. Ezek a mechanizmusok önmagukban vagy ezek kombinációi magas szintű rezisztenciát eredményeznek a karbapenemekkel szemben bizonyos baktériumfajok esetében, mint például *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* (Limansky, 2002; Menna, 2006; Rodriguez-Martinez, 2009).

II.3.3.1. β -laktamáz termelésen alapuló rezisztencia

Az Ambler-féle rendszer alapján a β -laktamázok négy filogenetikai csoportját különböztetjük meg (A, B, C, D). Az „A” csoportba (TEM, SHV, KPC, GES) a penicillináz aktivitással rendelkező enzimek tartoznak. A „B” csoportot a metallo- β -laktamázok (VIM, IMP, NDM), a „C” csoportot az AmpC típusú cefalosporinázok (AmpC, CMY, ACC, MOX, LAT), és a „D” csoportot az oxacillinázok (OXA-23, OXA-24, OXA-40, OXA-48, OXA-51, OXA-55, OXA-58) alkotják (Ambler, 1991). Karbapenemáz aktivitással az „A”, „B” és „D” csoportok tagjai rendelkeznek.

A plazmidon kódolt KPC típusú (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) karbapenemázok gyakran fordulnak elő a *K. pneumoniae* izolátumok körében (Mathers, 2011). Ezek az enzimek széles szubsztrát spektrummal rendelkeznek (karbapenem, oximino-cefalosporinok, cefamycinek), ezért a karbapenemek mellett rezisztenciát biztosítanak még az összes penicillinnel és cefalosporinnal szemben is (Papp-Wallace, 2010).

A GES enzimek a KPC enzimekhez hasonlóan szintén az Ambler „A” csoportba tartoznak és plazmidon hordozott integronon kódoltak. Ez alól kivételt képez az *E. coli*-ban található, kromoszómálisan kódolt GES-7 enzim. A *P. aeruginosa* GES-2 típusú karbapenemázt termel, mely a GES-1-ből pontmutációval képződött. A 69. és 238. pozícióban cisztein gyököket tartalmaznak, aminek eredményeképpen diszulfid hidakat képeznek és nagy affinitással hidrolizálják az imipenemet és meropenemet (Raquet, 1997). Béta-laktám inhibitorokkal nem gátolhatóak.

A metallo- β -laktamázok abban térnek el a többi β -laktamáztól, hogy Zn^{2+} ionokat használnak a β -laktámok inaktiváláshoz, míg az „A”, „C” és „D” csoport tagjainak aktív centruma szerint tartalmaz. A karbapenemekkel szembeni rezisztencia kialakításában fontos szerepe van az IMP, VIM, és az NDM enzimeknek. Az őket kódoló gének integronon (IMP, VIM) és plazmidon (NDM) helyezkedhetnek el. Széles szubsztrát spektrummal rendelkeznek és karbapenemek mellett szinte minden β -laktámot képesek bontani. Klavulánsavval, sulbactammal és tazobactammal nem gátolhatóak, viszont EDTA-val (etilén diamin tetraecetsav) igen (Bush, 2010; Haruta, 2000). Az IMP-1-et és a VIM-1-et *P. aeruginosa*-ban detektálták először (Watanabe, 1991; Lauretti, 1999), azonban ma már nagyon elterjedtek Európában és számos faj termeli ezeket (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter*, *E. coli*, *S. marcescens*, *S. flexneri* stb.)

Az NDM termelő törzsek a klinikumban használt összes antibiotikummal szemben rezisztensek, kivételt képez a tigecyclin és colistin.

A „D” csoport legfontosabb és a legnagyobb alcsoportját (2df) karbapenem-hidrolizáló β -laktamáz (carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases, CHDL) enzimek alkotják. Az aminosav homológia alapján három csoportba lehet őket sorolni: OXA-23, OXA-24 és OXA-58. Jellemzőségük, hogy az imipenem és meropenem mellett bontani képesek a többi β -laktamáz számára hozzáférhetetlen oxacillint is (Bush, 1998), de az aztreonamot nem. *In vitro* gyengén gátolhatóak klavulánsavval és EDTA-val. Ezek főleg az *A. baumannii*-ra és a *P. aeruginosa*-ra jellemző enzimek, melyek legtöbbször plazmidon kódoltak. Az OXA-51 intrinszik, kromoszómálisan kódolt enzim az *A. baumannii* esetében, ami nem mindig expresszálódik (Turton, 2006). Az OXA-51 enzimek a többi felsorolt enzimmel ellentétben gyengébben hidrolizálják karbapenemeket. A karbapenem rezisztencia csak akkor hozható összefüggésbe az OXA enzimeket kódoló géneknek a hordozásával (*bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}), ha tőlük 5' irányban ISAbA (1, 2, 3) inzerciós szekvencia van jelen, mely promoterként működik (Turton, 2006).

II.3.3.2. Megváltozott porin és penicillinkötő protein termelésén alapuló rezisztencia

A PBP fehérjében bekövetkező mutáció, vagy a PBP transzkripciójának csökkenése karbapenem rezisztenciához vezethet (Giske, 2008). A *P. aeruginosa* esetében magas szintű imipenem és meropenem rezisztencia figyelhető meg, ha az OprD mRNS szintje csökken és az OprD strukturális génjén belül mutáció (nukleotid inzerció vagy deléción) alakul ki. Ennek eredményeképpen kereteltolódás vagy translációs stop jön létre, ami OprD inaktiválódásához és egyidejű elvesztéshez vezet a külső membránban. Ez azt jelenti, hogy a karbapenem nem lesz képes bejutni a periplazmatikus térbe az OprD hiánya miatt (El Amin, 2005; Xavier és mtsai, 2010). Az OprD szerepe még nem teljesen tisztázott a karbapenemmel szembeni rezisztencia kialakításában, ugyanis egy új tanulmány szerint az OprD deficiencia bár megemeli a minimális gátló koncentráció értékét, nem mindig vezet klinikai rezisztenciához (Ocampo-Sosa, 2012).

Az *A. baumannii* esetében egy karbapenem-asszociált OMP, más néven CarO protein, elvesztése eredményez karbapenem rezisztenciát, hasonló módon az OprD-hez. A külső membránban a CarO expressziójának megváltozása csökkenti az imipenem penetrációját a baktérium sejtekbe. A meropenemmel szembeni rezisztencia hátterében viszont a CarO-n lévő meropenem-kötőhelynek az elvesztése áll (Catel-Ferreira, 2011). Az *A. baumannii* a CarO protein mellett rendelkezik még egy *Pseudomonas*-ra is jellemző OprQ-szerű fehérjével is, ami OprD-vel homológ szerkezetű, de antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát nem alakít ki, azonban a Fe^{3+} -nak és Mg^{2+} -nak a felvételét biztosítja stressz állapotban (Catel-Ferreira, 2012).

II.3.3.3. Effluxon alapuló rezisztencia

A MexEF-OprN efflux pumpa rendszer a *P. aeruginosa* genomjában található, mely rezisztenciát biztosít a fluorokinolonokkal, klóramfenikollal és a karbapenemmel (imipenem) szemben is, emellett negatívan befolyásolja a kórokozó virulenciáját, mert ezt a pumpát expresszáló nfxC mutáns törzsek kevesebb extracelluláris virulencia faktort (piocianin, elasztáz, rhamnolipidek) termelnek (Khöler és mtsai, 2001). Ennek az a magyarázata, hogy a MexEF-OprN efflux pumpa túltermelésének eredményeképpen jóval kevesebb 3-oxo-C12-homoszerin lakton szekretálódik, amely *quorum sensing* szignálként működve fokozza a virulenciafaktorok expresszióját (Evans és mtsai, 1998). Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mértékét a *mexEF-oprN* operon transzkripciójának mértéke határozza meg (Köhler, 2001).

A legszélesebb szubsztrát spektrummal a MexAB-OprM efflux pumpa rendszer rendelkezik, mely a fent említett antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mellett a karbenicillinnel, ceftazidimmal, moxalaktámmal, aztreonammal, meropenemmel, fertőtlenítőszerekkel és dezinficienssekkel szemben is rezisztenciát biztosít (Masuda és mtsai, 2000). A *mexAB-oprM* operon jelentősen hozzájárul a *P. aeruginosa* antibiotikumokkal szembeni intrinszik rezisztenciájához (Khöler és mtsai, 2001). A MexCD-OprJ és a MexAB-OprM efflux pumpa rendszerek képesek a novobiocint, cefsulodint és a flomoxefet is kipumpálni a baktérium sejtekből (Masuda és mtsai, 2000).

Az *A. baumannii*-ban egy kromoszómálisan kódolt, efflux pumpa Ade-ABC található, mely képes eltávolítani az aminoglikozidokat, fluorokinolonokat, tetracyclineket, klóramfenikol, erythromycint, trimetoprimot, netilmicint és a meropenemet a baktérium sejtéből. A pumpa expresszióját az *adeRS* gén szabályozza (Wieczorek, 2008). A szerzett OXA típusú karbapenemázok és az Ade-ABC közötti szinergista hatás eredményeként magas szintű rezisztencia alakul ki a β -laktámokkal szemben, beleértve a karbapenemeket is (Lee, 2010). Az Ade-ABC és az Ade-FGH efflux pumpa rendszerek fontos szerepet játszanak a szerzett antibiotikum rezisztenciában (Coyne és mtsai, 2011), míg a harmadik Ade-IJK pumpa az intrinszik rezisztencia kialakításáért felelős (Damier-Piolle és mtsai, 2008). Az Ade-FGH pumpa rezisztenciát biztosít a fluorokinolonok, klóramfenikol, tetracyclinek, trimetoprim mellett még a clindamycinnel, tigecyclinnel, szulfonamidokkal szemben, míg Ade-IJK egyes β -laktámokkal, erythromycinnel, fuzidinsavval, novobiocinnal szemben (Damier-Piolle és mtsai, 2008; Coyne és mtsai, 2011).

II. 4. Az integronok felépítése és szerepük a rezisztenciában

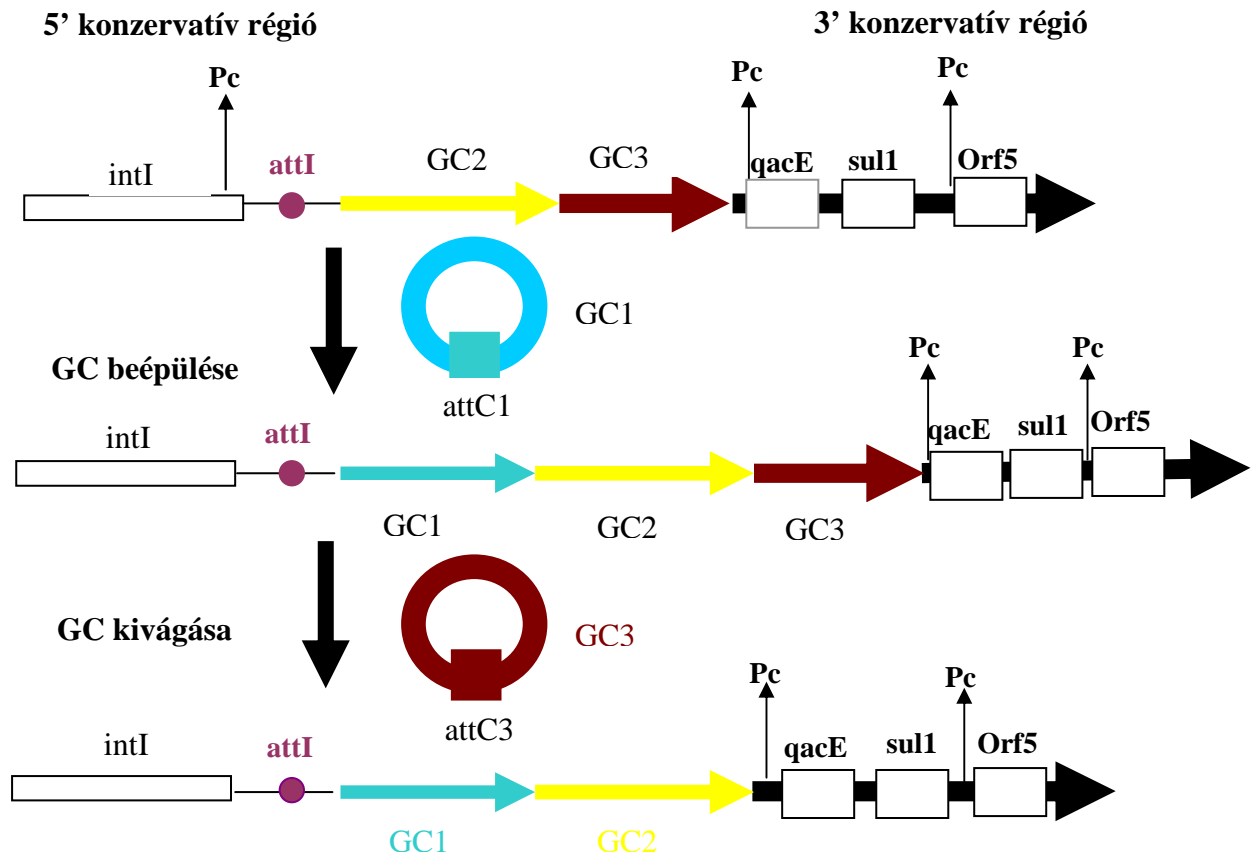
Az antibiotikumokkal szembeni szerzett rezisztenciát kódoló elemek leggyakrabban - a plazmidok és transzpozonok mellett - az integronok. Az integronhordozás főleg a Gram-negatív baktériumok (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Shigella sonnei*, *Salmonella*, *Vibrio*) körében terjedt el. Az 1986-ban azonosított, látszólag független rezisztencia gének szekvenciái első hírnökei voltak az integronoknak, mivel a különböző antibiotikum rezisztencia génektől 5' és 3' irányban közös régiókat fedeztek fel. Ezek a régiók megtalálhatóak voltak a különféle plazmidok eltérő részeiben, ami arra utalt, hogy a transzpozonokhoz hasonlóan ezek az elemek is mobilisak. Azonban két fontos tulajdonságban mégis eltérnek egymástól: a transzpozonok végén direkt és indirek módon ismétlődő szekvenciák vannak, míg az új elemekben a rezisztencia géneket körülvevő régió nem ismétlődött és hely-specifikus integráz gént tartalmazott. Ezen különbségek miatt nem a

transzpozonok csoportjához sorolták be őket, hanem 1998-ban Hall és Collis integronokként definiálták ezeket a mobilis genetikai elemeket. Az integronok önmaguk transzpozíciójára nem képesek genetikai elemek, azonban hely-specifikus rekombinációval mozgásra képesek, (rezisztencia) géneket tartalmazó génkazettákat tudnak befogni és expresszálni (Collis és Hall, 1998). Az integronok két fő csoportja különíthető el: a rezisztencia integronok (resistance integrons, RI) és a szuperintegronok (superintegrons, SI). A rezisztencia integronok az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakításáért felelős géneket tartalmaznak a génkazettáikon és kromoszómálisan, transzpozonon vagy plazmidon kódoltak. Ezzel ellentétben a szuperintegronok virulenciával összefüggő, illetve metabolikus folyamatokat szabályozó géneket tartalmaznak és mindig kromoszómálisan kódoltak. A rezisztencia integronoknak - felépítésük és integráz enzimük alapján - három típusát különböztetjük meg: I., II. és III. osztályú integronok léteznek (Fluit és Schmitz, 2004).

Az I. típusú integronok szerkezetét tekintve 5' és 3' konzervatív régiókból épülnek fel, melyek között található a variábilis régió, ahol a rezisztencia géneket tartalmazó génkazetták helyezkednek el (3. ábra). A génkazetták nemcsak integronba épülve fordulnak elő, hanem szabadon, cirkuláris formában is megtalálhatóak. A génkazetták egy promóter nélküli kódoló szekvenciából állnak, melyet egy 59 bázispárból álló elem, más néven *attC* rekombinációs hely követ és könnyen cserélődnek integronok között. Az expressziójukért az integron 5' konzervatív régiójában lévő promóter a felelős (Pc). Ebben a régióban egy másik promóter is jelen van, azonban ez legtöbbször inaktív. A promóterek mellett található az integráz enzimet kódoló *intI* gén, valamint a specifikus rekombinációs hely *attI*. Az integron 3' konzervatív régiója kvaterner ammónium vegyületekkel szembeni és szulfonamidokkal szembeni rezisztenciát kódoló gének (*ΔqacE sull*) mellett további két promótert, és egy ismeretlen funkciójú orf5-öt tartalmaz (Fluit és Schmitz, 2004). Az I. típusú integron génkazettáiban lévő rezisztencia gének közül leggyakrabban az aminoglikozid rezisztenciát kódoló *aac(6)-Ib*, *ant(3'')-Ia*, illetve a β-laktamáz kódoló *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{OXA}* gének fordulnak elő (Ramírez és mtsai, 2010).

A II. típusú integronok szerkezete hasonlít az I. típusú integronokéhoz, mivel tartalmaznak egy integráz enzimet kódoló gént (*intI2*) az 5' konzervatív régióban és génkazettákat a variábilis régióban. Az *intI2* génben egy belső stop kodon található, melynek eredményeképpen funkcióképtelen. A II. típusú integronok Tn7 transzpozonba ágyazódva találhatóak. A génkazettákban hordozott leggyakoribb rezisztencia gének az aminoglikozid rezisztenciát kódoló *ant(2'')-Ia*, az klóramfenikol rezisztenciát kódoló *catB2*, trimetoprim rezisztenciát kódoló *dhfrA1*, streptomycin és spectinomycin rezisztenciát kódoló *ant(3'')-Ia*,

valamint a streptotricin rezisztenciát kódoló *sat2* (Ramírez és mtsai, 2010). Azonban a II. típusú integronokban előfordulhat egy *orfX* feltételezett génkazetta is (*ybeA* génnek felel meg), ami egy csonka *attI2* helyet hordoz (Partridge és mtsai, 2009; Ramírez és mtsai, 2010).



3. ábra

Az integron általános felépítése és a génkazetta integronba történő rekombinációjának mechanizmusa

intI: integrázt kódoló gén, **PC:** promoter régiók, **attI:** integronban lévő rekombinációs hely, **attC:** génkazettában lévő rekombinációs hely, **GC:** génkazetta

III. Célkitűzések

A munkánk során célunk volt a karbapenemek és aminoglikozidok fogyása, az antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztencia és a rezisztens törzsek előfordulása közötti összefüggések vizsgálata a Debreceni Egyetem, különböző intenzív osztályain a *Pseudomonas aeruginosa* és *Acinetobacter baumannii* által okozott fertőzések esetében.

1. Az aminoglikozid rezisztenciamechanizmusok genetikai hátterének vizsgálata *P. aeruginosa* és *A. baumannii* izolátumok körében.
2. A karbapenem rezisztenciamechanizmusok genetikai hátterének vizsgálata *A. baumannii* izolátumok körében.
3. Az integronok hordozása és a rezisztencia közötti összefüggés vizsgálata.
4. Az izolátumok genetikai rokonságának analízise pulzáló mezejű gélelektroforézissel (pulse field gel electrophoresis, PFGE).
5. A rezisztencia gének és a klonalitás közötti összefüggés vizsgálata.
6. Az Egyetem Klinikáin felhasznált karbapenem antibiotikumok és az *A. baumannii* klónok karbapenem rezisztenciája közötti összefüggés vizsgálata.
7. A Tüdőklinikán felhasznált aminoglikozid antibiotikumok és *P. aeruginosa* klónok aminoglikozid rezisztenciája közötti összefüggés vizsgálata.

IV. Anyagok és módszerek

IV.1. Izolátumok

IV.1.1. *Pseudomonas aeruginosa* izolátumok

A vizsgálatba bevont *P. aeruginosa* izolátumok a Debreceni Egyetem Tüdőklinikájáról származtak. Az intenzív terápiás osztály (ITO) egy újonnan kialakított 5 ágyas fekvőbeteg osztály, mely tercier gondozási központként működik a Klinikán. A betegek leggyakrabban légzési elégtelenséggel vagy tüdőgyulladással kerültek felvételre, és a leggyakoribb alapbetegségük a végstádiumú tüdőrák vagy krónikus obstruktív tüdőbetegség (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) volt. Összesen 95 *Pseudomonas aeruginosa* izolátumot gyűjtöttünk össze 2008 decembere és 2010 februárja között, melynek nagy része (87/95) az intenzív osztályról származott 28 betegtől, a maradék (11/95) a klinika más fekvőbeteg osztályairól vagy szakrendeléseiről (onkológia, tüdőgyógyászat és rehabilitáció). Az izolátumok többsége alsó légúti mintákból tenyésztett ki (bronchusmosó folyadék, trachealis aspirátum, köpet). A kórokozó csíraszám 10^2 és $>10^5$ telepképző egység (Colony Forming Unit, CFU)/ml között változott. Mindezek mellett három olyan izolátum volt, amely felső légúti mintából tenyésztett ki, másik három intravénás kanülből és egy pedig pleurális folyadékból. A *P. aeruginosa* izolátumok esetében a fajazonosságot *P. aeruginosa* specifikus PCR-rel igazoltuk (Spilker és mtsai, 2004), valamint a biokémiai tulajdonságai alapján (citrát+; oxidáz+; fermentáció-; pigmenttermelés, hemolízis) identifikáltuk. Az izolátumokat -20°C -on glicerines bouillonban tároltuk. A *P. aeruginosa* mellett *A. baumannii*, ESBL-termelő illetve ESBL-negatív *K. pneumoniae* is kitenyésztett. Igen gyakori volt a gombával (*Candida glabrata*) történő kolonizáció is. (Az izolátumok gyűjtését társszerzőim végezték.)

IV.1.2. *Acinetobacter baumannii* izolátumok

A Debreceni Egyetem Klinikáiról összesen 160 *A. baumannii* izolátumot gyűjtöttünk össze 2010 novembere és 2011 májusa között. Az izolátumok döntő többsége (135/160) különböző intenzív osztályokról származtak. A legtöbb izolátum bronchus, vér, kanül, seb és tubus mintákból tenyésztett ki. Az izolátumok gyűjtése véletlenszerűen történt: a vizsgálat időtartama alatt a Klinikán kitenyésztett összes *A. baumannii* izolátum 31,9%-át vizsgáltuk, ami az *A. baumannii*-val fertőzött betegek 46,9%-ának felelt meg. Az *A. baumannii* izolátumok esetében a verifikálás MALDI Biotyper (mátrix asszisztált lézer

deszorpció/ionizáció, matrix-assisted laser desorption/ionization; Bruker) készülékekkel történt. Az izolátumokat -20°C-on glicerines bouillonban tároltuk.

IV.2. Az antibiotikum érzékenység meghatározása

A rutin tenyésztés során elvégzett antibiotikum érzékenységi vizsgálatok adatai rendelkezésünkre álltak. A rezisztenciavizsgálatot Kirby-Bauer-féle korongdiffúziós módszerrel, a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) aktuális évi ajánlása alapján végezték és interpretálták az alábbi antibiotikumokkal szemben: imipenem, meropenem, piperacillin+tazobactam, ceftazidim, cefepim, ciprofloxacín, amikacin, gentamicin és tobramycin (*P. aeruginosa*). Az *A. baumannii* esetében a fent említett antibiotikumok mellett a colistin, sulfametoxazol+trimetoprim kombinációt, doxycyclint és a tigecyclint is vizsgálták.

IV.3. DNS izolálása

A DNS izolálása és tisztítása 98°C-os 15 perces hőkezeléssel történt. A DNS izolálásához a 24 órás tenyészetből egy kacsnyi mennyiséget 200 µl TE pufferben (100 mM Tris, 10 mM EDTA) elszuszpendáltunk, majd 15 percig 98°C-on hőkezeltük. Centrifugálással nyert (1 percig 11000 rpm-en) felülúszót, tízszeres hígításban használtuk templánként a polimeráz láncreakcióban (polymerase chain reaction, PCR).

IV.4. A vizsgált gének

A PCR-k során a reakcióelegyek össztérfogat 25 µl volt, amely az alábbi összetevőket tartalmazta: 10x enzimspecifikus puffer, 1,5-10 mM MgCl₂, 10µM dNTP, 10-10 µM primer, 0,5 U Taq polimeráz (Fermentas, Vilnius, Litvánia) és 50-100 ng templát. Az amplifikáció során az alábbi hőprofilokat alkalmaztuk: denaturáció 1 perc 95°C-on, annealáció 30-120 másodperc primertől függően, szintézis másfél perc 72°C-on.

IV.4.1. Aminoglikozid rezisztencia gének vizsgálata *P. aeruginosa* és *A. baumannii* izolátumok körében

A *P. aeruginosa* izolátumok körében három [*aac(6')-Ib*, *aac(3'')-Ia*, *ant(2')-IIa*], míg az *A. baumannii* izolátumok esetében hat [*aac(6')-Ib*, *aac(3'')-Ia*, *ant(2')-IIa*, *ant(3'')-Ia*, *aph(3')-Ia*, *aph(3')-VIa*] aminoglikozid modifikáló enzimet kódoló gén jelenlétét vizsgáltuk. Emellett mindkét faj esetében három, 16S rRNS metiláz kódoló gén *ArmA*, *rmtA*, *rmtB*, vizsgálatára is sor került. A keresett gének kimutatásához felhasznált oligonukleotid primerek szekvenciáit, valamint az alkalmazott hőprofilokat az 1. táblázat tartalmazza.

IV.4.2. Karbapenem rezisztencia gének vizsgálata *A. baumannii* izolátumok körében

A karbapenem-hidrolizáló oxacillinázokat (Ambler „D” csoport) kódoló gének közül öt *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24-like}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like} kimutatására került sor az *A. baumannii* izolátumok körében. Mindezek mellett vizsgáltuk az *ISAb_a-I* inzerációs szekvencia jelenlétét is. A keresett gének kimutatásához felhasznált oligonukleotid primerek szekvenciáit, valamint az alkalmazott hőprofilokat az 1. táblázat tartalmazza.

IV.4.3. Virulencia gének vizsgálata *P. aeruginosa* izolátumok körében

Elvégeztük 18 olyan gén hodozásának vizsgálatát is, melyek fontos szerepet játszanak a kórokozó által okozott fertőzések patogenezisében: a fehérjeszintézist gátló *exotoxin A* génje, a *toxA* gén, az alginát szintézisében szerepet játszó *algD* gén, a III. típusú szekréciós rendszer effektor proteinjeit kódoló *exoT*, *exoS*, *exoU*, *exoY* gének, a foszfolipázt kódoló *plcH*, *plcN* gének, a proteázt kódoló *apr*, *lasB* gének, a IV. típusú pilust kódoló *pilA* gén, a fenazin szintézisét katalizáló enzimeket kódoló *phzI*, *phzII*, *phzS*, *phzM* operonok, illetve gének és a sziderofór rendszer részeként működő pioverdin receptorokat kódoló *fpvA-I*, *fpvA-II*, *fpvA-III* gének. A PCR során keresett gének típusait, a detektálásukhoz felhasznált oligonukleotid primerek szekvenciáit, valamint az alkalmazott hőprofilokat a 2. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: A PCR során keresett gének típusai, a detektálásukhoz felhasznált oligonukleotid primerek szekvenciái, valamint az alkalmazott annellációs hőprofilok

Gén	Primer neve	Szekvencia 5'-3'	Amplikon méret	Annellációs T	Forrás
Aminoglikozid rezisztencia gének vizsgálatára használt primerek					
<i>aac(6')-Ib</i>	aac(6')-Ib-F aac(6')-Ib-R	GTTACTGGCGAATGCATCACA TGTTTGAACCATGTACACGGC	216 bp	58°C	Frana, 2001
<i>aac(3')-IIa</i>	aac(3')-IIa-F; aac(3')-IIa-R	ATGCATACGCGGAAGGC TGCTGGCACGATCGGAG	822 bp	58°C	Noppe-Leclercq, 1999
<i>ant(2'')-Ia</i>	ant(2'')-Ia-F ant(2'')-Ia-R	GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG CTGTTACAACGGACTGGCCGC	320 bp	67°C	Frana, 2001
<i>ant(3'')-Ia</i>	ant(3'')-Ia-F ant(3'')-Ia-R	TCGACTCAACTATCAGAGG ACAATGGTGACTTCTACAGCG	244 bp	58°C	Hannecart-Pokorni, 1997
<i>aph(3')-Ia</i>	aph(3')-Ia-F aph(3')-Ia-R	CGAGCATCAAATGAAACTGC GCGTTGCCAATGATGTTACAG	623 bp	58°C	Noppe-Leclercq, 1999
<i>aph(3')-VIa</i>	aph(3')-VIa-F aph(3')-VIa-R	ATACAGAGACCACCATACAGT GGACAATCAATAATAGCAAT	234 bp	55°C	Vila, 1999
<i>Arm-A</i>	Arm-A-F Arm-A-R	CAAATGGATAAGAATGATGTT TTATTTCTGAAATCCACT	776 bp	55°C	Bogaerts, 2007
<i>rmtA</i>	rmtA-F rmtA-R	CTAGCGTCCATCCTTTCCTC TTTGCTTCCATGCCCTTGCC	635 bp	55°C	Bogaerts, 2007
<i>rmtB</i>	rmtB-F rmtB-R	ATGAACATCAACGATGCCCT GGACAATCAATAATAGCAAT	679 bp	55°C	Bogaerts, 2007
Karbapenem rezisztencia gének vizsgálatára használt primerek					
<i>bla_{OXA23-like}</i>	bla _{OXA23} -F bla _{OXA23} -R	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCAT	501 bp	60°C	Woodford, 2006
<i>bla_{OXA24-like}</i>	bla _{OXA24} -F bla _{OXA24} -R	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246 bp	60°C	Woodford, 2006
<i>bla_{OXA48-like}</i>	bla _{OXA48} -F bla _{OXA48} -R	GCTTGATCGCCCTCGATT GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	238 bp	60°C	Woodford, 2006
<i>bla_{OXA51-like}</i>	bla _{OXA51} -F bla _{OXA51} -R	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG	353 bp	60°C	Woodford, 2006
<i>bla_{OXA58-like}</i>	bla _{OXA58} -F bla _{OXA58} -R	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599 bp	60°C	Woodford, 2006
<i>ISAbA-1</i>	ISAbA-1-F ISAbA-1-R	CACGAATGCAGAAGTTG CGACGAATACTATGACAC	563 bp	55°C	Turton, 2006

2. táblázat: A virulencia gének vizsgálatánál használt oligonukleotid primerek szekvenciái

Gén	Primer neve	Szekvencia 5'-3'	Amplikon méret	Annellációs T	Forrás
Virulencia gének vizsgálatára használt primerek					
phzI	phzI-F phzI-R	CATCAGCTTAGCAATCCC CGGAGAAACTTTTCCCTC	392 bp	49°C	Finnan, 2004
phzII	phzII-F phzII-R	GCCAAGGTTTGTGTGTCGG CGCATTGACGATATGGAAC	1036 bp	51°C	Finnan, 2004
phzM	phzM-F phzM-R	ATGGAGAGCGGGATCGACAG ATGCGGGTTTCCATCGGCAG	875 bp	72,3°C	Finnan, 2004
phzS	phzS-F phzS-F	TCGCCATGACCGATACGCTC ACAACCTGAGCCAGCCTTCC	1752 bp	68,5°C	Finnan, 2004
apr	apr-F apr-R	TGTCCAGCAATTCTCTTGC CGTTTTCCACGGTGACC	1017 bp	51°C	Finnan, 2004
lasB	lasB-F lasB-R	ACAGGTAGAACGCACGGTTG GATCGACGTGTCCAAACTCC	122 bp	59°C	Finnan, 2004
toxA	toxA-F toxA-R	GGTAACCAGCTCAGCCACAT TGATGTCCAGGTCATGCTTC	352 bp	55°C	Lanotte, 2004
algD	algD-F algD-R	ATGCGAATCAGCATCTTTGGT CTACCAGCAGATGCCCTCGGC	1310 bp	55°C	Lanotte, 2004
fpvA-I	fpvA-I-F fpvA-I-R	CGAAGGCCAGAACTACGAGA TGTAGCTGGTGTAGAGGCTCAA	326 bp	55°C	de Chial, 2003
fpvA-II	fpvA-II-F fpvA-II-R	TACCTCGACGGCTGCACAT GAAGGTGAATGGCTTGCCGTA	897 bp	55°C	de Chial 2003
fpvA-III	fpvA-III-F fpvA-III-R	ACTGGGACAAGATCCAAGAGAC CTGGTAGGACGAAATGCGAG	506 bp	55°C	de Chial 2003
plcH	plcH-F plcH-R	GAAGCCATGGGCTACTTCAA AGAGTGACGAGGAGCGGTAG	307 bp	64°C	Lanotte, 2004
plcN	plcN-F plcN-R	GTTATCGCAACCAGCCCTAC AGGTCGAACACCTGGAACAC	466 bp	64°C	Lanotte, 2004
pilA	pilA-F pilA-R	ACAGCATCCAACCTGAGCG TTGACTTCCTCCAGGCTG	1675 bp	59°C	Finnan, 2004
exoS	exoS-F exoS-R	ATCCTCAGGCGTACATCC ACGACGGCTATCTCTCCAC	328 bp	63,5°C	Finnan, 2004
exoU	exoU-F exoU-R	GATTCCATCACAGGCTCG CTAGCAATGGCACTAATCG	3308 bp	65°C	Finnan, 2004
exoY	exoY-F exoY-R	TATCGACGGTCATCGTCAGGT TTGATGCACTCGACCAGCAAG	1035 bp	60,5°C	Finnan, 2004
exoT	exoT-F exoT-R	CAATCATCTCAGCAGAACCC TGTCGTAGAGGATCTCCTG	1159 bp	63,6°C	Finnan, 2004

IV.4.4. Az amplikonok detektálása

Az amplikonokat konvencionális agaróz gélelektroforézissel detektáltuk, mely során a mintákat 1,5%-os gélben, 100 V feszültségen 90 percig elektroforizáltuk. A géleket etídium bromid segítségével UV fényben értékeltük. Az agaróz gélből egy-egy terméket izolálva (Isolate PCR and Gel Kit, Bioline, Taunton, MA, USA) szekvencia azonosság céljából szekvenáltattuk. A szekvenálással igazoltan pozitív DNS-eket pozitív kontrollként használtuk fel a PCR-ek során a gének azonosításához.

IV.4.5. Integronok vizsgálata

Az integronok előfordulását I-es, II-es és III-as típusú integrázra specifikus PCR segítségével vizsgáltuk, majd a hordozott integronok variábilis régiójára specifikus primerekkel amplifikáltuk a mintákat. Az amplikonok elektroforézise a fent leírtak szerint történt. A variábilis régióknak a teljes elemzése szekvencia analízis útján valósult meg. Az azonos méretű amplimerek közül két-két terméket véletlenszerűen kiválasztottunk, majd az agaróz gélből történő izolálást (Isolate PCR and Gel Kit, Bioline) követően a Sanger-féle láncterminációs módszer szerint szekvenáltattuk. A PCR-ek során keresett gének típusait, a detektálásukhoz felhasznált oligonukleotid primerek szekvenciáit, valamint az alkalmazott hőprofilokat a 3. táblázat tartalmazza.

A szekvenáltatás során kapott elektroferogramokat a Chromas Lite szoftver (Technelysium, South Brisbane, Queensland, Ausztrália) segítségével értékeltük. Az így nyert szekvenciákat a CLC DNA Gene Workbench (CLC Bio, Aarhus, Dánia) szoftver segítségével elemeztük és ismert génbanki szekvenciákkal összehasonlítva (BLAST[®], www.ncbi.nih.gov/blast) azonosítottuk az integronokon hordozott géneket. A hordozott génkazetta sorozatok alapján az I-es típusú integronokat az Integrall adatbázis (<http://integrall.bio.ua.pt/?nomenclature>) szerint azonosítottuk. Az azonosított integronok restriktív térképének (CLC Bio) elkészítése után, az azonos méretű variábilis régiók azonosságát restriktív fragmenthossz polimorfizmus (restriction fragment length polymorphism, RFPL) analízissel erősítettük meg. Ötféle restriktív enzimet alkalmaztunk, az így vizsgált hasító helyek a variábilis régióban található gének mindegyikét érintették. A *P. aeruginosa* esetében XbaI és XhoI enzimeket alkalmaztunk, míg az *A. baumannii* esetében XbaI, HindIII, DdeI (Fermentas) restriktív endonukleázokat a gyártó utasításai szerint.

3. táblázat: Az integron vizsgálatánál használt oligonukleotid primerek szekvenciái

Gén	Primer neve	Szekvencia 5'-3'	Amplikon méret	Annellációs T	Forrás
Integron gének vizsgálatára használt primerek					
<i>IntI-1</i>	IntI-1-F IntI-1-R	GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG ACATGCGTGTAATCATCGTC	500 bp	55°C	Frana, 2001
<i>IntI-2</i>	IntI-2-F IntI-2-R	CACGGATATGCGACAAAAAGGT GTAGCAAACGAGTGACGAAATG		55°C	Noppe-Leclercq, 1999
<i>IntI-3</i>	IntI-3-F IntI-3-R	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG ACGGATCTGCCAACCTGACT		55°C	Frana, 2001
<i>CS</i>	CS-F CS-R	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA		55°C	Hannecart-Pokorni, 1997

IV.5. Klonalitás vizsgálata

Az izolátumok genetikai rokonságát pulzáló mezejű gélelektroforézissel (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) vizsgáltuk. Ehhez az izolátumok friss tenyészetének 4×10^8 CFU/ml sűrűségűre beállított szuszpenziójából 200 μ l-t azonos mennyiségű 2%-os alacsony olvadáspontú agarózzal (SeaPlaque agaróz, Lonza, Basel, Svájc) kevertünk össze, amely tartalmazott 1 μ g/ μ l Proteináz K-t (Fermentas, Vilnius, Litvánia) és 1% nátrium-lauril-szarkozilt (Sigma, St. Louis, MO, USA) is. A keveréket öntőformában 20 percig dermedtettük, majd a kapott dugókat lízispufferben (100 mM EDTA, 0,2% nátrium dezoxikolát, 1 μ g/ μ l proteináz K, 1% nátrium-lauril-szarkozil) egy éjszakán át emésztettük. Másnap a dugókat 15 percig steril desztillált vízzel, majd négyszer egy órán át mosópufferben (100 mM Tris, 250 mM EDTA) mostuk. Az első mosópuffer 0,35 μ g/ μ l fenilmetilszulfonil-fluoridot (Sigma) is tartalmazott. A mosás befejeztével azonnal elkezdtük a restrikciós enzimes emésztést vagy a dugókat 4°C-on tízszeresére hígított mosópufferben tároltuk. A restrikciós analízishez a dugókat a restrikciós enzim gyártója által ajánlott pufferben egy órán át mostuk, majd friss restrikciós pufferbe tettük át, amely dugónként 10U restrikciós enzimet is tartalmazott, *P. aeruginosa* esetében BcuI (SpeI)-et, *A. baumannii* esetében ApaI-et (Fermentas). Az emésztést egy éjszakán át folytattuk 37°C-on, majd az emésztés a reakcióelegyet mosópufferre cserélve állítottuk le.

A futtatáshoz a dugók egy megfelelő méretűre vágott darabját 1%-os SeaKem Gold (Lonza) agaróz zsebeibe tettük. A *P. aeruginosa* esetében a dugókat 22 órán keresztül, 5-35 másodperc között lineárisan változó pulzusidővel elektroforetizáltuk, 120°-os reorientációs szög és 6V/cm feszültség mellett. Az *A. baumannii* esetében az elektroforézis során csak a pulzusidő és az elektroforézis időtartama tért el, 20 órán keresztül, 2-35 másodperc közötti lineárisan változó pulzusidővel elektroforetizáltunk. Az elektroforézis után a géleket etídium bromiddal festettük, majd desztillált vízzel mostuk a dokumentálás előtt.

A PFGE mintázatok értékelését a Fingerprinting II (BioRad, Hercules, CA, USA) szoftverrel végeztük. A hasonlóság meghatározásához a Dice koefficiens, a csoportosításhoz az UPGMA (unweighted pair-group method with averages) módszert használtuk, 1-1,5% pozíciótolerancia és 0,5% optimalizálás mellett. (A mintázatok értékelését témavezetőmmel közösen végeztük.)

IV.6. Az antibiotikum fogyasztás mérése

A nyers gyógyszer felhasználási adatokat (dobozszámban kifejezett fogyasztás) a Debreceni Egyetem Központi Gyógyszertára szolgáltatotta számunkra, az egyes betegek kezelésére alkalmazott antibiotikumok mennyiségét a betegek lázlapjairól gyűjtöttük. A felhasznált antibiotikumok mennyiségét az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) által ajánlott napi terápiás dózisban (defined daily dose, DDD) 100 ápolási napra vagy az adott betegre vonatkoztatva határoztuk meg (MS Excel ABC Calc program 3.1; Monnet, 2006). A DDD egy standardizált mutató, mely lehetővé teszi a különböző gyógyszerek torzításmentes összehasonlítását. Olyan adatot szolgáltat, ami független a gyógyszerek árától, a dobozban található hatóanyag mennyiségétől (Monnet, 2006).

A *P. aeruginosa* vizsgálata során a streptomycin, amikacin, tobramycin és gentamicin évenkénti fogyasztását vizsgáltuk 2005-2009 között a Tüdőklinikán. Az egyes betegek kezelése során történt antibiotikum felhasználást a betegek lázlapjaiban rögzített antibiotikum mennyiségekből számoltuk. A *A. baumannii* vizsgálata során az összes antibiotikum fogyasztását negyedéves bontásban vizsgáltuk. Mivel ebben az esetben az antibiotikum fogyasztás részletesebb analízisét terveztük, ezért egy finomabb felbontást, negyedéves periódusokat kellett alkalmazni. Az Egyetem teljes antibiotikum felhasználását és a fogyasztott antibiotikumok klinikánkénti mennyiségét egyaránt felmértük. Az adatelemzéseket 2002-2012 között negyedéves bontásokban végeztük el (Monnet, 2006).

(Az adatok feldolgozását társszerzőimmal közösen végeztük.)

IV.7. Statisztikai analízis

IV.7.1. *Pseudomonas aeruginosa*

A betegeket az alapján csoportosítottuk, hogy milyen genotípusú *P. aeruginosa*-t hordoztak (klónokat, illetve csak sporadikus izolátumokat hordozó betegek). Az így kialakított csoportokban az egyes betegek kezelésére alkalmazott aminoglikozidok, illetve összes antibiotikum mennyisége közötti különbségeket a Kruskal-Wallis teszttel, valamint post-hoc páronkénti összehasonlítással - Bonferrini korrekciót alkalmazva – elemeztük (Hammer és mtsai, 2001). A statisztikai elemzésből kizártuk azt a beteget, aki multirezisztens tuberculosisban szenvedett és ezért nagy mennyiségű amikacint, illetve streptomycint kapott.

IV.7.2. *Acinetobacter baumannii*

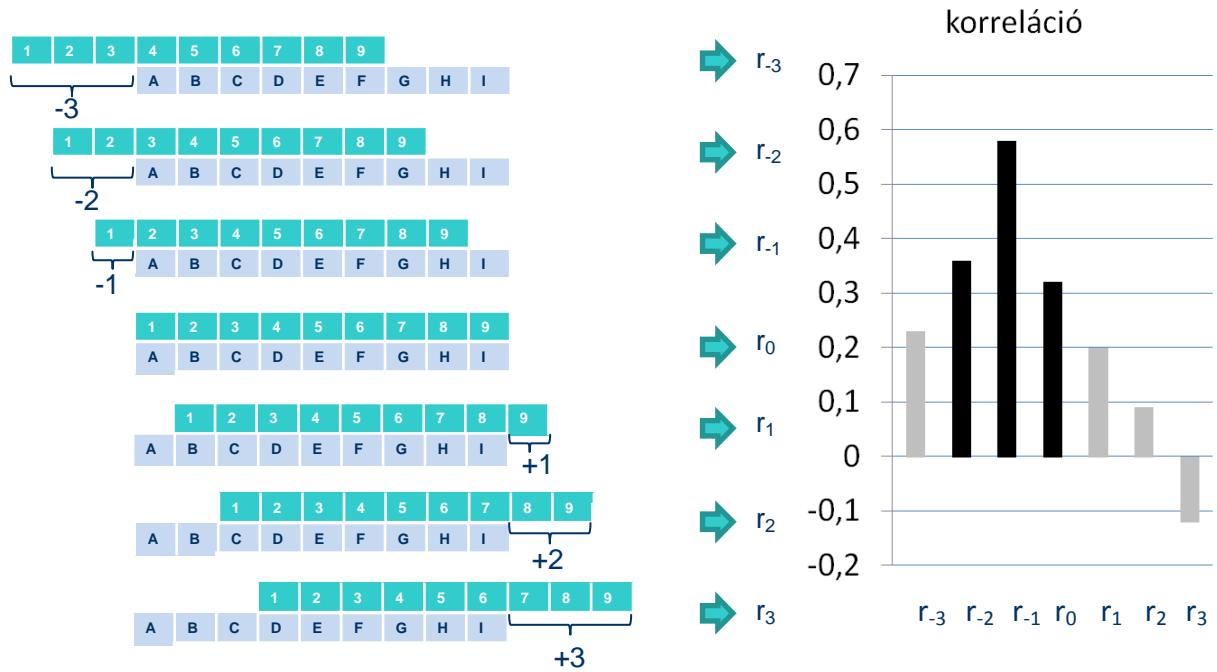
Az antibiotikum fogyasztással párhuzamosan vizsgáltuk az *A. baumannii* prevalenciáját is az Egyetemünkön. Éves szinten az *Acinetobacter* izolátumok előfordulási gyakoriságát az *A.*

baumannii pozitív betegek számával (100 ápolási napra vonatkoztatva), a fekvőbetegek mintáiból kitenyészett *A. baumannii* arányával, az *A. baumannii* arányával a Gram-negatív baktériumok (aerob és fakultatív anaerobok) között, valamint a pozitív hemokultúrákból kitenyészett *A. baumannii* arányával jellemeztük. A kórokozók antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájára vonatkozó adatokat a Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratórium adatbázisából gyűjtöttük, egy betegről csak az első izolátumot vettük figyelembe. Az antibiotikum felhasználás és az *A. baumannii* izolátumok előfordulásának gyakoriságában, valamint az antibiotikum rezisztenciájában bekövetkező változások közötti összefüggés lehetőségét lineáris regresszióval, mint szűrőmódszerrel elemeztük. Azon antibiotikumok esetében, ahol a regresszió során a felhasználási adatok szignifikáns korrelációt mutattak a prevalencia vagy a rezisztencia adataival, a negyedéves periódusonként összegyűjtött antibiotikum felhasználás, prevalencia és a rezisztencia adatokból összeállított idősorokat trend eltávolítását követően keresztkorrelációs analízisnek vetettük alá.

Az idősor analízisre azért volt szükség, mert az egyes adatpontjaink nem független mérésekből származnak, ez pedig megsérti a logisztikus regresszió azon feltételét, miszerint az adatoknak egymástól függetleneknek kell lenniük. Az idősorok egyenlő időközönként gyűjtött adatok sorozatai. Az analízis során vizsgálhatjuk az idősoron belüli periodicitást (autokorreláció), az idősoron belüli trendet (autokorreláció), valamint két idősor közötti összefüggést (keresztkorreláció). Az adatsorok közötti keresztkorrelációt vizsgálva adatsorainkat egymáshoz képest időben eltoljuk (pozitív és negatív irányban), így virtuális idősorok sorozatához jutunk, amelyek között páronként regressziós analízist végzünk. A regressziós analízis során a korrelációs együttható -1 és 1 közötti értéket vehet fel: negatív érték esetén a két idősor között fordított arányosság van, pozitív korreláció esetén a két idősor között egyenes arányosság áll fenn. Az analízis során keressük azt a virtuális adatsort, amely esetében a korreláció a legerősebb: tehát a hatás időben való eltolódásának a mértékét az a késleltetés mutatja meg, ahol a korreláció a legerősebb és statisztikailag szignifikáns értéket mutat (López-Lozano és mtsai, 2005; 4. ábra).

A karbapenemek közül az imipenem, meropenem és ertapenem fogyasztást elemeztük, mivel a doripenem bevezetésére a tanulmányunk megkezdését követően került sor és csak a vizsgált periódus utolsó évében alkalmazták. A különböző fekvőbeteg osztályon lévő karbapenem érzékeny és rezisztens *A. baumannii* prevalenciáját chi-négyzet próbával, illetve Fisher-egzakt teszttel, a különböző fekvőbeteg osztályokon felhasznált antibiotikumok mennyiségét Kruskal-Wallis teszttel hasonlítottuk össze (Hammer és mtsai, 2001). A statisztikai elemzéshez a PAST 3.0. szoftvert használtuk (Hammer és mtsai, 2001).

(A statisztikai analízist témavezetőmmel közösen végeztük.)



4. ábra

Idősor analízis (keresztkorrelációs vizsgálat)

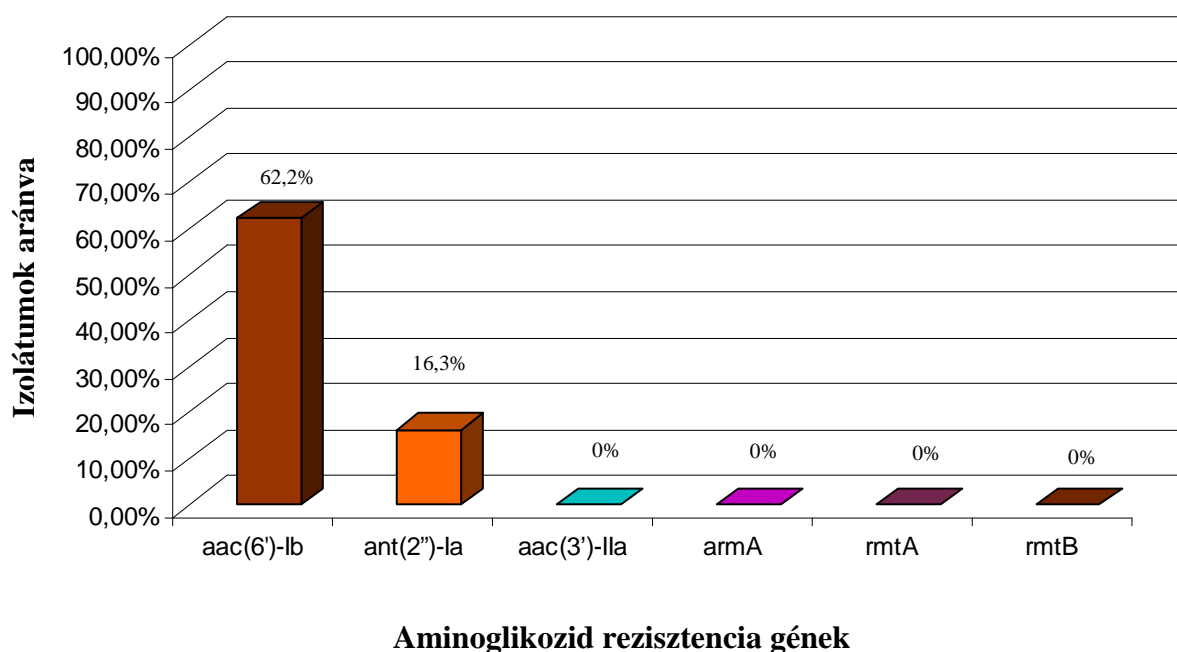
V. Eredmények

V.1. *Pseudomonas aeruginosa*

V.1.1. Az aminoglikozid rezisztencia gének és az integronok előfordulása

A *P. aeruginosa* izolátumok körében a leggyakrabban az *aac(6')-Ib* gén fordult elő. Ezt az amikacinnal és tobramycinnel szemben rezisztenciát biztosító gént az izolátumok 62,2%-ban (61/98) mutattuk ki. Az *aac(6')-Ib* génen kívül 16 izolátum esetében (16,3%) megtalálható volt az *ant(2'')-Ia* gén is, amely gentamicinnel és tobramycinnel szembeni rezisztenciáért felelős. Az általunk vizsgált többi gén nem fordult elő (*aac(3')-IIa*, *armA*, *rmtA*, and *rmtB*) az izolátumainkban (5. ábra).

Az izolátumok döntő többsége (92,1%) I. típusú integront hordozott, II. és III. típusú integront egyik csoport esetében sem találtunk. Az integronok variábilis régiójának elemzéséből származó eredmények bemutatására a klonalitás vizsgálatát tárgyaló részben kerül sor.



5. ábra

Az aminoglikozid rezisztencia gének megoszlása *P. aeruginosa* izolátumok körében

V.1.2. Virulencia gének

Mindegyik izolátum hordozott pioverdin receptor gént, azonban a három típusból csak az egyiket (*fpvA-I*, *fpvA-II*, *fpvA-III*). A pioverdin receptor gének mellett mindegyik izolátum hordozta még a proteáz és foszfatáz enzimeket kódoló *apr*, *lasB*, *pclH* géneket, a fenazin szintézisében szerepet játszó *phzM*, *phzI* és *phzII* géneket, az effektor proteint kódoló *exoT*, *exoY* géneket, valamint a fehérjeszintézist gátló exotoxinA-t kódoló *toxA* gént. A *phzS* gén - mely szintén a fenazin szintézisében vesz részt- az izolátumok 91,3%-ban volt kimutatható. Az izolátumok mindössze 8,1% -ában (13/160) volt jelen a *pilA* és az *exoU* gén. A III. típusú szekréción rendszer effektor proteinjeit kódoló génekből egyidejűleg egyszerre kettőt vagy hármat is hordoztak az izolátumok, azonban *exoS* és *exoU* gének soha nem fordultak elő együtt (4. táblázat).

4. táblázat: Virulencia gének megoszlása *P. aeruginosa* izolátumok körében

Virulencia gének	Izolátumok aránya (N=98)
<i>pioverdin receptor gének (fpvA-I; fpvA-III)*</i>	100%
<i>apr</i>	100%
<i>lasB</i>	100%
<i>pclH</i>	100%
<i>phzM</i>	100%
<i>phzI</i>	100%
<i>phzII</i>	100%
<i>exoT</i>	100%
<i>exoY</i>	100%
<i>toxA</i>	100%
<i>phzS</i>	91,30%
<i>exoS</i>	85,70%
<i>exoU</i>	8,10%
<i>pilA</i>	8,10%

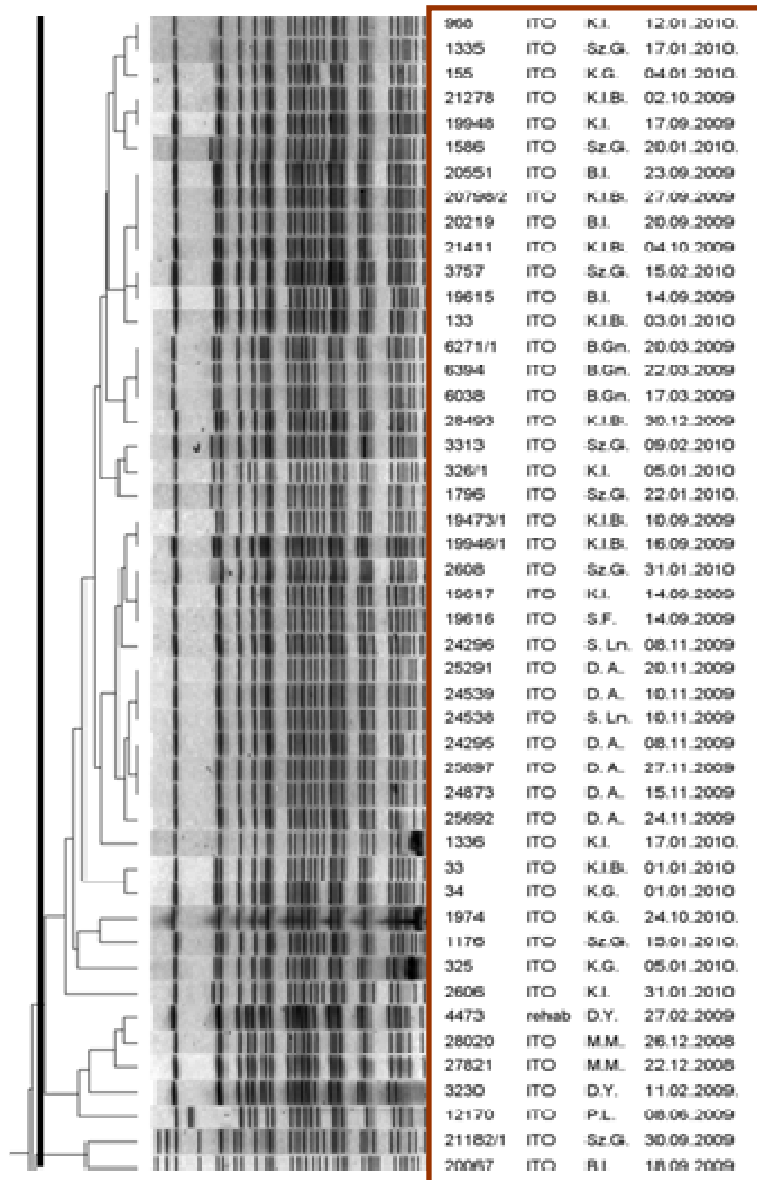
* *fpvA-I* virulencia gént az izolátumok 63,2%-a (60/95) hordozta, *fpvA-III* virulencia gént az izolátumok 36,8%-a (35/95) hordozta

V.1.3. A klonalitás vizsgálata

A vizsgálatba bevont 95 *P. aeruginosa* izolátum esetében három fő rokonsági csoportot (A-C), valamint 22 egyedi mintázattal rendelkező izolátumot különítettünk el PFGE segítségével. Az izolátumok 74,4% -a (73/95) valamelyik nagyobb klaszterbe tartozott.

A legnagyobb csoportot az „A” klaszter képviselte (6. és 13. ábra). Ebbe a klaszterbe összesen 49 izolátum tartozott, melyek 12 betegtől származtak. Az izolátumok a teljes vizsgálati periódust lefedték és a klón izolátumai azonos időszakokban több különböző betegből, illetve ugyanazon betegekből az egymást követő kórházi bennfekvések alatt is kitenyésztek. A

Tüdőklinika Intenzív Osztályáról egy kihurcolás is megfigyelhető volt a Klinika Rehabilitációs Osztályára. A klaszteren belül a törzs rezisztencia fenotípusa nagyon változatos volt, míg minden egyes izolátum rezisztens volt ciprofloxacinnra, amikacinra, gentamicinre és tobramycinre, addig a β -laktámokkal szembeni rezisztenciájuk eltérő volt. Néhány esetben előfordult, hogy az ugyanazon a napon kitenyészett izolátumok fenotípusos rezisztenciája különbözött egymástól. A multirezisztencia miatt több esetben már csak a colistin maradt az egyetlen terápiás lehetőség. Az amikacin és tobramycin rezisztenciát biztosító *aac(6')-Ib* gén az összes izolátum esetében detektálható volt. Mindegyik izolátum ugyanazt az I. típusú integront hordozta, és az integron variábilis régiójában három rezisztencia gént azonosítottunk. A három génből kettő aminoglikozid modifikáló enzimet kódoló gén volt *aac(6')-Ib* és *ant(3'')-Ib*, egy pedig *Pseudomonas*-specifikus béta-laktamáz kódoló gén *bla_{PSE-1}* (In99; 7. ábra). Az izolátumok a *pilA* és az *exoU* gének kivételével az általunk vizsgált összes virulencia gént hordozták. A pioverdin receptor gének közül a I. típusú fordult elő ebben a csoportban.



6. ábra

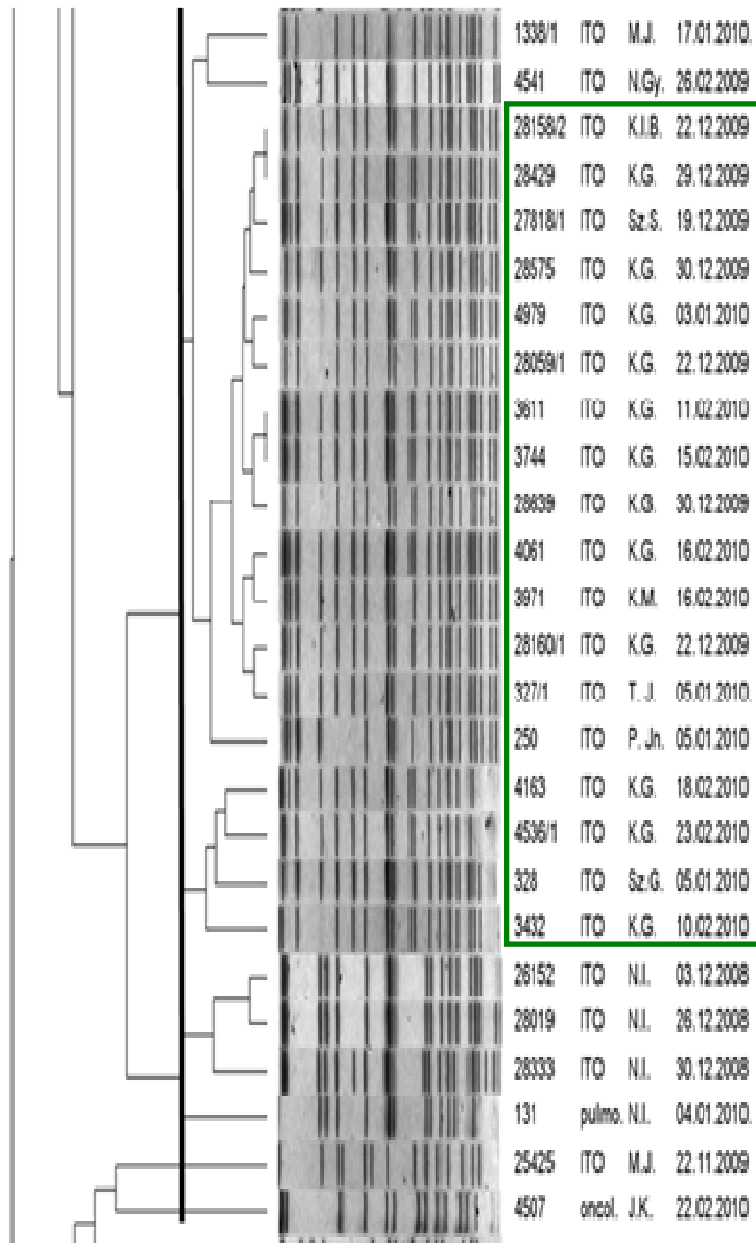
Az „A” klaszterbe tartozó *P. aeruginosa* izolátumok



7. ábra

Az „A” klaszterben azonosított integron (In99) variábilis régiójában lévő rezisztencia gének

A „B” rokonsági csoportba 16 izolátum tartozott, melyeket 2008. december 3. és 2010. február 23. között 11 beteg mintáiból izoláltunk (8. és 13. ábra). Sok esetben az előző klaszter tagjaival egy időben, ugyanazon betegben - néhány nap különbséggel - fordultak elő. A rezisztencia fenotípusa ciprofloxacín, gentamicin és tobramycín rezisztenciával volt jellemezhető, amikacin rezisztenciát nem találtunk. A β -laktámokkal szembeni rezisztencia kevésbé volt kiterjedt ebben a klaszterben, mint az „A” klaszterben, hiszen csak öt izolátum volt rezisztens az antipseudomonas β -laktámokkal szemben. Az összes izolátum hordozott egy nukleotidil-transzferáz enzimet kódoló *ant(2'')-Ia* gént, mely tobramycinnel és gentamicinnel szemben biztosít rezisztenciát. Az általunk vizsgált többi aminoglikozid modifikáló enzimet kódoló gént nem lehetett kimutatni a klaszter izolátumaiból. Minden izolátum I. típusú integront hordozott, melynek a variábilis régiója az *ant(2'')-Ia* gént tartalmazta (In159; 9. ábra). A virulencia géneknek a megoszlása szinte azonos volt az „A” klaszterrel, kivételt képez a ploverdin receptor gén, ugyanis ebben a rokonsági csoportban az I. típusú helyett a III. típusú fordult elő.



8. ábra

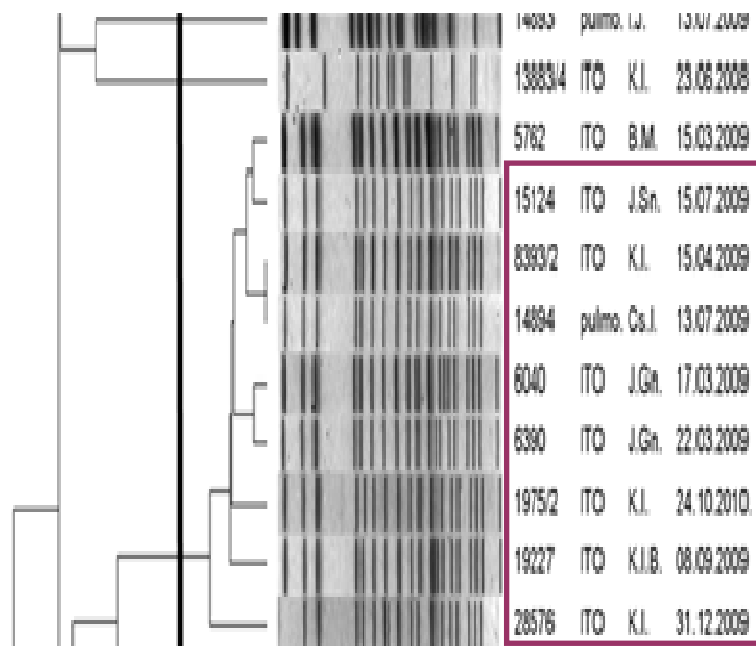
A „B” klaszterbe tartozó *P. aeruginosa* izolátumok



9. ábra

A „B” klaszterben azonosított integron (In159) variábilis régiójában lévő rezisztencia gének

A harmadik rokonsági csoportot a „C” klaszter képviselte (10. és 13. ábra), melybe 6 beteg 8 izolátuma tartozott. Az izolálások időben elszórtan történtek 2009-ben. Egy izolátum esetében, mely 2009 júliusában tenyésztett ki egy a Pulmonológia Osztályon fekvő beteg mintájából, felmerülhet a kihurcolás vagy behozatal gyanúja. A klaszter tagjainak antibiotikum érzékenységét az imipenem rezisztencia jellemezte, kivételt képez az az egy izolátum, amely a Tüdőklinika fekvőbeteg osztályáról és nem az intenzív osztályáról származott. Az imipenem rezisztencia mellett három izolátum (amelyek egy betegtől származtak) eltérő rezisztenciát mutatott a β -laktámokkal, a ciprofloxacinnal, valamint az aminoglikozidokkal szemben. Ezek közül az izolátumok közül egy hordozott egy I. típusú integront, amelynek a variábilis régiójában nem volt rezisztencia gén (In0; 11. ábra). A klaszter többi tagjánál vizsgált aminoglikozid rezisztencia gén, illetve I. típusú integron nem fordult elő. A csoport minden egyes tagjánál megtalálható volt az összes vizsgált virulencia gén, kivéve az *exoS*-t.



10. ábra

A „C” klaszterbe tartozó *P. aeruginosa* izolátumok

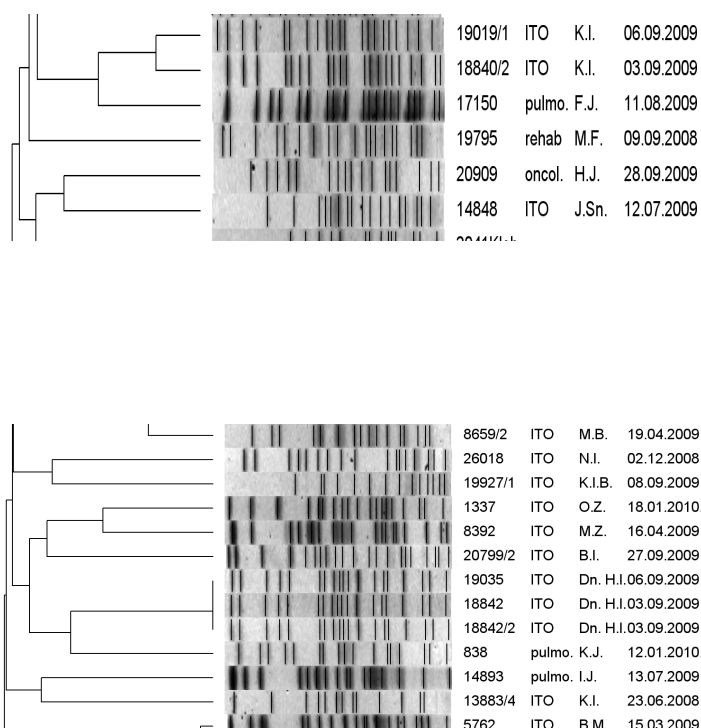


11. ábra

A „C” klaszterben azonosított rezisztencia gén nélküli I. típusú integron (In0)

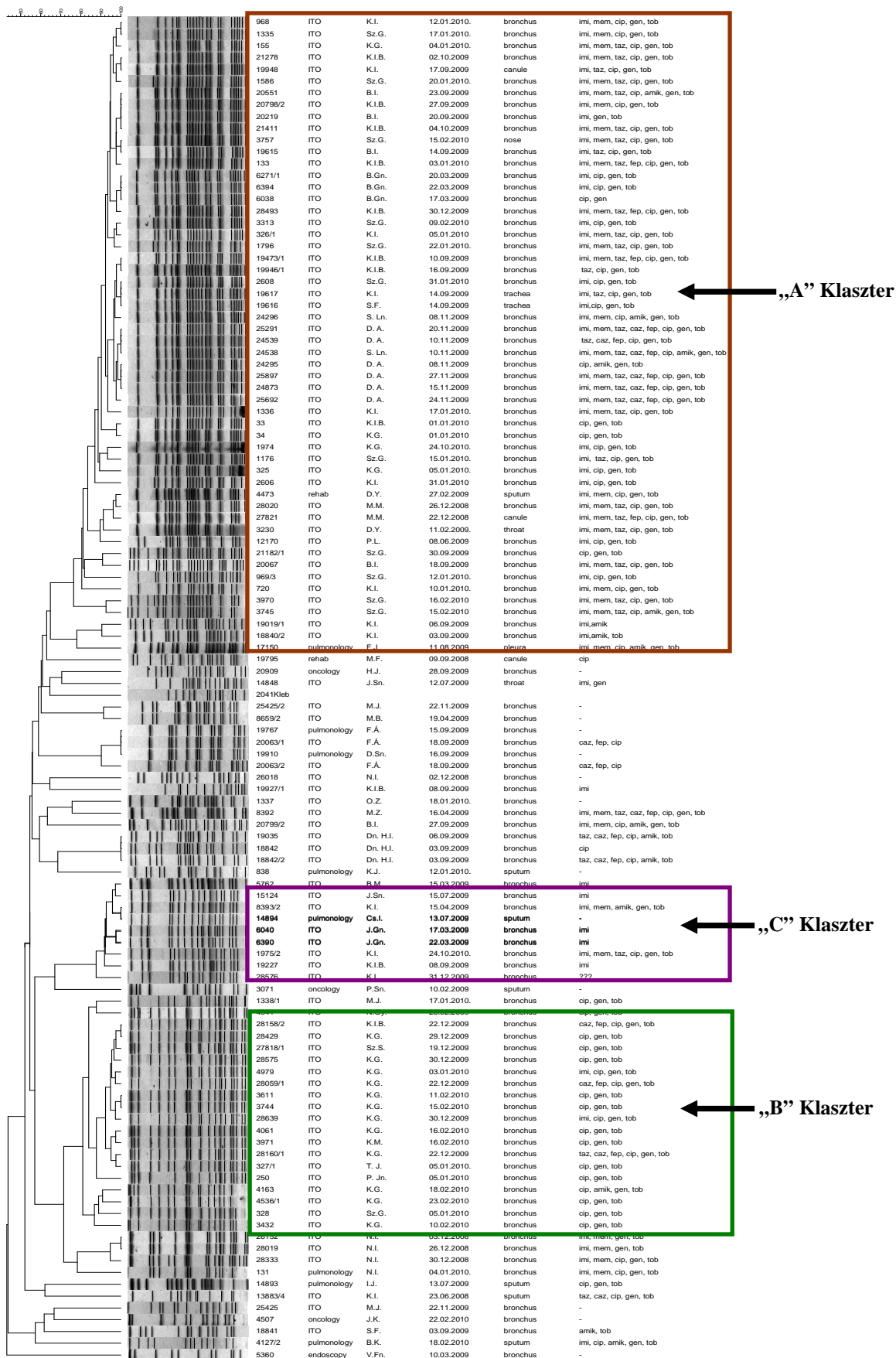
A közös rokonsági csoportba nem tartozó független izolátumok száma 22 volt, melyek összesen 20 betegtől származtak (12. és 13. ábra). Az antipseudomonas antibiotikumokkal szemben 9 izolátum mutatott érzékenységet, és csak egy hordozott közülük *aac(6')-Ib* aminoglikozid rezisztencia gént. Más aminoglikozid rezisztencia gént egyik izolátum esetén sem találtunk. A független izolátumok között előfordult egy olyan izolátum, ami hordozott egy üres I. típusú integront, hasonlóan a „C” klaszterben lévő izolátumhoz, egyébként integront nem találtunk. A virulencia géneknek a megoszlása nagyon heterogén volt, csak a *phzII*, *apr*, *plcH* és az *exoT* gén volt jelen minden egyes tagnál. Az izolátumok többségénél más virulencia gének igen magas arányban fordultak elő, kivételt képez ez alól a *pilA* és *exoU* gén. Egy izolátum mind a 16 virulencia gént hordozta.

Harminckilenc betegből 24-nek legalább egy olyan izolátuma volt, amely valamelyik fő rokonsági csoportba tartozott. A fennmaradó 18 beteg (akiket nem az intenzív osztályon kezeltek) izolátuma közös rokonsági csoportba nem volt besorolható, ezért független izolátumként kisebb csoportokat képeztek vagy egyedi mintázatot mutattak. Tíz beteg esetében fordult elő, hogy egynél több törzset is hordozott.



12. ábra

Közös rokonsági csoportba nem tartozó *P. aeruginosa* izolátumok



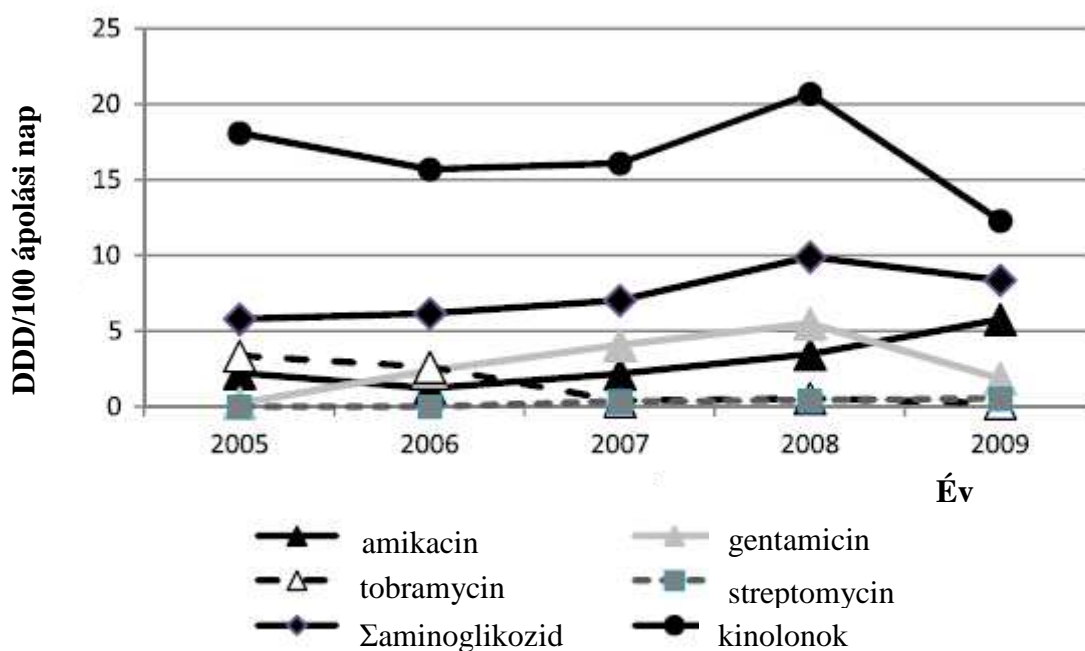
13. ábra

A *P. aeruginosa* törzsfája PFGE mintázat alapján

V.1.4. Az antibiotikum fogyás

A Tüdőklinikán felhasznált antibiotikum mennyiség (97,8 DDD/100 ápolási nap) jóval az egyetemi átlag felett volt (37,8 DDD/100 ápolási nap) 2005 és 2009 között. A leggyakrabban alkalmazott antibiotikumok közé tartoztak a makrolidok, az amoxicillin+klavulánsav, valamint a fluorokinolonok. Az átlagos fogyás makrolidok esetében 29,8 DDD/100 ápolási nap, amoxicillin+klavulánsav esetében 26,6 DDD/100 ápolási nap és fluorokinolonok esetében 16,6 DDD/100 ápolási nap volt. Az aminoglikozid felhasználás szintén meghaladta az egyetemi átlagot. Míg 2005-ben 5,7 DDD/100 ápolási nap volt, addig 2009-re majdnem ennek a duplájára emelkedett (9,9 DDD/100 ápolási nap). A terápia során az aminoglikozidok közül leggyakrabban az amikacint (átlagos fogyasztás 3,0 DDD/100 ápolási nap), a gentamicint (2,8 DDD/100 ápolási nap) és a tobramycint (1,4 DDD/100 ápolási nap) alkalmazták. A streptomycin, valamint a netilmicin esetében az átlagos fogyás alacsony értéket mutatott (0,3 és 0,02 DDD/100 ápolási nap), ezeket az antibiotikumokat csak alkalmasszerűen használták. 2006 és 2007 között tobramycinról gentamicinre váltottak, majd az ezt követő évben, 2008 és 2009 között a gentamicint részlegesen amikacinnal helyettesítették. A 2008 és 2010 eleje között követett 39 betegből 19 kapott amikacint, ebből tizenhatot az intenzív osztályon kezeltek, míg a maradék hármat pedig más fekvőbeteg osztályon. További három beteg gentamicin kezelésben részesült. Egy-egy beteg esetében tobramycint és streptomycint alkalmaztak. Az aminoglikozidok mellett a fluorokinolonoknak a felhasználása is igen jelentős volt 2005 és 2009 között, az aminoglikozidokhoz hasonlóan felhasználásuk szintén emelkedést mutatott (16,6 DDD/100 ápolási napról 20,7 DDD/100 ápolási napra emelkedett). Azonban meg kell említeni, hogy 2009-ben ez az emelkedés megállt, sőt majdnem felére csökkent (12,3 DDD/100 ápolási nap; 14. ábra). A széles spektrumú β -laktámokat (piperacillin+tazobactam, karbapenem) szintén gyakran alkalmazták a kezelések során. A vizsgálatban szereplő betegek közül csak egy nem részesült antibiotikum terápiában.

A statisztikai elemzés alapján azok a betegek, akiknek az izolátumai az „A” rokonsági csoportba tartoztak, és az amikacin rezisztenciát kódoló *aac(6)-Ib* gént az integron variábilis régiójában hordozták, kezelésük során szignifikánsan több amikacint kaptak, szemben azokkal a betegekkel, akiknek az izolátumai más rokonsági csoportokból vagy a független izolátumok csoportjából származtak ($p=0,046$). Mivel az antibiotikum fogyások (az összes antibiotikum, a β -laktám és a fluorokinolon fogyás is) hasonlóak voltak a rokonsági csoportok között, ez a különbség csak az amikacin fogyasztásra volt jellemző.



14. ábra

Az aminoglikozidok fogyasztásának alakulása 2005 és 2009 között a Tüdőklinikán

V.2. *Acinetobacter baumannii*

V.2.1. Rezisztencia előfordulása

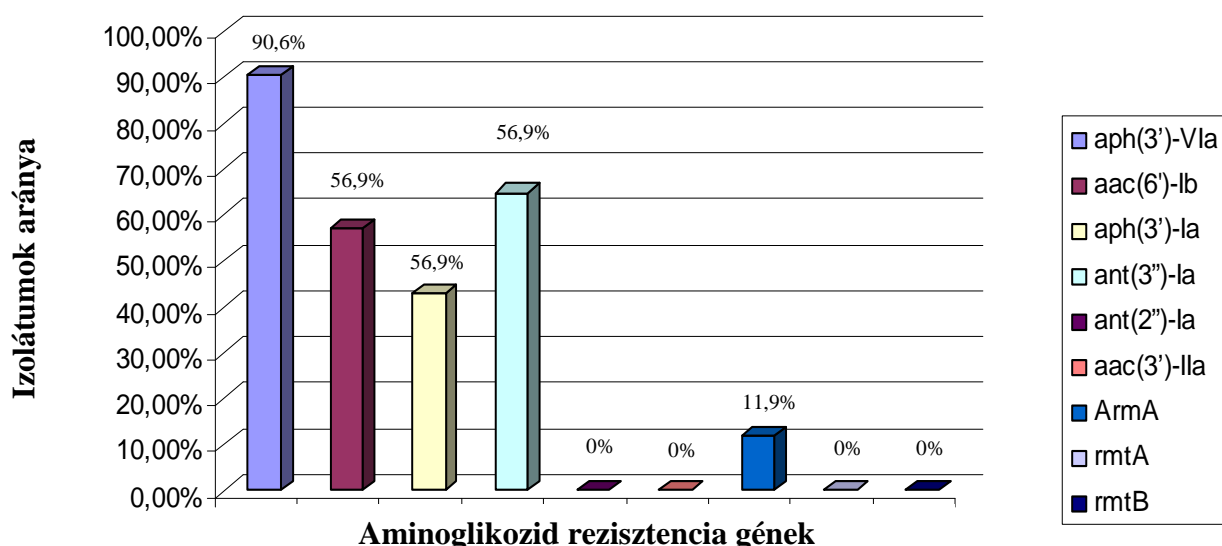
Az izolátumok 72,5%-a (116/160) volt rezisztens karbapenemekkel szemben, melyek legtöbbször a fertőzés kezelésében elsőként választandó szerek. Az alternatív terápiaként választható aminoglikozidokkal szembeni rezisztencia 70,3% (112/160). Az *Acinetobacter* izolátumaink doxycyclin rezisztenciája nagyjából korrelált a tigecyclinnel szembeni rezisztenciával (43,1%). Ciprofloxacinnal szemben az izolátumok 96,8%-a (155/160) volt rezisztens. Az izolátumok 33,1%-a (53/160) volt XDR, melyekkel szemben csak a colistin volt hatásos. Az általunk vizsgált összes izolátum érzékeny volt colistinre.

V.2.2. Az aminoglikozid rezisztencia gének megoszlása és az integronok típusai

Az *A. baumannii* izolátumok körében a fent említett géneken kívül, további három gén vizsgálatára is sor került, ezek az *ant(3'')-Ia*, *aph(3')-Ia* és *aph(3')-VIa*. A *P. aeruginosa* izolátumokhoz hasonlóan *aac(6')-Ib* gén hordozása igen gyakori volt az *A. baumannii* izolátumok körében is, hiszen az izolátumok 56,9 %-ban (91/160) fordult elő. A legmagasabb arányban az *A. baumannii*-ra jellemző *aph(3')-VIa* gén volt jelen (90,6%, 144/160). Ez a két gén klinikailag igen jelentős szereppel bír, hiszen a hazánkban kiterjedten használt

amikacinnal szemben eredményeznek rezisztenciát. Bár igaz, hogy bizonyos izolátumok esetében detektálható volt a kanamycinnel *aph(3')-Ia*, valamint a streptomycinnel és spectinomycinnel szembeni *ant(3'')-Ia* rezisztenciát biztosító géneknek a jelenléte is, azonban ezek a gének klinikai szempontból nem relevánsak, mivel az említett szereket Magyarországon ritkán vagy egyáltalán nem alkalmazzák. Az *ant(2'')-Ia* gén egyik izolátumban sem fordult elő. A 16S RNS metilázt kódoló gének közül csak *armA-t* mutattunk ki 19 (11,9%) izolátum esetében (15. ábra). Szemben a *P. aeruginosa* izolátumokkal, az *A. baumannii* izolátumok egyidejűleg két vagy három aminoglikozid rezisztencia gént is gyakran hordoztak.

Az izolátumok döntő többsége I. típusú integront hordozott, II. és III. típusú integront egyik csoport esetében sem találtunk. Az integronok variábilis régiójának elemzéséből származó eredményeket később, a klonalitási vizsgálatoknál tárgyaljuk.



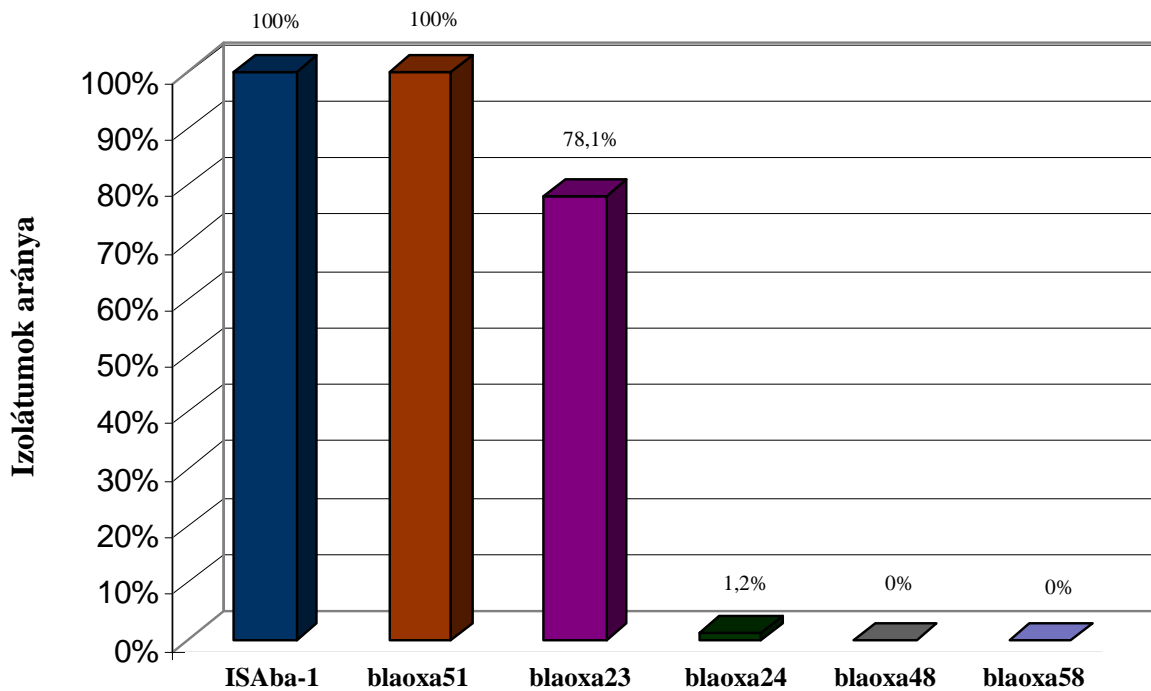
15. ábra

Az aminoglikozid rezisztencia gének megoszlása *A. baumannii* izolátumok körében

V.2.3. Karbapenem rezisztencia gének megoszlása

Ezeknek a géneknek a hordozását is csak az *A. baumannii* izolátumok körében vizsgáltuk. Ahogy az várható volt, az összes izolátum hordozta a kromoszómálisan előforduló *bla_{OXA-51-like}* karbapenemázt kódoló gént az IS_{Aba-1} inzerációs szekvenciával együtt. A *bla_{OXA-51-like}* génen kívül, az izolátumok 78,1%-nál (125/160) *bla_{OXA-23-like}* gén, míg 1,2%-nál (2/160)

bla_{OXA-24-like} gén volt detektálható. Egyik izolátumban sem fordult elő a *bla_{OXA-48-like}* és a *bla_{OXA-58-like}* gén. A karbapenem érzékeny izolátumok csak *bla_{OXA-51-like}* gént hordoztak, a karbapenem rezisztens izolátumok viszont a *bla_{OXA-51-like}* gén mellett *bla_{OXA-23-like}* gént vagy *bla_{OXA-24-like}* gént hordozták (16. ábra).



Karbapenem rezisztencia gének

16. ábra

A karbapenem rezisztencia gének megoszlása *A. baumannii* izolátumok körében

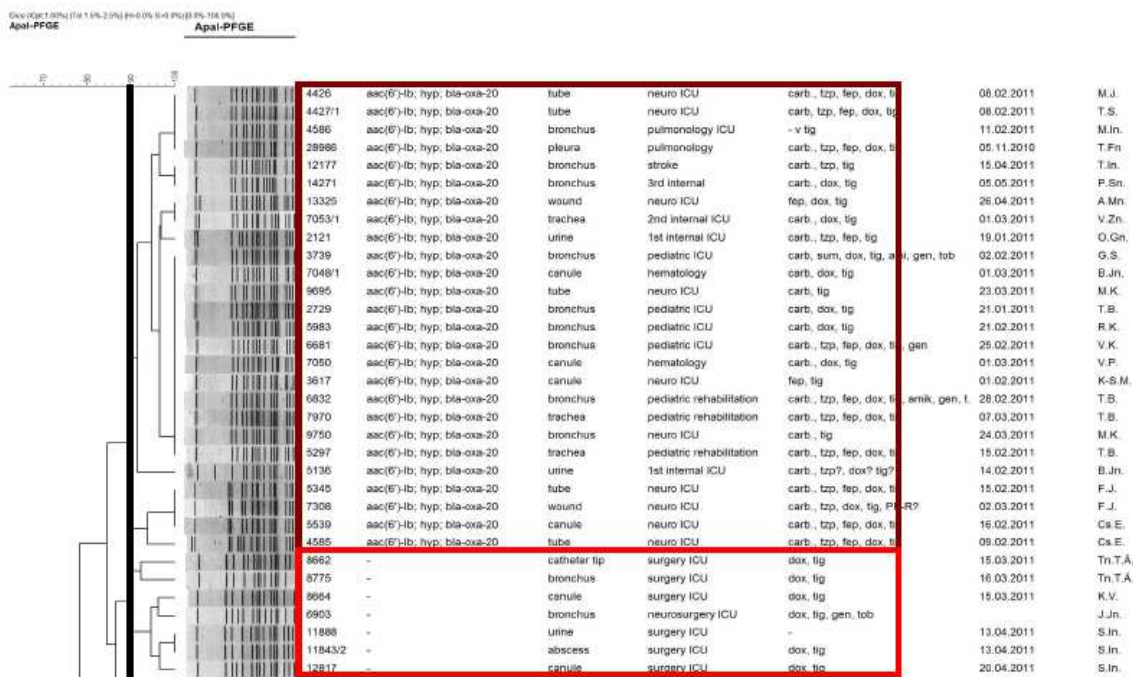
V.2.4. A klonalitás vizsgálata

Az *A. baumannii* izolátumok esetén hat rokonsági csoportot (A1, A2, B, C1, C2, D), valamint négy független izolátumot különítettünk el PFGE-vel. A független izolátumok közül kettő teljes azonosságot mutatott, a maradék kettő egyedi mintázattal rendelkezett. Az „A1” és „A2” klaszterek közötti hasonlóság 84,6% volt, még a C1 és C2 klaszterek között 86,3%.

Az A1 rokonsági csoportba 19 beteg 26 izolátuma tartozott (17. és 25. ábra). Az izolátumok többsége a Neurológiai ITO-ról (15/26), valamint a Gyermek ITO-ról (7/26) származott. A klaszter tagjainak fenotípusát a karbapenem érzékenység, valamint a ciprofloxacín, amikacín és tobramycín rezisztencia jellemezte. Az izolátumok körében igen magas arányban fordultak elő foszfortranszferázt kódoló gének: *aph(3')-Ia* (20/26), *aph(3')-VIa* (13/26). Egyéb karbapenemáz és aminoglikozid rezisztenciát biztosító gént nem mutattunk ki. Minden egyes

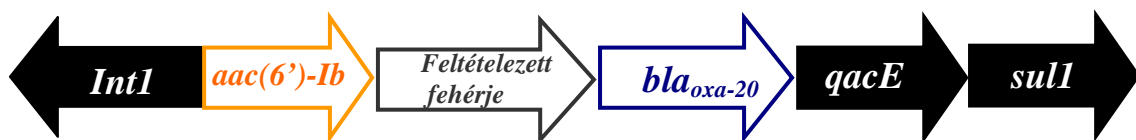
izolátum hordozott I. típusú integront, melynek a variábilis régiójában egy *aac(6')-Ib* gén, egy feltételezett fehérje, valamint egy *bla_{OXA-20}* gén volt (In426; 18. ábra).

Az „A2” klaszterbe hét izolátum tartozott, amely négy betegtől származott (17. és 25. ábra). A hét izolátumból hat a Sebészeti Intenzív Osztályról tenyésztett ki, egy izolátum pedig az Idegsebészeti Intenzív Osztályról. Az Neurológiai ITO-ról származó törzset kivéve mindegyik multirezisztens kórokozó volt, és csak polymyxinekre voltak érzékenyek. A *bla_{OXA-51-like}* gén mellett mindegyik hordozott *bla_{OXA-23-like}* gént is. Az aminoglikozid rezisztencia géneknek (*aph(3')-Ia*, *aph(3')-VIa*) a megoszlása hasonló volt az „A1” klaszteréhez, azonban I. típusú integront egyik izolátum sem hordozott.



17. ábra

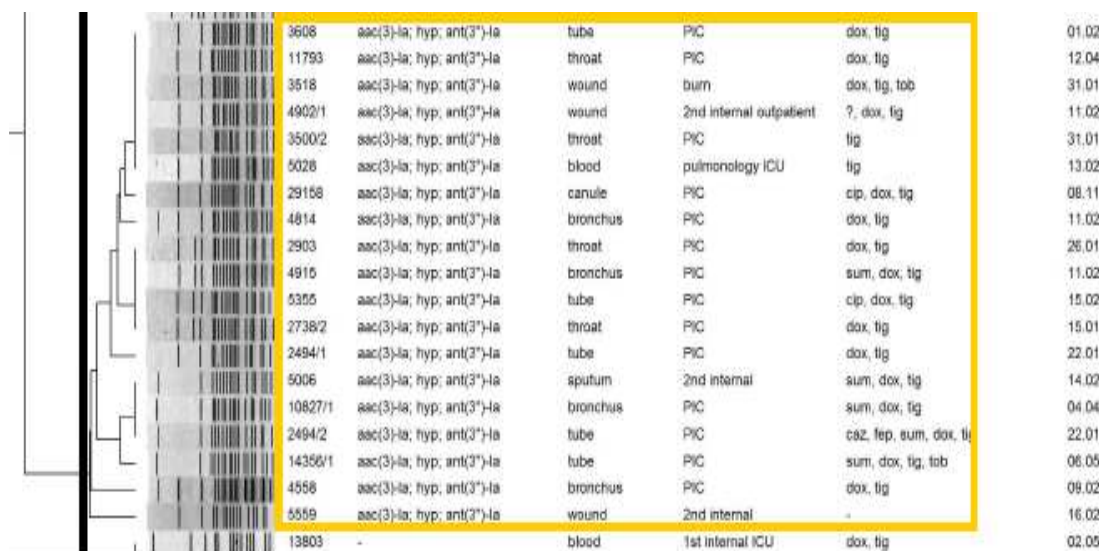
Az „A1” és „A2” klaszterbe tartozó *A. baumannii* izolátumok



18. ábra

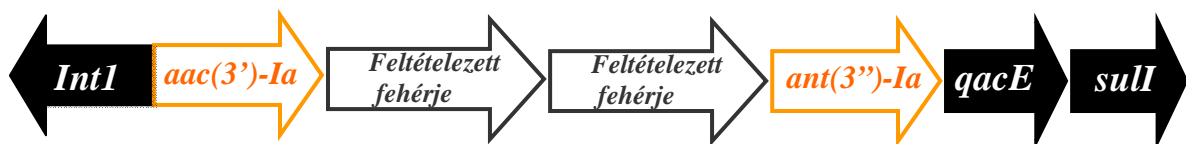
Az „A1” klaszterben azonosított integron (In426) variábilis régiójában lévő rezisztencia gének

A „B” klaszterbe 19 izolátum tartozott, melyeket 11 beteg mintájából izoláltunk (19. és 25. ábra). Az izolátumok többsége (14/19) a Perinatális Intenzív Centrumból (PIC) származott. A rezisztencia fenotípusát a karbapenem és aminoglikozid rezisztencia jellemezte. Az „A2” klaszterhez hasonlóan, *bla*_{OXA-51-like} és *bla*_{OXA-20-like} gének egyszerre voltak jelen. Az *aph(3')-Ia*, *aph(3')-VIa* gének mellett egy harmadik aminoglikozid rezisztencia gén, az *ant(3')-Ia* is kimutatható volt, amely egy nukleotidil-transzferázt kódol. A csoport minden egyes tagja hordozott I. típusú integront, amelynek a variábilis régiójában két aminoglikozid rezisztencia gén (*aac(3)-Ia*, *ant(3'')-Ia*) és két feltételezett proteint volt (In561; 20. ábra).



19. ábra

A „B” klaszterbe tartozó *A. baumannii* izolátumok

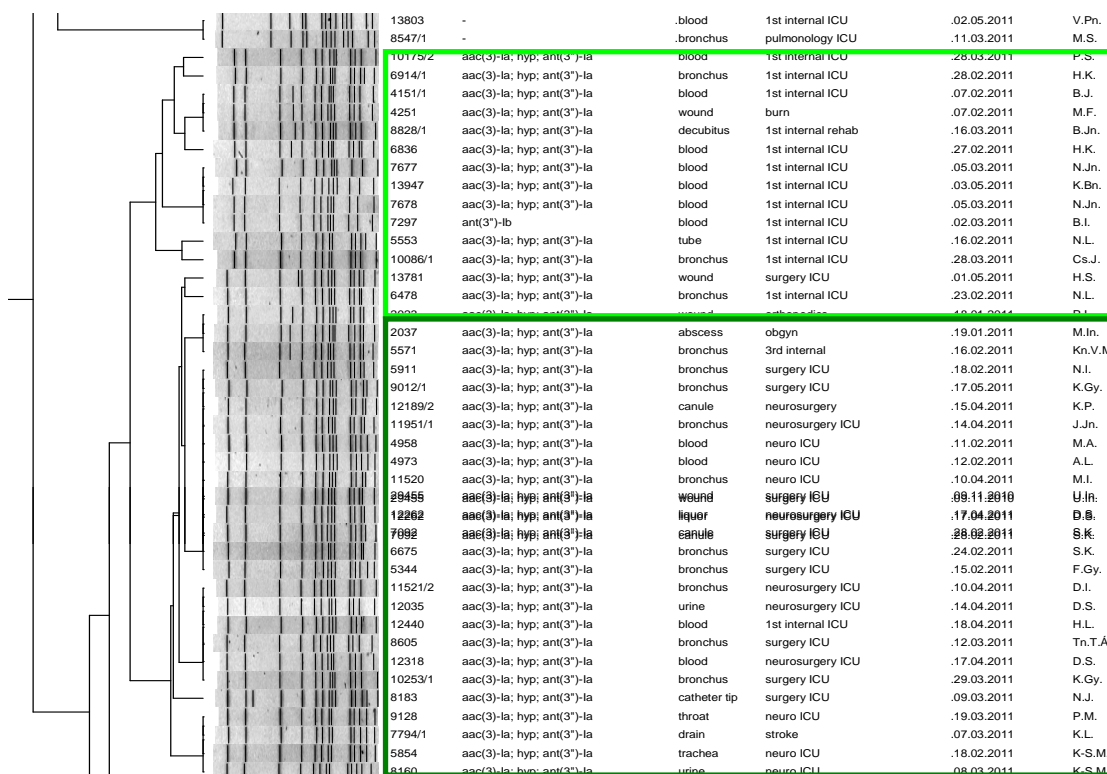


20. ábra

A „B” klaszterben azonosított integront (In561) variábilis régiójában lévő rezisztencia gének

A „C1” rokonsági csoportba tíz beteg 12 izolátuma tartozott (21. és 25. ábra). Egy izolátum kivételével, mindegyik az I. Belgyógyászati Klinika Intenzív Osztályáról származott, és 10 közülük *in vitro* érzékeny volt doxycyclinre, tigeccyclinre és polymyxin-B-re, egy pedig csak polymyxin-B-re. A *bla_{OXA-51-like}* és *bla_{OXA-23-like}* gének együttes hordozása volt megfigyelhető ebben a csoportban is. A fent említett klaszterekhez hasonlóan, ugyanazok az aminoglikozid rezisztencia gének (*aph(3')-Ia*, *aph(3')-VIa*) fordultak elő minden egyes tagnál. Mindegyik izolátum hordozott I. típusú integront. Tizenegy izolátum esetében a variábilis régióban hordozott géneknek a mintázata megegyezett a „B” klaszterben azonosított mintázattal (In561; 20. ábra). Egy izolátum integronjának variábilis régiójában *ant(3'')-Ib* gén volt azonosítható (In127; 22. ábra).

A „C2” klaszterbe 29 izolátum tartozott 24 betegtől (21. és 25. ábra). Az izolátumok eredete nagyon változatosan alakult. Tizenegy a Sebészeti ITO-ról, hat az Idegsebészeti ITO-ról, másik hat a Neurológiai ITO-ról, két izolátum I. számú Belgyógyászati ITO-ról származott, a maradék négy pedig más fekvőbeteg osztályokról. Az antibiotikum érzékenység nagyon eltérő volt klaszteren belül. Míg a Neurológiai ITO-ról származó izolátumok mindegyike érzékeny volt karbapenemre, addig más osztály izolátumai csak doxycyclinre, tigeccyclinre és polymyxin-B-re voltak érzékenyek. A rezisztencia gének eloszlása nagyon hasonló volt a „C1” klaszter esetén található, azzal a kivétellel, hogy hat karbapenem érzékeny izolátum (Neurológiai ITO) esetében hiányzott a *bla_{oxa23-like}* gén. Az I. típusú integronnak a struktúrája teljesen megegyezett a „C1” klaszterben azonosított integronéval (In561; 20. ábra).



21. ábra

A „C1” és „C2” klaszterbe tartozó *A. baumannii* izolátumok



22. ábra

A „C1” klaszter egyetlen izolátumában azonosított integron (In127) variábilis régiójában lévő rezisztencia gén

A „D” klaszter képviselte a legnagyobb rokonsági csoportot. Ide összesen 63 izolátum (56 betegtől) tartozott (24. és 25. ábra), és az izolátumok 79,3%-a (50/63) a Tüdőgyógyászati ITO-ról származott, a maradék tizenhárom pedig más fekvőbeteg osztályokról [I. számú Belgyógyászati Osztály (8); I. Belgyógyászat ITO (3); Sebészeti ITO (2); egyéb osztály (3)]. Az izolátumok többsége csak tigeicyclinnel és polymyxin-B-vel szemben volt érzékeny. A legtöbb rezisztencia gén ebben a csoportban volt megtalálható. Mindegyik izolátumban előfordult a *bla_{oxa-23-like}*, a *bla_{oxa-51-like}* és az ISAb_a-1 inzerációs szekvencia, valamint az *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *ant(3'')-Ia*, *aph(3')-VIa* és *aac(3')-Ia* gének. Mindezek mellett az izolátumok 30,2% (19/63) hordozott egy 16S RNS metilázt kódoló gént (*armA*). Az izolátumok által

hordozott I. típusú integron variábilis régiójában a két aminoglikozid rezisztencia gén (*aac(6')-Ib*, *ant(3')-Ia*) mellett egy klóramfenikol acetiltranszferázt (*catB8*) kódoló gént azonosítottunk (23. ábra).



23. ábra

A „D” klaszterben azonosított integron (In439) variábilis régiójában lévő rezisztencia gének

1207/2	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	decubitus	2nd internal	tig
6076/2	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	drain	orthopedics	cat, tig
1249	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	2nd internal ICU	-
2410	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	wound	2nd internal	tig
8689	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	sputum	pulmonology ICU	tig
1417	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	urine	1st internal ICU	-
4488	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	-
4335	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	blood	pulmonology ICU	dot, tig
3987	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
2612	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
11412/1	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	dot, tig
7983	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
4858	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
11959	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	urine	2nd internal	-
4956	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	- v tig
6279/1	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
4695	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	-
6109	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	canule	2nd internal	tig
5031	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
12580	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	decubitus	1st internal	dot, tig
5679	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	dot, tig
4564	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
4186/2	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
4184	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
12793	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	trachea	2nd internal ICU	tig
4930/1	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	blood	pulmonology ICU	tig
4696	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	-
5291	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
4282/1	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	blood	pulmonology ICU	tig
8264/2	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	wound	pulmonology ICU	tig
5677	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
5029	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	canule	pulmonology ICU	tig
7756	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
4183	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
6911	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
6996	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	blood	pulmonology ICU	tig
4284/1	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	blood	pulmonology ICU	tig
11906	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
5289	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
4963	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	canule	pulmonology ICU	tig
4957	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
6266	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
5678	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	dot, tig
5288	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
3421/2	aac(3)-la; hyp; ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
8014	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	surgery ICU	tig
6018	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
3088	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
8476/1	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	wound	cardiology	cip, sum, tig
5678	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	dot, tig
2801	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
6994	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	canule	pulmonology ICU	tig
5030	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
3514	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	canule	pulmonology ICU	tig
11578/1	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
8419	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
6020	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	canule	pulmonology ICU	tig
4929	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
2384/1	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	bronchus	pulmonology ICU	tig
5072	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	pleura	pulmonology ICU	tig
8265	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	wound	pulmonology ICU	tig
8188	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	canule	2nd internal ICU	tig
5970	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	ear	NIC	tig
6993	aac(6)-lb-catBB-ant(3 ⁺)-la	canule	pulmonology ICU	tig

24. ábra

A „D” rokonsági csoportba tartozó *A. baumannii* izolátumok

A közös rokonsági csoportba nem tartozó, független izolátumok száma négy volt. A sebészeti ITO-ról származó izolátum 86,6%-os hasonlóságot mutatott az „A2” klaszter tagjaival, azonban még egy további aminoglikozid rezisztencia gént (*aac(6’)-Ib*) is hordozott. Az a két izolátum, amelyik teljesen azonos mintázatot mutatott, de különböző fekvőbeteg osztályról származott (Tüdőklinika ITO, I. Belgyógyászati ITO), kiterjedt antibiotikum rezisztenciával rendelkezett és csak tigeicyclinnel, valamint polymyxinnel szemben volt érzékeny. Ez a két izolátum a *bla_{oxa51-like}* gén mellett egy *bla_{oxa24-like}* gént is hordozott, I. típusú integront azonban nem. A negyedik izolátum szintén kiterjedt rezisztenciával rendelkezett. A rezisztencia géneinek mintázata hasonló volt a „D” klaszter tagjainak mintázatával azzal a különbséggel, hogy az *aph(3’)-Ia* és az *armA* gének nem voltak jelen. Az általa hordozott I. típusú integron szintén megegyezett a „D” csoportéval.

V.2.5. Klaszterek megoszlása a különböző fekvőbeteg osztályok között

A Neurológiai Klinikáról származó összes izolátum - egyet kivéve - érzékeny volt karbapenemre. Más fekvőbeteg osztályokat a karbapenem rezisztens *A. baumannii* törzsek uralták ($p < 0,001$). Az egyes klaszterekben az izolátumok többsége egy vagy kétféle fekvőbeteg osztályról származott. Például az „A1” klaszter izolátumai a Neurológiai és Gyermekklinika ITO-ról származó mintákból tenyésztettek ki, míg az „A2” klaszterbe tartozók a Sebészeti Klinika ITO mintáiból. A „B” klaszterbe tartozó izolátumoknak a többsége a PIC-ről származott. Az I. számú Belgyógyászati Klinikáról származó izolátumok a „C1” klaszterben, míg a Sebészeti - és Neurológiai Klinika ITO -ról származó izolátumok a „C2” klaszterben voltak dominánsak. A legnagyobb klasztert („D”) képviselő izolátumok nagy része a Tüdőklinikáról származott. A klaszterek megoszlása szignifikáns eltérést mutatott a különböző osztályokon ($p < 0,0001$).

V.2.6. Összefüggés vizsgálata az antibiotikum felhasználás, a prevalencia, és a rezisztencia kialakulása közötti

A 2000-2008 között az *A. baumannii* prevalenciájában számottevő változás nem volt megfigyelhető, a kitenyésztett baktériumoknak az 1%-t tette ki. Azonban 2009-ben és 2010-ben hirtelen megnövekedett a baktérium prevalenciája és az összes pozitív mintáknak már a 2,3%-ában, valamint 2,5%-ában volt kimutatható. Hasonló növekedés volt tapasztalható a pozitív vérminták esetén is, itt 1-2%-ról 4,4%-ra emelkedett a prevalencia. Ezzel párhuzamosan a 2002 és 2012 között gyűjtött adatok azt mutatják, hogy az *A. baumannii* okozta fertőzések kezelésében az elsőként választandó karbapenemekkel szembeni rezisztencia tízszeresére nőtt, mivel 2000 és 2010 között 6,3%-ról 63,8%-ra emelkedett és 2011-re pedig már 73,0% is elérte.

A kereszt-korrelációs elemzés alapján a karbapenem fogyás körülbelül 2 éves késéssel követte a III. generációs cefalosporin alkalmazást (9 negyedéves késés; $r = 0,63$; $p < 0,001$), és 1 éves késéssel pedig a piperacillin+tazobactam felhasználást (4 negyedéves késés; $r = -0,54$; $p < 0,001$). Szignifikáns időbeli összefüggés volt kimutatható a karbapenem felhasználás és a polymyxin felhasználás között is. A polymyxin felhasználás öt negyedévvvel később követte a karbapenem felhasználást ($r = 0,80$, $p < 0,001$). Más antibiotikum csoportok felhasználása között szignifikáns összefüggés nem volt kimutatható.

Az *A. baumannii* prevalenciája, valamint karbapenemekkel szembeni rezisztenciája az idősor analízis alapján összefüggésben állt a III. generációs cefalosporin, karbapenem és colistin felhasználással, de más antibiotikum felhasználásával nem. A pozitív minták és a Gram-

negatív baktériumok között az *A. baumannii* prevalenciájának növekedése 3-4 éves késéssel követte a III. generációs cefalosporin felhasználást (13 negyedéves késés $r=0,55-0,77$, $p<=0,001$, minden esetben), míg az *A. baumannii* pozitív betegek esetében ez az idő 3,5 év volt (14 negyedéves késés; $r=0,58$, $p<0,001$). Ez az összefüggés azonban indirekt, mivel a karbapenem felhasználás 9 negyedéves késéssel követte a III. generációs cefalosporin felhasználást. A 9 hónappal korábban felhasznált karbapenem (3 negyedéves késés; $r=0,53$, $p<0,001$) az *A. baumannii* előfordulásának növekedéséhez vezetett az összes pozitív minta és az összes pozitív vérminta esetében. Az elemzés során, a Gram-negatív baktériumok körében az *A. baumannii* arányában bekövetkező növekedés késleltetési ideje valamivel hosszabb volt (-5 negyedéves késés, $r=0,53$, $p<0,001$). Az *A. baumannii* prevalenciájának növekedése más antibiotikum felhasználással (fluorokinolonok, piperacillin+tazobactam, III. generációs cefalosporin) nem korrelált.

A karbapenem rezisztencia két és fél éves késéssel követte a karbapenem felhasználást (9 negyedéves késés; $r=0,43$, $p=0,005$), viszont más antibiotikum felhasználással szintén nem lehetett összefüggésbe hozni.

A karbapenemek közül a meropenem és az ertapenem felhasználás mutatott időbeli összefüggést az *A. baumannii* prevalenciájával, valamint karbapenem rezisztenciájával. A prevalenciában és a karbapenem rezisztenciában észlelt növekedés 1-1,5 év késéssel (4-8 negyedéves késés; $r=0,45-0,49$, $p=0,002-0,006$, illetve $r=0,44$, $p=0,007$) követte a meropenem fogyást. Hasonló összefüggés volt tapasztalható az *A. baumannii* pozitív betegek prevalenciája és a meropenem felhasználása között is (2 negyedéves késés; $r=0,39$, $p=0,01$). Az ertapenem felhasználás esetében a prevalenciában tapasztalt növekedés rövidebb késéssel követte az ertapenem fogyást (1-5 késés, $r=0,54-0,58$, $p<0,001$), míg a karbapenem rezisztencia és az *A. baumannii* pozitív betegek száma/100 ápolási nap hat negyedéves késéssel követte azt ($r=0,42$, $p=0,009$). Érdekes, hogy miközben az imipenem felhasználás az előző két karbapenemhez hasonlóan nőtt, mégsem befolyásolta az *A. baumannii* prevalenciáját és karbapenem rezisztenciáját (26. ábra). A karbapenem rezisztens *A. baumannii* számában bekövetkező emelkedést egy negyedév késéssel követte a colistin felhasználás (1 negyedéves késés; $r=0,68-0,70$, $p<0,001$; $r=0,58$, $p<0,001$).

V.2.7. Különbségek az antibiotikum felhasználásban, prevalenciában és karbapenem rezisztenciában fekvőbeteg osztályonként

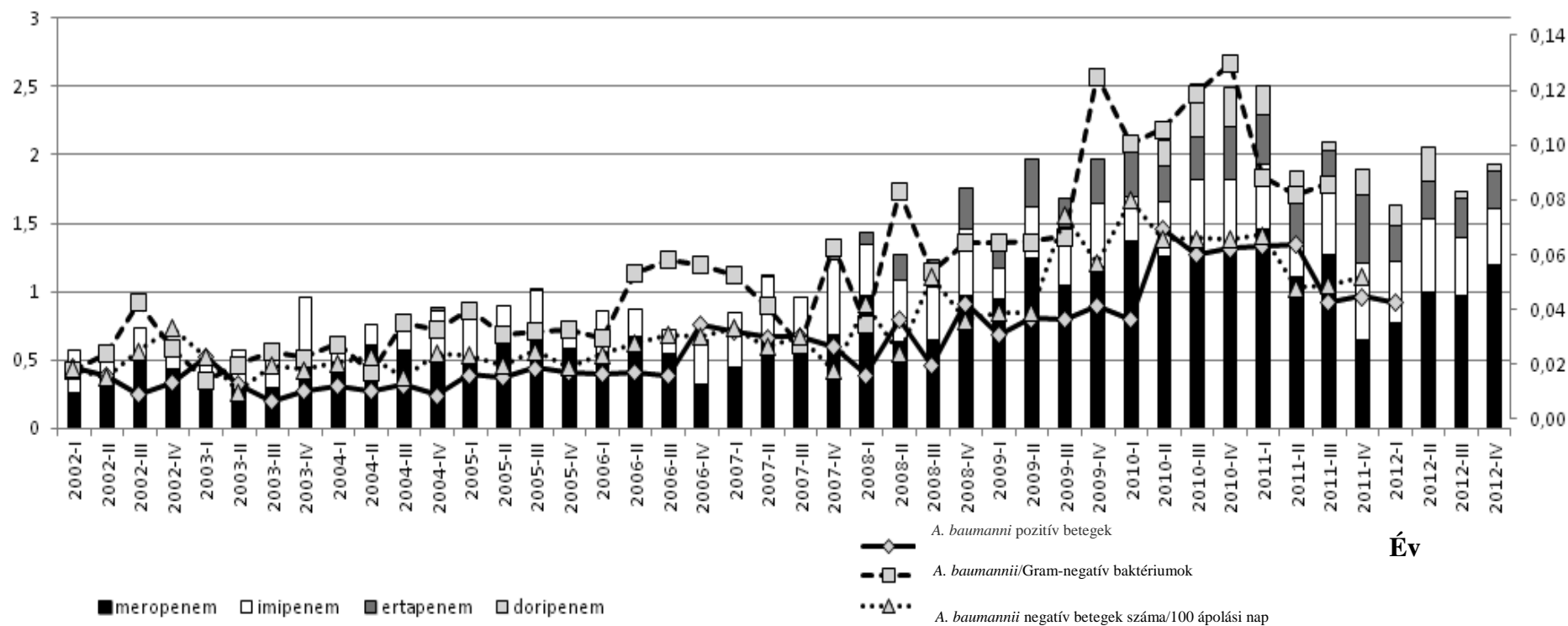
A karbapenem felhasználás a Sebészeti Klinika és a Tüdőklinika ITO-ján volt a legmagasabb, meghaladta az egyetemi átlagot is. Ezzel szemben a I. számú Belgyógyászati Klinika,

Gyermekklinika és a Neurológiai Klinika ITO-ja jóval kevesebb karbapenemet használt (27. ábra). A Sebészeti Klinika ITO-ján a karbapenem felhasználás szignifikánsan magasabb volt ($p=0,001-0,018$), míg a Neurológiai Klinika ITO-ján szignifikánsan alacsonyabb ($p=0,010-0,026$) a többi osztályhoz viszonyítva. Más osztályokkal ellentétben - ahol a meropenem felhasználás a karbapenem kumulatív dózisának 54.6-89.0% tette ki - a meropenem kevésbé preferált antibiotikumok közzé tartozott a Sebészeti Klinika és az Tüdőklinika ITO-ján (37,5% és 33,5%-a volt az összes karbapenem kumulatív dózisának). Ez a különbség is statisztikailag szignifikáns volt ($p=0,002-0,041$). A meropenemmel ellentétben az ertapenem népszerű volt az utóbb említett két ITO-on. Az imipenem felhasználás a Sebészeti Klinika és a Gyermekklinika ITO-ján volt a legjelentősebb.

A karbapenem mellett az *armA* előfordulásának hátterében álló tényezők felderítése érdekében megvizsgáltuk az aminoglikozidok felhasználásában mutatkozó különbségeket is. A kereszt-korrelációs elemzések során azt tapasztaltuk, hogy az összes aminoglikozid felhasználás a Tüdőklinikán volt a legmagasabb ($p=0.002-0.041$), ahol az *armA* hordozó izolátumok aránya szignifikánsan nagyobb volt.

A karbapenem rezisztens *A. baumannii* aránya nagyon magas (0,62-1,03 *A. baumannii* pozitív beteg száma/100 ápolási nap) volt a Sebészeti Klinika, a Tüdőklinika, az I. Belgyógyászati Klinika, az Idegsebészeti Klinika ITO-ján, a PIC-en, valamint más fekvőbeteg osztályokon. Azonban az Idegklinika és a Gyermekklinika ITO-ján a karbapenem rezisztens törzsek prevalenciája szignifikánsan alacsonyabb volt ($p>0,001-p=0,002$; $p=0,001-0,029$) a fent említett osztályokhoz viszonyítva (28. ábra).

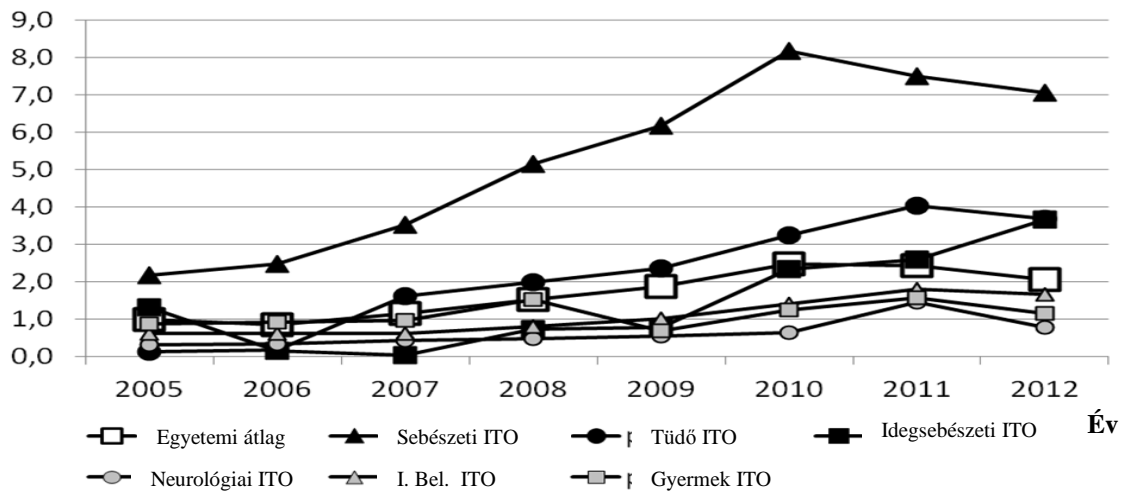
DDD/100 ápolási napra vonatkoztatva



26. ábra

Az összes karbapenem fogyasztásának megoszlása 2002 és 2012 között. A prevalencia adatokat az idősor analízis során kapott késleltetési idővel eltolva ábrázoltuk.

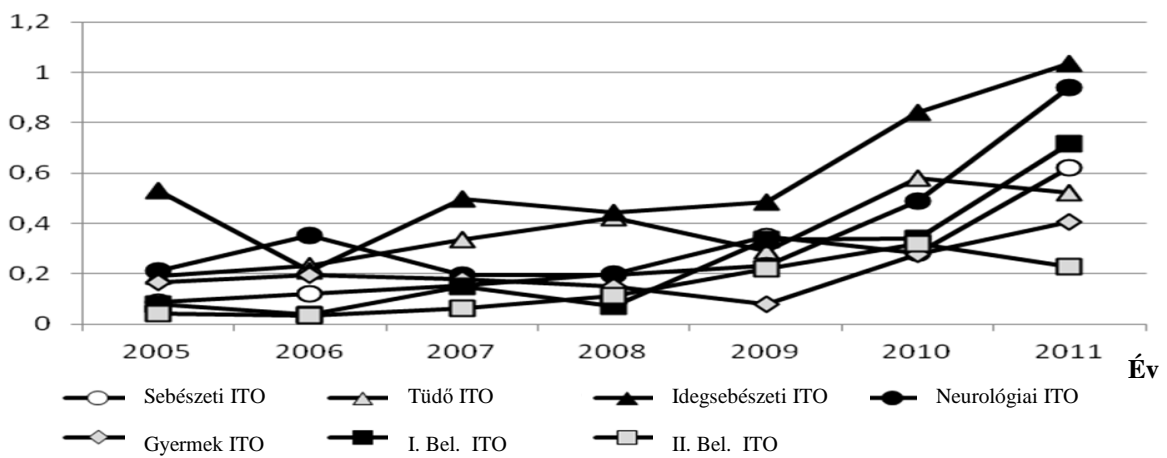
DDD/100 ápolási nap



27. ábra

A karbapenem fogyasztás alakulása klinikánként 2005 és 2012 között

A. baumannii pozitív beteg száma/100 ápolási nap



28. ábra

Az A. baumannii izolátumok arányának változása klinikánként 2005 és 2011 között

VI. Megbeszélés

A multirezisztens kórokozók endémiás előfordulása, valamint az általuk okozott hosszabb-rövidebb ideig fennálló járványok kialakulása az antibiotikum felhasználás által kifejtett szelekciós nyomásnak is tulajdonítható. Ezt az összefüggést számos kutatási eredmény is igazolja a Gram-pozitív és Gram-negatív kórokozók körében. Az első ilyen összefüggésről 1990-ben Mouton és munkacsoportja számolt be. Az eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a profilaktikus kezelések során alkalmazott cloxacillin és a terápiás céllal adott cefalosporinok a meticillin-rezisztens koaguláz negatív *Staphylococcusok* kiszelektálásához vezettek (Mouton és mtsai, 1990). Egy holland kutatócsoport az *E. coli* által okozott húgyúti infekciók kezelésére alkalmazott norfloxacin, amoxicillin, trimetoprim, nitrofurantoin fogyaszt és a szerekkel szembeni rezisztenciát vizsgálva azt tapasztalta, hogy a norfloxaccinnal szembeni rezisztencia arány 4,5-szeresére emelkedett, míg a multirezisztencia aránya nyolcszorosára. Mindezek mellett a felhasznált fluorokinolonok mennyisége szignifikáns összefüggést mutatott a fluorokinolon rezisztens *E. coli* törzsek megjelenésével (Goettsch és mtsai, 2000).

Az elmúlt 15 évben a helyzet nem sokat változott, sőt inkább tovább súlyosbodott és a kontrollálatlan antibiotikum felhasználásnak köszönhetően megnövekedett a MDR és XDR törzsek által okozott endémiás járványok száma (Souli és mtsai, 2008; Goel és mtsai, 2011; degli Atti és mtsai, 2014; McLaughlin és mtsai, 2014; Watal és mtsai, 2014). Egy tajvani munkacsoport azt találta, hogy a cefotaxim és ciprofloxacinnal szembeni rezisztens *E. coli* törzsek, valamint a meropenem-rezisztens *P. aeruginosa* törzsek előfordulása szignifikáns összefüggést mutat a széles spektrumú cefalosporinok, karbapenemek, aminoglikozidok és fluorokinolonok fogyasztásával. A ciprofloxacinnal szembeni rezisztens *K. pneumoniae* és meropenem rezisztens *A. baumannii* előfordulása szintén korrelált a széles spektrumú cefalosporinok felhasználásával (Hsueh és mtsai, 2005). Suarez és munkatársai hasonló eredményre jutottak MDR *P. aeruginosa* által okozott járvány esetében. A kétezres évek elejétől folyamatosan emelkedett a karbapenem-rezisztens *P. aeruginosa* izolátumok aránya, majd 2005-2008 között progresszív növekedés volt kimutatható a multirezisztens *P. aeruginosa* törzsek számában, melynek hátterében főként a széles spektrumú antibiotikumoknak (β -laktámok, aminoglikozidok, fluorokinolonok) a használata állt (Suarez és mtsai, 2011). Xu és munkatársai által végzett vizsgálatban a karboxipenicillinekkal, ureidopenicillinekkal, laktamázgátlóval kombinált penicillinekkal, cefalosporinokkal, fluorokinolonokkal és

aminoglikozidokkal szembeni rezisztencia arány 2003-ban 8-10% között volt, de 2011-ben már 40-60% közé emelkedett az *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* komplex törzsek körében. A karbapenem rezisztens izolátumok arányában közel ötszörös emelkedést tapasztaltak (11,3%-ról 59,1%-ra), mely a karbapenem felhasználással erős korrelációt mutatott (Xu és mtsai, 2013).

A terápia során a választandó antibiotikumokkal szembeni rezisztenciától tartva a széles spektrumú antibiotikumok használata egyre fokozódik, ami a rezisztencia további fokozódását eredményezi, egy rezisztencia spirált hozva létre. Ilyen rezisztencia spirál volt megfigyelhető 1970-97 között, amikor a meticillin és más laktamázstabil penicillinek felhasználását követően a kisselektálódott MRSA által okozott fertőzéseknek az aránya drasztikusan emelkedett, és ezzel párhuzamosan nőtt a vancomycin felhasználás. A fokozott vancomycin fogyasztásnak köszönhetően kezdetben megjelentek a VISA törzsek, majd 1997 után a VRSA-k (Hiramatsu, 2001; Hawkey, 2008). Hasonló jelenség a Gram-negatív baktériumok körében is tapasztalható volt. A III. generációs széles spektrumú cefalosporinok alkalmazása (cefotaxim, ceftazidim) az ESBL-termelő törzsek szelekciójához vezetett, melynek eredményeképpen nőtt a karbapenemeknek a felhasználása (Hawkey, 2008; Rafay és mtsai, 2007; Urbánék és mtsai, 2007).

Jelen tanulmányunk hasonló szituációról számol be. Az antibiotikum felhasználás 2006-tól emelkedő tendenciát mutatott. Ennek hátterében főleg a széles spektrumú antibiotikumoknak az alkalmazása állt, mint a III. generációs cefalosporinok, a fluorokinolonok, valamint 2008-tól a karbapenemek. A III. generációs cefalosporinok túlzott alkalmazása az ESBL-termelő törzsek megjelenését segítette elő, melynek következményeként emelkedett a karbapenem felhasználás a klinikáinkon (még nem publikált adat). A karbapenemek fokozott felhasználásával párhuzamosan nőtt az *A. baumannii* prevalenciája, valamint a karbapenemekkel szembeni rezisztenciája: a karbapenemekkel szembeni rezisztencia 10 év alatt közel tízszeresére emelkedett. Ez az eredmény összhangban van a szakirodalomban található adatokkal, melyek szerint az *A. baumannii* esetében megjelenő karbapenem rezisztencia a III. generációs cefalosporin és karbapenem túlzott használatának az eredménye (Cisneros és Rodríguez-Baño, 2002; Goel és mtsai, 2011; Iosifidis és mtsai, 2008, Manikal és mtsai, 2000). Egyetemünkön az XDR *A. baumannii* fenotípus terjedése miatt a colistin felhasználás gyors és nagymértékű fokozódását figyeltük meg, ez igen rövid látenciával követte a rezisztens törzsek terjedését. A fokozódó felhasználás miatt fennáll a veszélye a colistin rezisztencia kialakulásának és terjedésének, nemcsak az *A. baumannii*, hanem más

Gram-negatív nozokomiális kórokozók körében is, ami PDR törzsek kialakulásához és elterjedéséhez vezethet.

A karbapenemek fogyása eltérő mértékben befolyásolta a rezisztencia alakulását *A. baumannii* esetében. Míg az imipenem fogyás kevésbé befolyásolta, addig a meropenem és különösen az ertapenem fogyás szignifikáns összefüggésben állt nemcsak az *A. baumannii* karbapenem rezisztenciájának fokozódásával, de az *A. baumannii* prevalenciájának növekedésével is. Ez az összefüggés összhangban van azzal a megfigyeléssel, mely szerint az imipenem *in vitro* valamivel hatékonyabb az *A. baumannii* által okozott fertőzések kezelésében, mint a meropenem vagy az ertapenem (MacGowan és mtsai, 1995; Villar és mtsai, 1997). Ennek az a magyarázata, hogy az imipenem a kationos jellege miatt, az OprD által képzett csatornán keresztül nagy koncentrációba jut be a periplazmatikus térbe, ezáltal a baktericid hatása jobban tud érvényesülni (Hammond, 2004).

A fokozódó prevalencia és karbapenem rezisztencia közvetlen kapcsolatban állt az intenzív osztályok által felhasznált karbapenem antibiotikumok mennyiségével. Az Idegklinika ITO-ján - ahol a karbapenem fogyasztás szignifikánsan alacsonyabb volt a többi klinikához képest és ertapenemet szinte egyáltalán nem alkalmaztak - az *A. baumannii* izolátumok nagy része karbapenem érzékeny volt. A karbapenem felhasználás jóval az egyetemi átlag felett volt a Sebészeti Klinika és Tüdőklinika ITO-ján 2005 és 2012 között, és a mintákból kitenyészett összes izolátum rezisztens volt karbapenemmel szemben. Ezek az intenzív osztályokon a preferált karbapenem antibiotikum az imipenem mellett az ertapenem volt. Vainio és munkatársai által végzett *in vitro* vizsgálatban az ertapenem szintén jó provokáló szernek bizonyult (42-72 óra elteltével) a karbapenemekkel szembeni rezisztencia indukálásában *P. aeruginosa* izolátumok esetében (Vainio és mtsai, 2013).

Az elmúlt évek folyamán, az alternatív terápiaként alkalmazható aminoglikozid antibiotikumok felhasználása a karbapenemek alkalmazásában tapasztaltnál hasonló emelkedést mutatott. Az aminoglikozid fogyás a Tüdőklinika ITO-ján volt a legmagasabb, ahol a terápia során az amikacint alkalmazták a leggyakrabban, ami így az összes aminoglikozid fogyás 50%-át tette ki. Az aminoglikozidok felhasználásának növekedésével párhuzamosan nőtt az aminoglikozidokkal szembeni rezisztencia a *P. aeruginosa* (*aac(6')-Ib*) és *A. baumannii* (*ArmA*) izolátumok esetében (amikacin rezisztencia 18,3%-ról 76,6%-ra, tobramycin rezisztencia 31,3%-ról 62,7%-ra, a gentamicin rezisztencia 42,1%-ról 80,8%-ra nőtt). Az 1980-as évek előtt a Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzések kezelésében az aminoglikozid antibiotikumok közül elsődlegesen a gentamicint alkalmazták. A gentamicin felhasználásnak eredményeként nőtt a szerrel szembeni rezisztencia, majd amikor a

gentamicinról amikacinra váltottak csökkent a gentamicinnel, valamint tobramycinnel szembeni rezisztencia (Betts és mtsai, 1984; Gerding és mtsai, 1991). Miután az amikacin hatására a gentamicin rezisztencia plazmidok eltűntek a baktériumokból, a gentamicin újra hatásosnak bizonyult a fertőzések kezelésében, viszont az amikacinnal szembeni rezisztencia fokozódott (Gerding és mtsai, 1991).

A tapasztalatok azt mutatják, hogy rövidtávon az antibiotikumok felhasználásában bekövetkező változásokat követik a rezisztenciában bekövetkező változások (Gerding, 2000). A rezisztencia terjedését egyazon családba tartozó különböző szerek eltérő mértékben befolyásolják (ertapenem vs. imipenem, amikacin vs. gentamicin). A rezisztencia mérséklésének tehát az aminoglikozidok esetében egyik lehetséges megoldása az aminoglikozidok felhasználásának diverzifikálása lehetne, vagyis csökkenteni az amikacin fogyasztást és növelni a tobramycin és gentamicin felhasználás arányát.

Az antibiotikum rezisztencia és a klonalitás közötti kapcsolat az aminoglikozidok, illetve a karbapenemek szerepére utaltak a sikeres klónok fennmaradásában és terjedésében. A molekuláris epidemiológiai vizsgálatok alapján a karbapenem, illetve aminoglikozid rezisztencia nemcsak egyetlen klónhoz köthető. A *P. aeruginosa* esetében az amikacin rezisztencia az acetiltranszferázt kódoló *aac(6)-Ib* gén, az *A. baumannii* izolátumok esetében a karbapenem rezisztencia pedig a karbapenemázt kódoló *bla_{oxa23-like}* gén megszerzésének köszönhető, melyet az összes rezisztens klón hordozott, hasonlóan korábbi tanulmányokhoz (Bogaerts és mtsai, 2008; Fonseca és mtsai, 2013; Galimand és mtsai, 1993; Mugnier és mtsai, 2010; Ploy és mtsai, 1994). Az ugyanazon (C2) klaszterbe tartozó karbapenem érzékeny és karbapenem rezisztens *A. baumannii* izolátumok a *bla_{oxa23-like}* gén hordozásában különböztek egymástól. A legtöbb karbapenem érzékeny izolátum a Neurológiai Klinikáról származott, ahol a karbapenem felhasználás szignifikánsan alacsonyabb volt. Azok a betegek, akiknek az izolátumai 16S rRNS metilázt kódoló *armA* gént hordoztak, a Tüdőklinika ITO-ján feküdtek, ahol az aminoglikozid felhasználás a legmagasabb volt a vizsgált klinikák között. A *P. aeruginosa* okozta fertőzések kezelésére az aminoglikozidok közül az amikacint alkalmazták nagy mennyiségben. A legelterjedtebb „A” klaszterbe tartozó izolátumok mindegyike *aac(6)-Ib* gént hordozott, mely az amikacinnal szemben biztosít rezisztenciát: az ilyen izolátumokkal fertőzött betegek csoportja szignifikánsan több amikacint kapott, mint azok a betegek, akik más izolátumokkal fertőződtek. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az antibiotikum használat okozta szelekciós nyomás közvetlenül elősegíti a rezisztencia gének horizontális transzfer útján való terjedését (Dzidic és Bedeković, 2003).

Az integron hordozás szoros kapcsolatban áll az aminoglikozid és karbapenem rezisztenciával (Gallego és Towner, 2001; Houang és mtsai, 2003; Touati és mtsai, 2013; Gijón és mtsai, 2013; Khosravi, 2013). Ennek megfelelően a *P. aeruginosa* és *A. baumannii* izolátumok döntő többsége I. típusú integront hordozott. Más Gram-negatív baktériumok (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Shigella*, *Proteus ssp.*) körében is elterjedt az integronoknak a hordozása és az I. típus a leggyakoribb (Bhattacharjee és mtsai, 2010; Dawes és mtsai, 2010; Liu és mtsai, 2013; Yang és mtsai, 2014). Az izolátumokban megtalált és azonosított integronok variábilis régiójukban valamilyen β -laktámmal vagy aminoglikoziddal szemben rezisztenciát biztosító gént hordoztak, amelyek a fentiek alapján szerepet játszhattak a törzsek sikeres perzisztenciájában. A perzisztenciához hozzájárulhat az I. típusú integronok esetében a 3' konzervatív régióban hordozott kationos detergens fertőtlenítőszerrel szembeni rezisztenciát kódoló gén is (Rosser és Young, 1999).

Az irodalomban számos tanulmány található arra vonatkozóan, hogy a sikeres klónok perisztenciájában - az antibiotikum rezisztencia hordozása mellett - fontos szerepe lehet a kórokozók virulencia faktorainak is (Mnif és mtsai, 2013; Olesen és mtsai, 2014; Rhaski, 2014; Silva, 2012; Sullivan és mtsai, 2014). Emiatt jelen tanulmányban is megvizsgáltuk az összefüggést a virulencia faktorokat kódoló gének hordozása és a sikeres klónok perisztenciája között *P. aeruginosa* izolátumok körében. Az *A. baumannii* virulenciájáról igen keveset tudunk, eddig egyetlen virulencia faktornak tartott tényezőről sem bizonyították, hogy a kórházi törzsek virulenciájában szerepe van. A virulencia gének megoszlása érdekes kérdést vet fel a *P. aeruginosa* által okozott fertőzések patogenezisében. Az általunk kapott eredmények azt mutatják, hogy a virulencia faktor készlet megegyezett az egyes sporadikusan előforduló izolátumokban és a perzisztens izolátumokban. Bár a sikeres klónok hordozták a VAP patogenezisében fontos szerepet játszó *exoS* gént (Berra és mtsai, 2010; Veessenmeyer és mtsai, 2009), a legsúlyosabb fertőzésekkel összefüggésbe hozott *exoU*-t, azonban csak a sporadikus izolátumokban találtuk meg. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a virulencia gének ebben az esetben nem álltak közvetlen összefüggésben a klónok sikerével. A klónok sikerében tehát inkább az antibiotikum rezisztenciájuk játszhatott szerepet.

Az izolátumok előfordulásának mintázata mind *P. aeruginosa*, mind pedig *A. baumannii* esetében endémiás jelenlétükre utal. A legelterjedtebb klaszterekbe tartozó izolátumok hosszú ideig perzisztáltak (*P. aeruginosa* esetén „A” és „B” klaszterek; *A. baumannii* esetén „A1”-„D” klaszter), de járványt nem okoztak a vizsgált intenzív osztályokon. Hasonló endémiás esetről számolt be Foca munkatársaival egy olyan újszülött intenzív osztályon, ahol a fertőző forrást maga az ápoló személyzet és a hosszú ideig ápolott betegek jelentették (Foca és mtsai,

2000). Más szerzők is hasonló eredményre jutottak felnőtt betegek izolátumainak vizsgálata során (Bergman és mtsai, 1998; Suarez és mtsai, 2011; Weisenberg és mtsai, 2011). A *A. baumannii* esetében a legtöbb klasztert egy vagy két különböző intenzív osztályról származó izolátum uralta, azonban néhány klaszter esetében az izolátumok kettőnél több fekvőbeteg osztályról származtak. *P. aeruginosa* esetén egy kihurcolást is tapasztaltunk. Ezek az eredmények felhívják a figyelmet az osztály-specifikus törzsek fekvőbeteg osztályok közötti transzmissziójára, ami a poliklonális endémia kialakulását teheti lehetővé. A *P. aeruginosa* és az *A. baumannii* klonális terjedésének különböző intenzív osztályokon kiterjedt irodalma van. Egy-egy járvány egy vagy több multirezisztens klón elterjedésével hozható összefüggésbe (Cholley és mtsai, 2010; Giannouli és mtsai, 2010; Goel és mtsai, 2011; Rogues és mtsai, 2014; Santella és mtsai, 2010). Hasonló endémiás helyzetről számolt be Weisenberg munkatársaival (Weisenberg és mtsai, 2011).

A különböző antibiotikumokkal (karbapenemek, aminoglikozidok, fluorokinolonok) szemben rezisztenciát mutató törzsek esetében a terjedés szempontjából igen lényeges tényező a törzs rezisztenciája, melynek eredményeképpen az antibiotikum alkalmazás közvetlen szelekciós előnyhöz juttatja a járványtörzset az érzékeny törzsekkel szemben (Gerding, 2000). A felhasznált antibiotikumok mennyiségének visszaszorításával csökkenthető a rezisztencia, illetve a rezisztens kórokozók előfordulási aránya. Rahal és munkatársai által végzett tanulmány is ezt támasztja alá, melyben vizsgálták a fluorokinolonok (főleg ciprofloxacin) korlátozásának hatására bekövetkező változásokat az ESBL-termelő baktériumok rezisztenciájában és incidenciájában. Az intézkedés hatására a fluorokinolonok fogyása 133 DDD/1000 ápolási napról 17 DDD/1000 ápolási napra csökkent, melynek köszönhetően nőtt ciprofloxacinnal szembeni érzékenység, és csökkent az ESBL-termelő baktériumok incidenciája is (Rahal és mtsai, 1998). Ez egyszersmind azt is bizonyítja, hogy a rezisztenciát provokáló antibiotikum nem csak az lehet, ami ellen a kialakuló rezisztencia irányul.

Hasonló vizsgálatot végzett el 2007-ben egy görög munkacsoport is. A tanulmány ideje alatt az antibiotikum felhasználást korlátozó program a fluorokinolonok felhasználása mellett a ceftazidim felhasználásra is kiterjedt a *P. aeruginosa*, *A. baumannii* és *K. pneumoniae* esetében. A korlátozás bevezetését követően, a ceftazidim fogyás 92,5%-kal, a fluorokinolon fogyás 55,4%-kal csökkent, ezzel párhuzamosan a ceftazidimmal és ciprofloxacinnal szembeni érzékenység szignifikánsan nőtt mindhárom baktérium esetében (Ntagiopoulos és mtsai, 2007).

Ogutlu és munkatársai szintén vizsgálták, hogy a karbapenem használatának korlátozása, hogyan befolyásolja a multirezisztens *A. baumannii* prevalenciáját. A tanulmány első felében,

amikor a karbapenem felhasználást nem korlátozták az intenzív osztályokon (2011-2012) a fogyás 10,8 DDD/100 ápolási nap volt, azonban a korlátozás idején (2012-2013) ez az érték 6,9 DDD/100 ápolási napra csökkent és ezzel párhuzamosan kevesebb, mint felére csökkent a multirezisztens *A. baumannii* aránya is (Ogutlu és mtsai, 2014).

A fentiek alapján a kedvezőtlen járványtani helyzet megoldásában több szerepet kellene kapnia hazánkban az antibiotikum felhasználás optimalizálásának. Nemzetközi viszonylatban az antibiotikum felhasználás optimalizálásra irányuló intézkedések bevezetésére már a 80-as évek vége felé sor került. Pestotnik munkatársaival egy olyan döntés támogató informatikai rendszert hoztak létre (Pestotnik és mtsai, 1996), ami a helyi klinikai eredetű antibiotikum felhasználásra vonatkozó gyakorlati irányelveket tartalmazta és szabályozta a klinikusok által alkalmazható antibiotikumokat. A programnak a másik nagy előnye az volt még, hogy monitorozni tudták az antibiotikum felhasználásban, az antibiotikum rezisztenciában, valamint az egészségügyi költségekben bekövetkező változásokat. A hét év alatt a kórházban kezelt betegek 39,3%-a (63759 fő) részesült valamilyen antibiotikum terápiában. Az összes antibiotikum felhasználás 1988-1994 között 22,8%-kal csökkent, és a sebészeti műtétek során profilaktikus céllal alkalmazott antibiotikum fogyasztást 19,0 DDD-ről, 5,3 DDD-re szorították vissza. Ezzel párhuzamosan a halálozási arány is csökkent 3,7%-ról 2,7%-ra. A programnak köszönhetően az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia arány nem fokozódott és a gyógyszerekre fordított költségek is több mint felére csökkentek (betegenkénti 122,6\$-ról 51,9\$-ra) (Pestotnik és mtsai, 1996). Svédországban 1994-ben vezették be a STRAMA programot (Swedish Strategic Programme for the Rational Use of Antimicrobial Agents and Surveillance of Resistance), melynek a legfőbb prioritása a *Streptococcus pneumoniae* klónok terjedésének megállítása volt. A program eredményeként az összes antibiotikum fogyás 15%-kal csökkent fekvőbeteg ellátásban (napi 17,3 DDD/1000 lakosról 14,6 DDD/1000 lakosra), míg a járóbeteg ellátásban ez csökkenés 5%-kal nagyobb volt (napi 15,7 DDD/1000 lakosról 12,6 DDD/1000 lakosra). Hasonló tendenciát mutatott a receptre felírt antibiotikumok fogyási aránya is (536 DDD/1000 lakosról 410 DDD/1000 lakosra). A legmarkánsabb csökkentést (65%) a makrolidok felhasználása esetében érték el (Mölstad és mtsai, 2008). A fentebb említett antibiotikum korlátozására irányuló stratégiákkal jelentős változásokat értek el az antibiotikum fogyás és a rezisztencia mérséklésében, azonban a legjobb eredmény egy átfogó program bevezetésével lehet elérni, amelynek a működését különböző szakemberekből álló csoport látja el: klinikai infektológus, klinikai gyógyszerész, klinikai mikrobiológus, infekció kontroll szakember, kórházi epidemiológus (Dellit és mtsai, 2007).

Jelen tanulmányunkban az antibiotikum felhasználásra bekövetkező rezisztencia és prevalencia változásokat vizsgáltuk *A. baumannii* és *P. aeruginosa* izolátumok körében. A kapott eredményeink alapján megállapítható, hogy egyértelmű összefüggés van a karbapenem felhasználás és az *A. baumannii* karbapenem rezisztenciája között, továbbá az amikacin felhasználás és a *P. aeruginosa* amikacin rezisztenciája között is. A karbapenem rezisztens *A. baumannii* terjedése egyértelmű kapcsolatban állt az ertapenem, illetve meropenem fogyással, viszont nem volt összefüggésbe hozható az imipenem fogyásával. Az aminoglikozid rezisztens *P. aeruginosa* izolátumoknak az aránya viszont az amikacin fogyással korrelált. Ez az eredmény utalhat arra, hogy az azonos gyógyszer csoportba tartozó különböző antibiotikumok hatása a rezisztencia provokálása szempontjából nem egyenértékű. Az ertapenem csak részben képes gátolni a nem fermentáló baktériumokat, ezért provokálhatja a karbapenemmel szembeni rezisztencia kialakulását (Hamouda és mtsai, 2011). Ezt egy *in vitro* kísérlet elvégzése során Amyes alá is támasztotta, melyben a két különböző *A. baumannii* törzset - egyik törzs hordozott egy OXA-65 karbapenemázt, míg a másik nem – kezelt ertapenemmel. A kezelés előtt, a karbapenemázt hordozó törzseknek az aránya konstans volt, azonban az ertapenem alkalmazását követően a karbapenemáz hordozó törzsek kisselektálódtak (Amyes, 2007).

Összességében megállapítható, hogy az antibiotikum felhasználás jelentős hajtóereje lehet az endémiás törzsek fennmaradásának járványmentes időszakban is. Bizonyos esetekben az antibiotikum rezisztencia fontosabb szerepet játszik a sikeres klónok terjedésében, mint a virulencia faktorok.

VII. Összefoglalás

A tanulmány során a Debreceni Egyetem Klinikai Központ klinikáiról származó *P. aeruginosa* és *A. baumannii* izolátumok molekuláris epidemiológiai jellemzésére került sor, melyben vizsgáltuk az antibiotikum fogyasztás és a klónok antibiotikum rezisztenciája közötti összefüggést, valamint a rezisztenciamechanizmusoknak a genetikai hátterét.

Pulzáló mezejű géll elektroforézissel *P. aeruginosa* esetében három, *A. baumannii* esetében pedig hat fő rokonsági csoportot különítettünk el. A fő rokonsági csoportba tartozó izolátumok ugyan hosszú ideig perzisztáltak, azonban járványt nem okoztak a vizsgált intenzív osztályokon. A karbapenem, illetve aminoglikozid rezisztencia nemcsak egyetlen klónhoz volt köthető. Az *A. baumannii* izolátumok esetében a karbapenem rezisztencia hátterében a *bla_{oxa23-like}* gén hordozása állt, míg a *P. aeruginosa* esetében az amikacin rezisztencia az *aac(6')-Ib* gén megszerzésének volt tulajdonítható. Az aminoglikozid rezisztencia szoros kapcsolatot mutatott az integronhordozással, mivel integronok variábilis régiójában valamilyen β -laktámmal vagy aminoglikoziddal szemben rezisztenciát biztosító gént azonosítottunk.

A karbapenem rezisztens *A. baumannii* terjedése egyértelmű kapcsolatban állt az ertapenem, illetve meropenem fogyasztással, viszont nem volt összefüggésbe hozható az imipenem fogyasztásával. Az Idegklinika Intenzív Terápiás Osztályán - ahol a karbapenem fogyasztás szignifikánsan alacsonyabb volt a többi klinikához képest és ertapenemet szinte egyáltalán nem alkalmaztak - az *A. baumannii* izolátumok nagy része karbapenem érzékeny volt. Az aminoglikozid rezisztens *P. aeruginosa* izolátumoknak az aránya viszont az amikacin fogyasztással korrelált, melyet a Tüdőklinika Intenzív Terápiás Osztályán alkalmaztak igen gyakran.

Eredményeink alapján, az antibiotikum rezisztencia és a klonalitás közötti kapcsolat az aminoglikozidok illetve a karbapenemek felhasználásnak szerepére utaltak a sikeres klónok fennmaradásában és/vagy terjedésében. A kedvezőtlen járványtani helyzet megoldásában több szerepet kellene kapnia az antibiotikum felhasználás optimalizálásának.

VIII. Summary

Molecular epidemiological characterization of *P. aeruginosa* isolates and *A. baumannii* isolates originated from the University of Debrecen and the relationship between antibiotic consumption and antibiotic resistance of the clones have been investigated.

Three clusters (*P. aeruginosa*) and six clusters (*A. baumannii*) have been distinguished by pulsed field gel electrophoresis. Isolates belonging to the major clusters have persisted for long periods, however, they did not cause an outbreak at the examined ICUs. Neither carbapenem nor aminoglycoside resistance could be linked to single clone only. Carbapenem resistance was attributable to the carriage of the *bla*_{OXA23-like} gene in case of *A. baumannii* isolates, while aminoglycoside resistance was due to the carriage of the *aac*(6')-Ib gene in case of *P. aeruginosa*. Aminoglycoside resistance was strongly associated with integrons; the variable regions harboured genes conferring resistance to beta-lactams and aminoglycosides. Ertapenem and meropenem but not imipenem consumption was associated with increased prevalence of *A. baumannii* as a cause carbapenem resistance. At the Neurology ICU, where the carbapenem consumption was significantly lower and ertapenem was a less preferred agent, majority of the *A. baumannii* isolates were susceptible to carbapenems. Prevalence of aminoglycoside resistant *P. aeruginosa* was strongly correlated to amikacin consumption which was significantly used at the Pulmonology ICU.

According to our results, relationship between antibiotic resistance and clonality is associated with consumption of aminoglycosides and carbapenems, which may also be the the main driving force for maintenance and spread of successful clones.

IX. Irodalomjegyzék

Ambler RP, Coulson AF, Frère JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, Levesque RC, Tiraby G, Waley SG. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 1991; 276:269-270.

Amyes SG, Walsh FM, Bradley JS. Best in class: a good principle for antibiotic usage to limit resistance development? *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:825-826.

Antunes LC, Imperi F, Carattoli A, Visca P. Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS One* 2011; 6:e22674.

Apisarnthanarak A, Apisarnthanarak P, Warren DK, Fraser VJ. Is central venous catheter tips' colonization with multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* a predictor for bacteremia? *Clin Infect Dis* 2011; 52:1080-1082.

Bergmans DC, Bonten MJ, van Tiel FH, Gaillard CA, van der Geest S, Wilting RM, de Leeuw PW, Stobberingh EE. Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax* 1998; 53:1053–1058.

Berra L, Schmidt U, Wiener-Kronish J. Relationship between virulence factors and outcome of ventilator-associated pneumonia related to *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Respir Med Rev* 2010; 6:19–25.

Betts RF, Valenti WM, Chapman SW, Chonmaitree T, Mowrer G, Pincus P, Messner M, Robertson R. Five-year surveillance of aminoglycoside usage in a university hospital. *Ann Intern Med* 1984; 100:219-222.

Bhattacharjee A, Sen MR, Prakash P, Gaur A, Anupurba S, Nath G. Observation on integron carriage among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Indian J Med Microbiol* 2010; 28:207-210.

Bogaerts P, Cuzon G, Naas T, Bauraing C, Deplano A, Lissou B, Nordmann P, Glupczynski Y. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing the blaOXA-23 gene associated with ISAb4 in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:4205-4206.

Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R, Rodriguez-Villalobos H, Struelens M, Glupczynski Y. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:459-464.

Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Mol Microbiol* 2010; 75:827–842.

Braun G, Vidotto MC. Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes coding for virulence factors of *Acinetobacter baumannii* causing urinary tract infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:839-844.

Brogden RN, Pinder RM, Sawyer PR, Speight TM, Avery GS. Tobramycin: a review of its antibacterial and pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* 1976;12:166-200.

Brossier F, Veziris N, Aubry A, Jarlier V, Sougakoff W. Detection by GenoType MTBDRsl test of complex mechanisms of resistance to second-line drugs and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1683–1689.

Brown AG, Butterworth D, Cole M, Hanscomb G, Hood JD, Reading C, Rolinson GN. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot* 1976; 29:668–669.

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:969-976.

Bush K. Recent developments in beta-lactamase research and their implications for the future. *Rev Infect Dis* 1988; 10:681–690.

Catel-Ferreira M, Coadou G, Molle V, Mugnier P, Nordmann P, Siroy A, Jouenne T, Dé E. Structure-function relationships of CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:2053–2056.

Catel-Ferreira M, Nehmé R, Molle V, Aranda J, Bouffartigues E, Chevalier S, Bou G, Jouenne T, Dé E. Deciphering the function of the outer membrane protein OprD homologue of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:3826–3832.

CDC 2014. <http://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html> (honlap felkeresésének utolsó időpontja 2015.01.24.)

Cerqueira GM, Peleg AY. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB Life* 2011; 63:1055-1060.

Chaparro-Barrios C, Ciancotti-Oliver L, Bautista-Rentero D, Adán-Tomás C, Zanón-Vigue V. A New Treatment Choice against Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Doripenem. *J Bacteriol Parasitol* 2014; 5:199. Hivatkozás!!!

Chawla K, Vishwanath S, Munim FC. Nonfermenting Gram-negative Bacilli other than *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. causing respiratory tract infections in a tertiary care center. *J Glob Infect Dis* 2013; 5:144-148.

Chiang T, Pastagia M, Huang DB. Bacteremia caused by *Acinetobacter baumannii*: epidemiologic features, antimicrobial susceptibility, and outcomes. *Advances in Infectious Diseases* 2014; 4:66-71.

Chittapragada M, Roberts S, Ham YW. Aminoglycosides: molecular insights on the recognition of RNA and aminoglycoside mimics. *Perspect Medicin Chem* 2009; 3:21-37.

Cho YJ, Moon DC, Jin JS, Choi CH, Lee YC, Lee JC. Genetic basis of resistance to aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. and spread of *armA* in *Acinetobacter baumannii* sequence group1 in Korean hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64:185-190.

Cholley P, Hocquet D, Alauzet C, Cravoisy-Popovic A, Talon D, Aissa N, Plésiat P, Bertrand X. Hospital outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing extended-spectrum oxacillinase OXA-19. *J Med Microbiol* 2010; 59:866-869.

Ciofi degli Atti M, Bernaschi P, Carletti M, Luzzi I, García-Fernández A, Bertaina A, Sisto A, Locatelli F, Raponi M. An outbreak of extremely drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care pediatric hospital in Italy. *BMC Infect Dis* 2014; 14:494.

Coelho A, Piedra-Carrasco N, Bartolomé R, Quintero-Zarate JN, Larrosa N, Cornejo-Sánchez T, Prats G, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F, González-Lopéz JJ. Role of IncHI2 plasmids harbouring *bla*VIM-1, *bla*CTX-M-9, *aac*(6)-Ib and *qnrA* genes in the spread of multiresistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* strains in different units at Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39:514-517.

Coyne S, Courvalin P, Perichon B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:947–953.

Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Perichon B. Over expression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4389–4393.

Da Silva GJ, Mendonça N. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. *Virulence* 2012;3:18-28.

Damier-Piolle L, Magnet S, Bremont S, Lambert T, Courvalin P. AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:557–562.

Dawes FE, Kuzevski A, Bettelheim KA, Hornitzky MA, Djordjevic SP, Walker MJ. Distribution of class 1 integrons with IS26-mediated deletions in their 3'-conserved segments in *Escherichia coli* of human and animal origin. *PLoS One* 2010; 5:e12754.

de Abreu PM, Farias PG, Paiva GS, Almeida AM, Morais PV. Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard. *BMC Microbiol* 2014; 14:118.

de Chial M, Ghysels B, Beatson SA, Geoffroy V, Meyer JM, Pattery T, Baysse C, Chablain P, Parsons YN, Winstanley C, Cordwell SJ, Cornelis P. Identification of typeII and typeIII pyoverdine receptors from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 2003; 149:821-831.

Dellit TH, Owens RC, McGowan JE Jr, Gerding DN, Weinstein RA, Burke JP, Huskins WC, Paterson DL, Fishman NO, Carpenter CF, Brennan PJ, Billeter M, Hooton TM; Infectious Diseases Society of America; Society for Healthcare Epidemiology of America. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis.* 2007 ;44:159-77.

Di Bonito M, Caiazzo S, Iannazzone M, Miccichè V, De Marco G, De Robertis E, Tufano R, Piazza O. Prognostic differences between VAP from *Acinetobacter baumannii* and VAP from other microorganisms. *Transl Med UniSa* 2012; 3:15-21.

Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L, Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 2010; 5:e10034.

DiazGranados CA, Jones MY, Kongphet-Tran T, White N, Shapiro M, Wang YF, Ray SM, Blumberg HM. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with contamination of a flexible bronchoscope. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30:550-555.

Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson D. Coproduction of novel 16S rRNA methylase *rmtD* and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:852-856.

Dubois V, Poirel L, Marie C, Arpin C, Nordmann P, Quentin C. Molecular characterization of a novel class I integron containing *bla*(GES-1) and a fused product of *aac3-Ib/aac6'-Ib'* gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:638-645.

Dzidic S, Bedeković V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24:519-526.

EARS-NET 2013. <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf> (honlap felkeresésének utolsó időpontja 2015.01.24.)

El Amin N, Giske CG, Jalal S, Keijser B, Kronvall G, Wretling B. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates. *APMIS* 2005; 113:187–196.

El'Garch F, Jeannot K, Hocquet D, Llanes-Barakat C, Plésiat P. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:1016-1021.

EUCAST 2015.

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_5.0_Breakpoint_Table_01.pdf (honlap felkeresésének utolsó időpontja 2015.03.24.)

Evans K, Passador L, Srikumar R, Tsang E, Nezezon J, Poole K. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1998; 180:5443–5447.

Falagas ME, Lourida P, Poulidakos P, Rafailidis PI, Tansarli GS. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58:654-663.

Fernando DM, Kumar A. Resistance-nodulation-division multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria: role in virulence. *Antibiotics* 2013; 2:163-181.

- Finken M, Kirschner P, Meier A, Wrede A, Böttger EC. Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal protein S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol* 1993; 9:1239-1246.
- Finnan S, Morrissey JP, O'Gara F, Boyd EF. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *J Clin Microbiol* 2004; 42:5783-5792.
- Fluit AC, Schmitz FJ. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18:761-770.
- Foca M, Jakob K, Whittier S, Della Latta P, Factor S, Rubenstein D, et al. Endemic *Pseudomonas aeruginosa* infection in a neonatal intensive care unit. *N Engl J Med* 2000; 343:695-700.
- Fonseca EL, Scheidegger E, Freitas FS, Cipriano R, Vicente AC. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil: role of carO alleles expression and blaOXA-23 gene. *BMC Microbiol* 2013; 13:245.
- Frana TS, Carlson SA, Griffith RW. Relative distribution and conservation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Salmonella enterica* serotype typhimurium phage type DT104. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67:445-448.
- Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:699-702.
- Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:2565-2571.
- Gallego L, Towner KJ. Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from northern Spain. *J Med Microbiol* 2001; 50:71-77.
- Gerding DN, Larson TA, Hughes RA, Weiler M, Shanholtzer C, Peterson LR. Aminoglycoside resistance and aminoglycoside usage: ten years of experience in one hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1284-1290.
- Gerding DN. Antimicrobial cycling: lessons learned from the aminoglycoside experience. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; 21 1 Suppl:S12-17.
- Giannouli M, Cuccurullo S, Crivaro V, Di Popolo A, Bernardo M, Tomasone F, Amato G, Brisse S, Triassi M, Utili R, Zarrilli R. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1223-1230.
- Gijón D, Curiao T, Baquero F, Coque TM, Cantón R. Fecal carriage of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a hidden reservoir in hospitalized and non hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 2012; 50:1558-1563.

Giske CG, Buarø L, Sundsfjord A, Wretling B. Alterations of porin, pumps, and penicillin-binding proteins in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* 2008; 14:23-30.

Goel N, Wattal C, Oberoi JK, Raveendran R, Datta S, Prasad KJ. Trend analysis of antimicrobial consumption and development of resistance in non-fermenters in a tertiary care hospital in Delhi, India. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:1625-1630.

Goettsch W, van Pelt W, Nagelkerke N, Hendrix MG, Buiting AG, Petit PL, Sabbe LJ, van Griethuysen AJ, de Neeling AJ. Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the netherlands. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46:223-228.

Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis* 2011; 53:60-67.

Haenni M, Hocquet D, Ponsin C, Cholley P, Guyeux C, Madec JY, Bertrand X. Population structure and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from animal infections in France. *BMC Vet Res* 2015; 11:9.

Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 1995; 15:593-600.

Hammer R, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis.

Hammond ML. Ertapenem: a Group 1 Carbapenem with distinct antibacterial and pharmacological properties. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53 Suppl 2:ii7-9.

Hamood AN, Griswold J, Colmer J. Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 1996;64:3154-3160.

Hamouda A, Findlay J, Amyes SG. Carbapenems: do they have a future? *J Med Microbiol* 2011; 60:1229-1230.

Hannecart-Pokorni E, Depuydt F, De Wit L, Van Bossuyt E., Content J., Vanhoof R. Characterization of the 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase gene *aac(6')-II* associated with a *sulI*-type integron; *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 314-318.

Haruta S, Yamaguchi H, Yamamoto ET, Eriguchi Y, Nukaga M, O'Hara K, Sawai T. Functional analysis of the active site of a metallo-*beta*-lactamase proliferating in Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2304-2309.

Hauser RA. The Type III Secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7:654-665.

Hawkey PM. The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62 Suppl 1:i1-9.

Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:233-238.

Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 2001; 9:486-493.

Hopkins KL, Escudero JA, Hidalgo L, Gonzalez-Zorn B. 16S rRNA methyl transferase RmtC in *Salmonella enterica* serovar Virchow. Emerg Infect Dis 2010; 16:712-715.

Houang ET, Chu YW, Lo WS, Chu KY, Cheng AF. Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (arr-2) and metallo-beta-lactamase (blaIMP-4) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:1382-1390.

Houghton JL, Green KD, Chen W, Garneau-Tsodikova S. The future of aminoglycosides: the end or renaissance? Chembiochem 2010; 11:880-902.

Hsueh PR, Chen WH, Luh KT. Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991-2003 at a university hospital in Taiwan. Int J Antimicrob Agents 2005; 26: 463-72.

Iosifidis E, Antachopoulos C, Tsivitanidou M, Katragkou A, Farmaki E, Tsiakou M, Kyriazi T, Sofianou D, Roilides E. Differential correlation between rates of antimicrobial drug consumption and prevalence of antimicrobial resistance in a tertiary care hospital in Greece. Infect Control Hosp Epidemiol 2008; 29: 615-622.

Jin JS, Kwon SO, Moon DC, Gurung M, Lee JH, Kim SI, Lee JC. *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein a via outer membrane vesicles. PLoS One 2011; 6:e17027.

Khosravi Y, Tay ST, Vadivelu J. Analysis of integrons and associated gene cassettes of metallo-beta-lactamase-positive *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia. J Med Microbiol 2011; 60:988-994.

Khuntayaporn P, Montakantikul P, Mootsikapun P, Thamlikitkul V, Chomnawang MT. Prevalence and genotypic relatedness of carbapenem resistance among multidrug-resistant *P. aeruginosa* in tertiary hospitals across Thailand. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2012; 11:25.

Kida Y, Higashimoto Y, Inoue H, Shimizu T, Kuwano K. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. Cell Microbiol 2008; 10:1491-1504.

Köhler T, van Delden C, Curty LK, Hamzehpour MM, Pechere JC. Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2001; 183:5213-5222.

Lanini S, D'Arezzo S, Puro V, Martini L, Imperi F, Piselli P, Montanaro M, Paoletti S, Visca P, Ippolito G. Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital out break driven by a contaminated disinfectant-soapdispenser. PLoS One 2011; 6:e17064.

Lanotte P, Watt S, Mereghetti L, Dartiguelongue N, Rastegar-Lari A, Goudeau A, Quentin R. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. J Med Microbiol 2004; 53:73-81.

Lau GW, Hassett DJ, Britigan BE. Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. Trends Microbiol 2005; 13:389-397.

Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1584–1590.

Learn DB, Brestel EP, Seetharama S. Hypochlorite scavenging by *Pseudomonas aeruginosa* alginate. Infect Immun 1987; 55:1813-1818.

Lee Y, Yum JH, Kim CK, Yong D, Jeon EH, Jeong SH, Ahn JY, Lee K. Role of OXA-23 and AdeABC efflux pump for acquiring carbapenem resistance in an *Acinetobacter baumannii* strain carrying the blaOXA-66 gene. Ann Clin Lab Sci 2010; 40:43-48.

Leid JG, Willson CJ, Shirliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. J Immunol 2005; 175:7512-7518.

Limansky AS, Mussi MA, Viale AM. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. J Clin Microbiol 2002; 40:4776–4778.

Liu H, Wang H, Huang M, Mei Y, Gu B, Wu R, Huang Y, Chen Y, Xu Y, Wang T. Analysis of antimicrobial resistance and class 1 integrons among strains from upper respiratory tract of healthy adults. J Thorac Dis 2013; 5:149-155.

Lode H, Grunert K, Koeppe P, Langmaack H. Pharmacokinetics and clinical experiences with a new aminoglycoside antibioticum: amikacin. Verh Dtsch Ges Inn Med 1976; 82:1684-1686.

López-Lozano JM, Monett DL, Alonso PC, Quintero AC, Jiménez NG, Muñoz AZ, Thomas C, Beyaert A, Stevenson M, Riley TV. Application of time-series analysis to antibiotic resistance and consumption data. In: Gould IM, van der Meer JWM (szerk.) Antibiotic Policies Theory and Practice. Springer 2005.

MacGowan AP, Bowker KE, Bedford KA, Holt HA, Reeves DS, Hedges A. The comparative inhibitory and bactericidal activities of meropenem and imipenem against *Acinetobacter* spp. and Enterobacteriaceae resistant to second generation cephalosporins. J Antimicrob Chemother 1995; 35:333-337.

Maisnier-Patin S, Berg OG, Liljas L, Andersson DI. Compensatory adaptation to the deleterious effect of antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol 2002; 46:355-366.

Malini A, Deepa E, Gokul B, Prasad S. Non fermenting gram-negative bacilli infections in a tertiary care hospital in Kolar, Karnataka. J Lab Physicians 2009; 1:62-66.

Manikal VM, Landman D, Saurina G, Oydna E, Lal H, Quale J. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: city wide prevalence, inter institutional spread, and relation to antibiotic usage. Clin Infect Dis 2000; 31:101-106.

- Martinez-Martinez L. Extended-spectrum beta lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 Suppl 1:82–89.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 3322–3327.
- Mathers AJ, Cox HL, Kitchel B, Bonatti H, Brassinga AK, Carroll J, Scheld WM, Hazen KC, Sifri CD. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant enterobacteriaceae reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. *MBio* 2011; 2:204–211.
- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *laad* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1568-1574.
- McLaughlin M, Advincula MR, Malczynski M, Qi C, Bolon M, Scheetz MH. Correlations of antibiotic use and carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:5131–5133.
- Memish ZA, Shibl AM, Kambal AM, Ohaly YA, Ishaq A, Livermore DM. Antimicrobial resistance among non-fermenting Gram-negative bacteria in Saudi Arabia. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:1701-1705.
- Mena A, Plasencia V, García L, Hidalgo O, Ayestarán JI, Alberti S, Borrell N, Pérez JL, Oliver A. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2831–2837.
- Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:727-737.
- Mnif B, Harhour H, Jdidi J, Mahjoubi F, Genel N, Arlet G, Hammami A. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Tunisia and characterization of their virulence factors and plasmid addiction systems. *BMC Microbiol* 2013; 13:147.
- Monnet DL. ABC Calc – Antibiotic consumption calculator (MS Excel application). V3.1. Copenhagen (Denmark). Statens Serum Institut 2006.
- Montero MM, Knobel H, Plasencia V, Sorli L, Segura C, Grau S, Horcajada JP. Colistin-resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is correlated with colistin consumption but it could be a reversible phenomenon. Abstract K-187, ICAAC 2013, Denver USA.
- Morgan DJ, Liang SY, Smith CL, Johnson JK, Harris AD, Furuno JP, Thom KA, Snyder GM, Day HR, Perencevich EN. Frequent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination of gloves, gowns, and hands of healthcare workers. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31:716-721.
- Morlon-Guyot J, Méré J, Bonhoure A, Beaumelle B. Processing of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A is dispensable for cell intoxication. *Infect Immun* 2009; 77:3090-3099.

Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, Selgrade SE, Miller SI, Denton M, Conway SP, Johansen HK, Høiby N. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2012 ;56:1019-1030.

Mouton RP, Hermans J, Simoons-Smit AM, Hoogkamp-Korstanje JA, Degener JE, van Klingeren B. Correlations between consumption of antibiotics and methicillin resistance in coagulase negative *staphylococci*. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26:573-583.

Mölstad S, Erntell M, Hanberger H, Melander E, Norman C, Skoog G, Lundborg CS, Söderström A, Torell E, Cars O. Sustained reduction of antibiotic use and low bacterial resistance: 10-year follow-up of the Swedish Strama programme. *Lancet Infect Dis*. 2008;8:125-32. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70017-3.

Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:35-40.

Mulin B, Talon D, Viel JF, Vincent C, Leprat R, Thouverez M, Michel-Briand Y. Risk factors for nosocomial colonization with multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14:569-576.

Nadler HL, Pitkin DH, Sheikh W. The postantibiotic effect of meropenem and imipenem on selected bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24 Suppl A:225-231.

Nathwani D, Raman G, Sulham K, Gavaghan M, Menon V. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrob Resist Infect Control* 2014; 3:32.

Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, Vanechoutte M, Brisse S, Dijkshoorn L. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol* 2011; 162: 393–404.

Nilsson-Ehle I, Hutchison M, Haworth SJ, Norrby SR. Pharmacokinetics of meropenem compared to imipenem-cilastatin in young, healthy males. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10:85-88.

Nix DE, Majumdar AK, DiNubile MJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ertapenem: an overview for clinicians. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53Suppl 2:ii23–28.

Noppe-Leclercq I, Wallet F, Haentjens S, Courcol R, Simonet M. PCR detection of aminoglycoside resistance genes: a rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Res Microbiol* 1999; 150:317-322.

Ntagiopoulos PG, Paramythiotou E, Antoniadou A, Giamarellou H, Karabinis A. Impact of an antibiotic restriction policy on the antibiotic resistance patterns of Gram-negative

microorganisms in an Intensive Care Unit in Greece. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30:360-365.

Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodríguez C, Roman E, Tubau F, Macia MD, Moya B, Zamorano L, Suárez C, Peña C, Domínguez MA, Moncalián G, Oliver A, Martínez-Martínez L. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and –susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:1703-1713.

Ogutlu A, Guclu E, Karabay O, Utku AC, Tuna N, Yahyaoglu M. Effects of carbapenem consumption on the prevalence of *Acinetobacter* infection in intensive care unit patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2014; 13:7.

Olesen B, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, Johnston B, Hansen DS, Scheutz F, Krogfelt KA, Kuskowski MA, Clabots C, Johnson JR. Temporal trends in antimicrobial resistance and virulence-associated traits within the *Escherichia coli* sequence type 131 clonal group and its H30 and H30-Rx subclones, 1968 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58:6886-6895.

Oliver AM, Weir DM. The effect of *Pseudomonas* alginate on rat alveolar macrophage phagocytosis and bacterial opsonization. *Clin Exp Immunol* 1985; 59:190-196.
palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.

Papp-Wallace KM, Bethel CR, Distler AM, Kasuboski C, Taracila M, Bonomo RA. Inhibitor resistance in the KPC-2 beta-lactamase, a preeminent property of this class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:890-897.

Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:4943-4960.

Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of *aac(6′)-Ib-c* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3953-3955.

Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 2009; 33:757-784.

Pedersen SS, Kharazmi A, Espersen F, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis sputum and the inflammatory response. *Infect Immun* 1990; 58:3363-3368.

Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Reviews* 2008; 21:538–582.

Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:3471-3484.

Pestotnik SL, Classen DC, Evans RS, Burke JP. Implementing antibiotic practice guidelines through computer-assisted decision support: clinical and financial outcomes. *Ann Intern Med*. 1996;124: 884-90.

Ploy MC, Giamarellou H, Bourlioux P, Courvalin P, Lambert T. Detection of *aac(6')*-I genes in amikacin-resistant *Acinetobacter* spp. by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38:2925-2928.

Poonsuk K, Tribuddharat C, Chuanchuen R. Aminoglycosideresistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from non-cystic fibrosis patients in Thailand. *Can J Microbiol* 2013; 59:51-56.

Prayle A, Watson A, Fortnum H, Smyth A. Side effects of aminoglycosides on the kidney, ear and balance in cystic fibrosis. *Thorax* 2010; 65:654-658.

Rafay AM, Al-Muharrmi Z, Toki R. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases-producing isolates over a 1-year period at a University Hospital in Oman. *Saudi Med J* 2007; 28:22-27.

Rahal JJ, Urban C, Horn D, Freeman K, Segal-Maurer S, Maurer J, Mariano N, Marks S, Burns JM, Dominick D, Lim M. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *JAMA*. 1998; 280:1233-1237.

Ramirez MS, Nikolaidis N, Tolmasky ME. Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the *aac(6')*-Ib paradigm. *Front Microbiol* 2013; 4:121.

Ramirez MS, Piñeiro S; Argentinian Integron Study Group, Centrón D. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:699-706.

Raquet X, Lamotte-Brasseur J, Bouillenne F, Frère JM. A disulfide bridge near the active site of carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases might explain their unusual substrate profile. *Proteins* 1997;27:47-58.

Rashki A. Cervico-vaginopathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Microb Pathog* 2014; 75:29-34.

Richet H, Fournier PE. Nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*: a major threat worldwide. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27:645-646.

Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; 12:83-88.

Rodloff AC, Goldstein EJ, Torres A. Two decades of imipenem therapy. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:916-929.

Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:4783-4788.

- Rogues AM, Dumartin C, Amadéo B, Venier AG, Marty N, Parneix P, Gachie JP. Relationship between rates of antimicrobial consumption and the incidence of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 47 French hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28:1389-1395.
- Rosenberg EY, Ma D, Nikaido H. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J Bacteriol* 2000; 182:1754-1756.
- Rosser SJ, Young HK. Identification and characterization of class I integrons in bacteria from an aquatic environment. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44:11-18.
- Rumbo C, Fernández-Moreira E, Merino M, Poza M, Mendez JA, Soares NC, Mosquera A, Chaves F, Bou G. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:3084-3090.
- Sabharwal N, Dhall S, Chhibber S, Harjai K. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. *Int J Mol Epidemiol Genet* 2014; 5:125-134.
- Sabtcheva S, Galimand M, Gerbaud G, Courvalin P, Lambert T. Aminoglycoside resistance gene ant(4')-IIb of *Pseudomonas aeruginosa* BM4492, a clinical isolate from Bulgaria. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1584-1588.
- Samuelsen Ø, Toleman MA, Hasseltvedt V, Fuursted K, Leegaard TM, Walsh TR, Sundsfjord A, Giske CG. Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal complexes encoding transferable multidrug resistance. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:1811–1816.
- Santella G, Cuirolo A, Almuzara M, Palombarani S, Sly G, Radice M, Gutkind G. Full resistance and decreased susceptibility to carbapenems in IMP-13-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from an outbreak. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:1381-1382.
- Schatz A and Waksman SA. Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc Soc Exp Biol Med* 1944; 57: 244–248.
- Schmitz FJ, Fluit AC, Gondolf M, Beyrau R, Lindenlauf E, Verhoef J, Heinz HP, Jones ME. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of *staphylococci* from 19 European hospitals. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:253-259.
- Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 1993; 57:138-163.
- Sidhu K, Talbot M, van Mil K, Verstraete M. Treatment with sub-inhibitory kanamycin induces adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics via the AcrD multidrug efflux pump in *Escherichia coli* K-12. *J Exp Microbiol Immunol* 2012; 16: 11-16.

- Smith CA, Toth M, Bhattacharya M, Frase H, Vakulenko SB. Structure of the phosphotransferase domain of the bifunctional aminoglycoside-resistance enzyme AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2014; 70:1561-1571.
- Sood P, Seth T, Kapil A, Sharma V, Dayama A, Sharma S, Kumar S, Singh AK, Mishra P, Mahapatra M. Emergence of multidrug resistant *Acinetobacter* blood stream infections in febrile neutropenia patients with haematological cancers and bone marrow failure syndromes. *J Indian Med Assoc* 2012; 110:439-444.
- Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill* 2008;13pii:19045.
- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:664–689.
- Suarez C, Peña C, Arch O, Dominguez MA, Tubau F, Juan C, Gavaldá L, Sora M, Oliver A, Pujol M, Ariza J. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. *BMC Infect Dis* 2011; 11:272.
- Sullivan E, Bensman J, Lou M, Agnello M, Shriner K, Wong-Beringer A. Risk of developing pneumonia is enhanced by the combined traits of fluoroquinolone resistance and type III secretion virulence in respiratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med* 2014; 42:48-56.
- Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 453:254-267.
- Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25:450-470.
- Tekin R, Dal T, Bozkurt F, Deveci O, Palanc Y, Arslan E, Selçuk CT, Hoşoğlu S. Risk factors for nosocomial burn wound infection caused by multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Burn Care Res* 2014; 35:e73-80.
- Tolmasky ME. Aminoglycoside-modifying enzymes: characteristics, localization, and dissemination. In: Bonomo RA, Tolmasky ME, editors. *Enzyme-mediated resistance to antibiotics: mechanisms, dissemination, and prospects for inhibition*. ASM Press; Washington, DC: 2007a. pp. 35–52.
- Touati M, Diene SM, Dekhil M, Djahoudi A, Racherache A, Rolain JM. Dissemination of a class I integron carrying VIM-2 carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a hospital intensive care unit in Annaba, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:2426-2427.
- Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006; 44:2974-2976.

- Urbánek K, Kolár M, Lovecková Y, Strojil J, Santavá L. Influence of third-generation cephalosporin utilization on the occurrence of ESBL-positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *J Clin Pharm Ther* 2007; 32:403-408.
- Vainio S, van Doorn-Schepens M, Wilhelm A, Vandenbroucke-Grauls C, Murk JL, Debets-Ossenkopp Y. Rapid selection of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by clinical concentrations of ertapenem. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 41:492-494.
- Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:430–450.
- Veesenmeyer JL, Hauser AR, Lisboa T, Rello J. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies. *Crit Care Med* 2009; 37:1777–1786.
- Vila J, Ruiz J, Navia M, Becerril B, Garcia I, Perea S, Lopez-Hernandez I, Alamo I, Ballester F, Planes AM, Martinez-Beltran J, de Anta TJ. Spread of amikacin resistance in *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain due to an epidemic strain. *J Clin Microbiol* 1999; 37:758-761.
- Villar HE, Laurino G, Arena MF, Hoffman M. Selection of resistance mutants and bacteriostatic and bactericidal activity of meropenem and imipenem against *Acinetobacter* spp. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997; 15:140-143.
- Walker TS, Bais HP, Déziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, Vivanco JM. *Pseudomonas aeruginosa*-plantroot interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiol* 2004; 134:320-331.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsunashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:147–151.
- Wattal C, Raveendran R, Goel N, Oberoi JK, Rao BK. Ecology of bloodstream infection and antibiotic resistance in intensive care unit at a tertiary care hospital in North India. *Braz J Infect Dis* 2014; 18:245-251.
- Weisenberg SA, Schuetz AN, Alexander EL, Eiss B, Behta M, Saiman L, Larone DH, Jenkins SG, Rhee KY. Endemic *Acinetobacter baumannii* in a New York hospital. *PLoS One* 2011; 6:e28566.
- Wieczorek P, Sacha P, Hauschild T, Zórawski M, Krawczyk M, Trynieszewska E. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*--the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol* 2008; 46:257-267.
- Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, Amyes SG, Livermore DM. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27:351-353.
- Wright GD, Thompson PR. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front Biosci* 1999; 4:D9-21.

Xavier DE, Picão RC, Girardello R, Fehlberg LC, Gales AC. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. BMC Microbiol 2010; 10: 217.

Xu J, Sun Z, Li Y, Zhou Q. Surveillance and correlation of antibiotic consumption and resistance of *Acinetobacter baumannii* complex in a tertiary care hospital in northeast China, 2003-2011. Int J Environ Res Public Health 2013; 10:1462-1473.

Yang H, Pan Y, Hu L, Liu Y, Ye Y, Cheng J, Li J. Antimicrobial resistance patterns and characterization of integrons in clinical isolates of *Shigella* from China. Can J Microbiol 2014; 60:237-242.

Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. Lancet 2003; 362:1888–1893.

Zarrilli R, Crispino M, Bagattini M, Barretta E, Di Popolo A, Triassi M, Villari P. Molecular epidemiology of sequential outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in intensive care unit shows the emergence of carbapenem resistance. J Clin Microbiol 2004; 42:946-953.

Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative review of the carbapenems. Drugs. 2007; 67:1027-1052.

X. Tárgyszavak-Keywords

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter baumannii*, aminoglikozidokkal és karbapenemekkel szembeni rezisztenciamechanizmusok, integronok hordozása, pulzálómezejű gélelektroforézis, antibiotikum fogyás, idősor analízis

Pseudomonas aeruginosa, *Acinetobacter baumannii*, resistance mechanisms of aminoglycoside and karbapenem, integrons carriage, pulsed-field gel electrophoresis, antibiotic consumption, time-series analysis

XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Kardos Gábornak, aki szakmai tanácsaival segítségemre volt, és a munkámat minden körülmények között támogatta és segítette. Külön köszönettel tartozok a statisztikai elemzéseknél nyújtott segítségéért. Köszönöm korábbi témavezetőmnek, Dr. Majoros Lászlónak, hogy lehetőséget biztosított számomra a Candida fajokkal kapcsolatos kísérletes munkák elvégzésében.

Köszönettel tartozom Dr. Kónya Józsefnek, hogy lehetővé tette számomra a kísérletes munka elvégzését az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben.

Köszönöm Rendesné Székely Évának a molekuláris módszerek technikai elsajátításában nyújtott segítségét, illetve hasznos tanácsait.

Köszönöm az Egyetemi Gyógyszertárnak, hogy az antibiotikumfogyás elemzéséhez szükséges nyers gyógyszerfelhasználási adatokat biztosította számomra.

Külön köszönettel tartozom a rutin diagnosztika minden dolgozójának az izolátumok azonosításában nyújtott segítségért.

Köszönöm Dr. Szarka Krisztának és Dr. Majoros Lászlónak, hogy a dolgozat elkészítését kritikai megjegyzéseikkel segítették.

Végül hálámat szeretném kifejezni családomnak, akik minden körülmények között mellettem álltak és áldozatos munkájukkal támogatták az egyetemi tanulmányaimat. Külön köszönet illeti barátaimat, akik szintén mellettem álltak, motíváltak és jó hangulattal vettek körbe.

XII. Függelék



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/44/2015.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Mózes Julianna
Neptun kód: SGYJFL
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Mózes, J.**, Ebrahimi, F., Gorács, O., Miszti, C., Kardos, G.: Effect of carbapenem consumption patterns on the molecular epidemiology and carbapenem resistance of *Acinetobacter baumannii*.
J. Med. Microbiol. 63, 1654-1662, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.082818-0>
IF:2.266 (2013)
2. **Mózes, J.**, Szűcs, I., Molnár, D., Jakab, P., Fatemeh, E., Szilasi, M., Majoros, L., Orosi, P., Kardos, G.: A potential role of aminoglycoside resistance in endemic occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* strains in lower airways of mechanically ventilated patients.
Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 78 (1), 79-84, 2014.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.09.015>
IF:2.568 (2013)



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ☐ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ☐ Tel.: (52) 410-443
E-mail: publikaciok@lib.unideb.hu ☐ Honlap: www.lib.unideb.hu



További Közlemények

3. Földi, R., Kovács, R., Gesztelyi, R., Kardos, G., Berényi, R., Juhász, B., Szilágyi, J., **Mózes, J.**, Majoros, L.: Comparison of In Vitro and Vivo Efficacy of Caspofungin Against *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* and *C. albicans*.
Mycopathologia. 174 (4), 311-318, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-012-9554-7>
IF:1.489

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 6,323

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre): 4,834

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

Debrecen, 2015.02.24.



AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ ELŐADÁSOK JEGYZÉKE

Mózes J, Gorác O, Ebrahimi F, Miszti C, Kardos G. A karbapenem felhasználás és az *Acinetobacter baumannii* klónok előfordulása közötti összefüggés vizsgálata a Debreceni Egyetemen. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2014. évi Nagygyűlése, Keszthely 2014.

Mózes J, Gorác O, Ebrahimi F, Kardos G. Examination of integron carriage and identification of resistance genes in integron associated gene cassettes among Nosocomial *Acinetobacter* ssp. 5th Central European Forum for Microbiology, 2013, Keszthely, Hungary.

Mózes J, Ebrahimi F, Szűcs I, Szilasi M, Orosi P, Kardos G. A virulencia gének előfordulásának vizsgálata lélegeztetett betegekből származó *Pseudomonas aeruginosa* izolátumok körében. DOSZ, Tavaszi Szél Konferencia, Sopron 2013.

Mózes J, Szűcs I, Molnár D, Jakab P, Ebrahimi F, Szilasi M, Majoros L, Orosi P, Kardos G. Investigation of the genetic background of aminoglycoside resistance and the distribution of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa*. 4th Central European Forum for Microbiology, 2012, Keszthely, Hungary

Mózes J, Gorác O, Ebrahimi F, Gábor K. Az aminoglikozid és tetraciklin rezisztencia genetikai hátterének vizsgálata *Acinetobacter* izolátumok körében. XIII. RODOSZ Konferencia Kolozsvár, Románia 2012.

Mózes J, Ebrahimi F, Szűcs I, Szilasi M, Orosi P, Kardos G. Examination of the distribution of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolates. European Medical Students Conference, 2012, Debrecen, Hungary

A kutatás Mec8/2008 DEOEC és az Európai Unió és Magyarország támogatásával a TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024, valamint a TÁMOP 4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú "Nemzeti Kiválóság Program - Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program" című kiemelt projekt keretei között valósult meg.