

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Intenzív osztályokon fertőzést okozó *Acinetobacter baumannii* törzsek vizsgálata

Szentkirályi Éva
Biológus MSc
II. évfolyam
Pécsi Tudományegyetem

Témavezető: Dr. Kerényi Mónika

Tartalomjegyzék

I. Bevezető.....	3
<i>Acinetobacter</i> nemzetség.....	4
<i>Acinetobacter baumannii</i>	7
<i>Acinetobacter baumannii</i> antibiotikum rezisztenciája	8
<i>Acinetobacter baumannii</i> virulenciája és virulencia faktorai.....	11
II. Célkitűzés	14
III. Anyag és módszer	14
<i>Acinetobacter</i> törzsek klónalításának vizsgálata RAPD-PCR-al	15
Antibiotikum érzékenységi vizsgálat korong diffúziós módszerrel	16
Biofilmképzés vizsgálata.....	16
Agglutináció	16
Tok poliszacharid kereszt-reakció kimutatása latex agglutinációval	16
Fimbriális adhezinek kimutatása hemagglutinációval	17
Szérumrezisztencia.....	17
Sziderofórok kimutatása.....	17
IV. Eredmények és értékelésük	18
V. Összefoglalás.....	32
VI. Irodalom	34
VII. Köszönetnyilvánítás.....	37
VIII. Függelék	38

I. Bevezető

„Az új évezred küszöbére az a paradox helyzet állt elő, hogy sokféle antibiotikummal rendelkezünk, és mégis a fertőző betegségek jelentik a világon a második – az Egyesült Államokban a harmadik – leggyakoribb halálozási okot. Ehhez a helyzethez az vezetett, hogy a mikrobák antibiotikumok iránti rezisztenciája világszerte egyre növekszik és terjed. Amennyiben az egyes országok nem lépnek ezen a téren, az emberiség fertőzések szempontjából ugyanabba a helyzetbe kerül, mint amiben az antibiotikumok felfedezése előtt volt, a fertőző betegségek letalitása növekedni fog” (Szalka 2008). „Egyre gyakoribb a multi- és pánrezisztens mikrobák izolálása, ugyanakkor ezeknek a fertőzéseknek a leküzdésére a közeljövőben nem várhatók újabb antibiotikumok” (Szalka 2011). Az előbbi idézetekben Dr. Szalka András a fertőzőbetegségek szakorvosa tökéletesen érzékelteti a fertőző betegségek, köztük a kórházi fertőzések égető problémáját. Ebből is látszik, hogy ma a kórházi fertőzések okozta gond talán még aktuálisabb, mint eddig bármikor.

Érdemes kitérni konkrétan a Gram-negatív baktériumok szerepére a kórházi fertőzések tekintetében. Mára az egyik legnagyobb gondot jelentik az egészségügyben, mivel ezek a kórokozók okolhatók az összes kórházi fertőzés 70-80%-ért (Jurányi 1998). A leggyakoribb Gram-negatív kórokozók között említhetjük meg az *Escherichia coli*-t, *Pseudomonas aeruginosa*-t, a klebsiellákat, proteusokat, enterobaktereket, serratiákat és acinetobaktereket (Jurányi 1998). Az előbb említett mikroorganizmusok a húgyúti fertőzések 40%-át, a tüdőgyulladások 15-20%-át, a műtét utáni sebfertőzések 15-20%-át és a vérmérgezések 7-8%-át okozzák (Jurányi 1998). Legtöbbjük az emberi szervezet normál flórájának vagy közvetlen környezetének tagja. Általában a legtöbb kórokozó opportunistá patogén, vagyis ép immunrendszer mellett ritkán és akkor is csak enyhe megbetegedést okoznak, ám legyengült állapotban (Crohn betegség, AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome, Diabetes mellitus: cukorbetegség) illetve újszülötteknél komoly fertőzések okozói lehetnek. Fontos hangsúlyozni, hogy ezek a megbetegedések sokszor halállal végződnek. A halálozási arány magas (Perez et. al 2007), elérheti az 54%-ot (Russo et al. 2010)! A nem megfelelő antibiotikum megválasztása illetve a túlzott mértékű antibiotikum használat jelenti a legnagyobb problémát a kórházi fertőzésekkel kapcsolatban. „Ha a kezelésben nem érvényesül az az egyszerű alapkövetelmény, hogy antibiogram alapján célzott antimikrobás kezelést alkalmazzanak lehetőleg szűk spektrumú antibiotikummal, akkor a rezisztens klónok szelektálódnak és dominánssá válnak. Ezek mesterséges módon segítik a rezisztencia plazmid

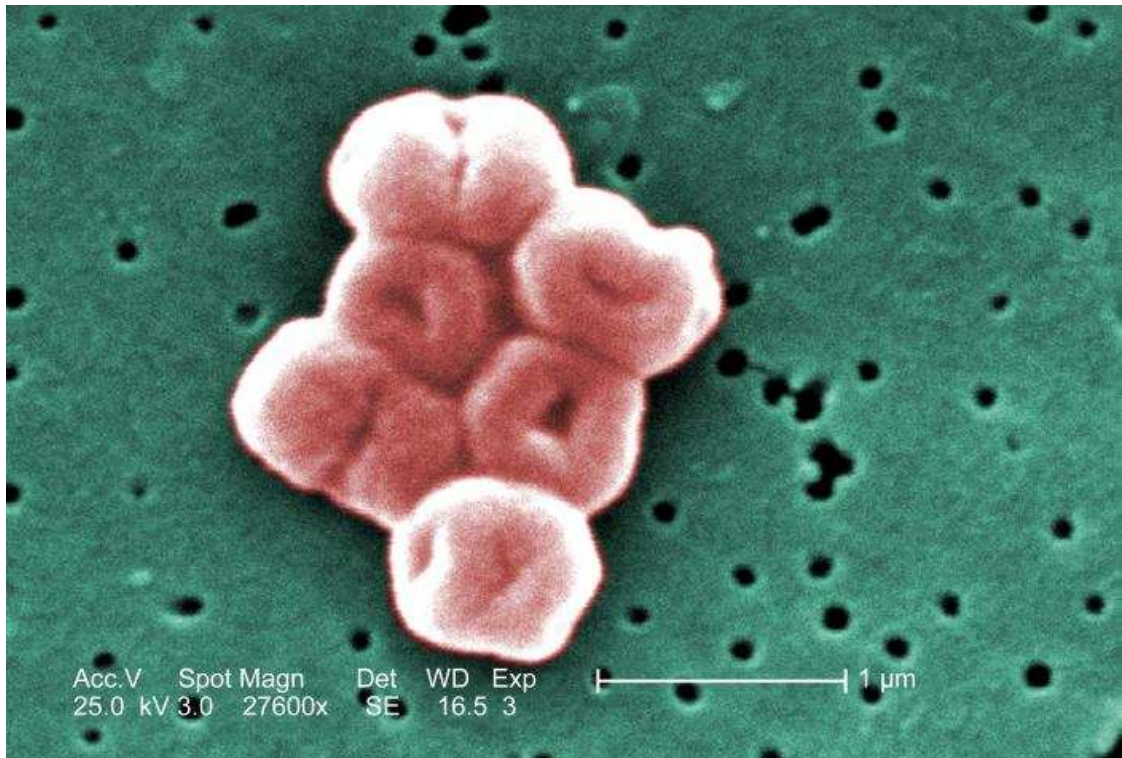
előfordulásának gyakoriságát és elterjedését” (Gergely 1999). Ennek az intenzív osztályokon különösen nagy jelentősége van, mivel itt a betegek állapota miatt igen nagymértékben használnak antibiotikumokat. Mára már vizsgálatok eredményei bizonyítják, hogy a célzott antibakteriális terápia olcsóbb és hatékonyabb (Szalka 2000). Lényeges kiemelni, hogy az intenzív osztályokon a nosocomialis fertőzések száma többszöröse a nem intenzív osztályokhoz képest (Orosi et al. 2007).

***Acinetobacter* nemzetség:**

Gram-negatív, nem fermentáló aerob baktériumok tartoznak ide. Az *Acinetobacter* nemzetség a *Moraxellaceae* család tagja, amelybe beletartozik a *Moraxella*, *Acinetobacter* és a *Psychrobacter* nemzetség (Kurcik - Trajkovska 2009, Bergogne-Bérézin - Towner 1996). A besorolás alapját a 16S rRNS és a rDNS-DNS hibridizációs technikák adják. Több mint 30 különböző fajt írtak már le DNS hibridizációs technika segítségével. A kórházi fertőzéseket tekintve kiemelendő az *Acinetobacter baumannii*. (1. táblázat, 1. ábra)

Scientific classification	
Kingdom	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Class	Gamma Proteobacteria
Order	Pseudomonadales
Family	Moraxellaceae
Genus	<i>Acinetobacter</i> (DNA G+C content 39-47 mol%)
Species of Clinical Importance	<i>A. baumannii</i> <i>A. haemolyticus</i> <i>A. calcoaceticus</i> <i>A. lwoffii</i>

1. táblázat *Acinetobacter* nemzetség orvosi jelentőséggel bíró fajainak rendszerbe sorolása (Kurcik-Trajkovska 2009)



1. ábra *Acinetobacter baumannii*

(<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>)

Előfordulás: Megtalálhatók a talajban, ivóvízben, szennyvízben, állatokban, bizonyos élelmiszerben (szárnyas) is, normál bőrflóra tagjai is lehetnek, emiatt is nevezik őket ubiquiternek. Azonban különbség van a természetben, élelmiszerben és kórházban előfordulók között. Egyéb *Acinetobacter spp.* tartoznak az első kettőhöz, utóbbihoz sorolhatók az *Acinetobacter baumannii* és *Acinetobacter calcoaceticus* például. Nedves területekről könnyű izolálni őket: hónalj, lágyék, lábujjak, máskor kitenyészthetők kórházi betegek és a személyzet bőréről, kórházi berendezésekről. Ebből adódóan a kórházi fertőzések létrejöttében nagy szerepük van.

Tenyésztés: Kitenyésztésükhöz standard laboratóriumi táptalajok - trypticase szója agar, agy-szív infúziós agar – a legalkalmasabbak, de egyszerű tápagaron is jól növekszik. MacConkey táptalaj, eozin metilénkék (EMB) táptalaj, véres agar táptalaj vagy szelektív folyékony kultúra szintén jól használható. 33-42°C közötti hőmérsékleten szaporodnak. *Acinetobacter* törzsek növekedéséhez ásványi anyag tartalmú táptalaj például szénforrás: acetát, laktát vagy piruvát szükséges. Ezen kívül antibiotikum tartalmú szelektív táptalaj (Leeds *Acinetobacter* Medium) ugyanúgy használható (Bergogne-Bérézin - Towner 1996).

Morfológia: Véres agaron pigmentet nem termel, a kolóniák fehér vagy krémszínűek, simák vagy mucoidok és átlátszatlanok, 1-2 mm átmérőjűek. Mikroszkóp alatt coccobacillus alakú baktériumok. Tokképzés esetén mucózus lehet.

Fenotípusos meghatározás: Gram-negatív, nem mozgó, nem fermentáló baktériumok. Szigorúan aerobok, tág hőmérsékleti tartományban szaporodnak. Kedveli a pH 5,5 - 6,0-os közeget. Oxidáz negatívak, citrát és kataláz pozitívak. Nitrát-redukció (nitrát nitrit átalakítás) a legtöbb törzsnél nem tapasztalható. Phospholipáz C segítségével némely törzs hemolizál véres agar táptalajon.

Molekuláris meghatározás: 16S rDNS oligonukleotid próbát használják általánosan. E mellett a DNS-DNS hibridizációs módszer – gold standard - is jól használható. A két technika eredményei nem tökéletesen feleltethetők meg egymásnak. Alkalmazzák még az AFLP-t (amplified fragment length polymorphism), ARDRA-t (amplified r DNA restriction analysis), ribotyping-ot, tDNA spacer fingerprinting, illetve 16S-23S spacer analysis-t is. (Gergely 1999).

Klinikai jelentőség: Gyakorlatilag a személyzettől kezdve a betegeken át az eszközökig mindenhol megtalálhatók. Képesek életben maradni napokig, akár hetekig is berendezéseken, de még a levegőben is, bár ez ritka. Terjedésüket segíti a betegek intravénás, húgyúti katéterezése, lélegeztető berendezések használata, invazív eszközök alkalmazása is. (Gergely 1999)

Járványtan: A bőrflóra tagjaként egészséges emberek minimum 25%-a, a kórházi betegek akár 75%-a is hordozhatja az *Acinetobacter baumannii* baktériumot. Kutatások kimutatták, hogy nagyarányú kolonizációval kell számolni az intenzív osztályon, ez legfőképpen a légzőrendszert, emésztőrendszert, bőrt érinti. A fertőzés kialakulásához, áttérjedéséhez ezek, illetve a személyzet kezei sokban hozzájárulnak. Endogén fertőzés kialakulása kisebb (Gergely 1999).

Betegségek: A klinikumban fokozottan az érdeklődés középpontjába került. Egyrészt, mert opportunista kórokozóként súlyos kórképekkel járó kórházi megbetegedéseket okozhat másrészt, mert gyakran a kombinált antibiotikum terápia sem jelent megoldást ellene. Aggasztó, hogy a rezisztens törzsek száma rohamosan emelkedik, mivel így a terápia meglehetősen nehéz. Legyengült immunrendszer mellett fokozott a veszély, hogy a beteget megbetegíti. Növeli a kockázatot, ha a betegen sebészeti vagy traumatológiai beavatkozást végeztek el. Égési sérülés, rosszindulatú betegségek tovább rontják a beteg helyzetét. Gyakori a vérmérgezés, szívbelhártya-gyulladás, agyhártya-gyulladás, húgyúti fertőzés, bőr-és sebfertőzés (Gergely 1999).

Terápia: Carbapenemek, amik elsőként javasoltak. E mellett ott van a tigecyclin, amikacin, tobramycin, ceftazidim vagy ciprofloxacin. Amennyiben ezek nem használnak,

szóba jöhet a polymixin B, colistin. Viszont ezekkel vigyázni kell, mert bizonyítottan vese-és neurotoxikusak (Kurcik - Trajkoska 2009, Towner 2006, Werndt et al. 1997).

Multirezisztens *Acinetobacter* törzsek: Jellemzőjük, hogy általában rezisztensek fluorokinolonokra, aminoglikozidokra, cephalosporinokra, bétalaktám anibitikumokra. A rezisztencia háttérben plazmidon, transzpozonon, integronon kódolt gének állnak. A konjugáció jelentős szerephez jut a rezisztencia kialakulásában.

Patogenezis: Az *Acinetobacter* spp. törzsekre jellemzője, hogy betegről-betegre gyorsan terjednek, jól bírják a kiszáradást és akár több napon át képesek túlélni az élettelen környezetben, ezáltal hosszantartó fertőzések kialakulását, fennmaradását idézhetik elő (Braun - Vidotto 2004). A legnagyobb gond velük a gyorsan kialakuló és a nagy mértékű antibiotikum rezisztencia (King et al. 2009).

***Acinetobacter baumannii*:**

A normál bőrflóra tagja. Betegről-betegre gyorsan terjed. Jól bírja a kiszáradást (Werndt et al. 1997), több napon át túlélhet a környezetben és járványokat okozhat (Braun - Vidotto 2004). Jellemző, hogy a kórházban kezelt betegeken gyakrabban találjuk meg (Bergogne-Bérézin - Towner 1996). Főként a garatból, légzőrendszerből és a bőrről izolálható. Az egyik legjelentősebb kórházi kórokozó az *Acinetobacter* spp. közül (Bergogne-Bérézin - Towner 1996). A kórházi fertőzések 9%-ért felelős (King et al. 2009). Nagy gondot okoz a nagymértékű antibiotikum rezisztencia (King et al. 2009). A világ minden táján okoz egyre nagyobb mértékben megbetegedéseket. Érintett ma már Európa, Észak-Amerika, Argentína, Brazília, Kína, Japán, Korea, Hong Kong, Anglia, USA katonai és nem katonai személyzete, Irakban illetve Afganisztánban megsérült katonák különösen (Perez et al. 2007). Elsősorban intenzív osztályokon okoz fertőzéseket. Általában nagyon gyenge immunrendszerű betegeket támad meg. Lélegeztetéssel összefüggő tüdőgyulladást, húgyúti-és véráramfertőzéseket okoz. A halálozási arány átlagban 30%, ami magas (Bergogne-Bérézin - Towner 1996). Ma már sugárzásnak ellenálló, alkohol alapú fertőtlenítő szerekek ellenálló törzsek is ismertek (Durante-Mangoni - Zarrelli 2011). Kolonizációban, virulenciában szerepet játszó faktorokat leírtak már, de még keveset tudunk ezekről. Patogenezisééről tudjuk, hogy komplex, mégis erről és az ebben szerepet játszó virulencia faktorairól alig tudunk valamit (Russo et al. 2010, King et al. 2009).

A következő fejezet részletesen bemutatja, hogy jelen tudás szerint mi is segíti ezt a baktériumot abban, hogy ilyen mértékű fertőzéseket okozzon.

Acinetobacter baumannii antibiotikum rezisztenciája:

Mint azt korábban már említettem nagyon nagy probléma a gyorsan kialakuló és a nagy mértékű antibiotikum rezisztencia (King et al. 2009). Az antibiotikum rezisztencia kialakulásához nagyban hozzájárul a konjugáció, a plazmidok, a transzpozonok és az integronok (Bergogne-Bérézin - Towner 1996). Az utóbbi évek új felfedezése, hogy az integronokon elhelyezkedő integráz gének hozzájárulhatnak az antibiotikum rezisztencia kialakulásához (Koeleman et al. 2001).

Integrázok: Integronokon elhelyezkedő, génkazettákban lévő gének. Konzerváltak, transzpozonszerű DNS-ből álló, mozgásra képes genetikai elemek. Kivágásuk és inszerciójuk helyspecifikus rekombináz segítségével valósul meg, mely az integrázok családjának tagja. Az integrázok különböző funkcióiért az 5' konzervált végen lévő három komponens felelős: 1. IntI integrázt kódoló *intI* gén, 2. a génkazetta integrációs részét kódoló *attI* gén, 3. egy vagy több promóter. Az *intI* gének szekvencia különbségei alapján négy csoportja van az integronoknak, ezek közül három (1. 2 .3. osztály) antibiotikum rezisztenciáért felelős génkazettákat hordozhat. Jelenleg körülbelül 60 különböző génkazetta ismert ezek közül.

1. osztályú integronok: Túlnyomórészt a 3' konzervált végen elhelyezkedő *sulI* génnel kapcsolatba hozhatók.
2. osztályú integronok: Ide tartozik a Tn7 transzpozon és a rokon elemek.
3. osztályú integronok: Mindezidáig csupán egy integront írtak le ebben az osztályban.

Az integronok nagy része az 1. osztályú integronok csoportjába sorolható be. Ezeknek lehet nagy jelentősége az antibiotikum rezisztencia kialakulása szempontjából. Az antibiotikum rezisztencia kialakulásához hozzájárul a biofilmképzés is, melyet részletesen a későbbiekben fejtek ki.

Az *Acinetobacter baumannii*-nak számos lehetősége van kivédeni az antibiotikumok támadását. Ezek a következők:

Béta-laktámokkal szembeni rezisztencia: Béta-laktamáz enzim általa a baktérium képes elhidrolizálni a béta-laktám antibiotikumokat (Perez et al. 2007). Penicillin-kötő fehérjék védhetik ki a penicillinek hatását, számos porin csökkentheti a permeabilitást és ezáltal az antibiotikumok baktériumokra kifejtett hatását, efflux pumpák működésével kijuttathatja a baktérium a sejtbe bejutott antibiotikumot (Perez et al. 2007).

A-típusú Béta-laktamáz: TEM-1, *Acinetobacter baumannii*-nál számos esetben kimutatható. Széles-spektrumú béta-laktamázokat csak mostanában sikerült azonosítani *Acinetobacter baumannii*-nál. Ilyen például a PER-1 (penicillinekkel - ceftazidim, cefepim - szembeni

rezisztencia, Törökország, Korea, Franciaország, Belgium, Bolívia, USA), VEB-1 (Franciaország, Belgium), SHV-12 (Kína, Hollandia), TEM-116 (Hollandia), TEM-92 (Olaszország), CTX-M-2 (cefotaximmal és ceftriaxonnal szembeni rezisztencia, Japán, Bolívia).

B-típusú Béta-laktamáz: Közülük kimagasló arányban fordulnak elő a metallo-béta-laktamázok (carbapenemekkel illetve minden más béta-laktám antibiotikummal szembeni rezisztencia, elterjedésük világméretű) (Perez et al. 2007). Jellemzőjük, hogy aktív centrumukban vas ion található. Ilyen enzim az IMP, mely ma már világszerte számos fajban előfordul. *Acinetobacter baumannii*-nál általában I. típusú integronon található. Ennél a fajnál számos ilyen enzim lett leírva: IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-11. Japánban, Koreában, Brazíliában és a Pacifikus gyűrűt övező országokban. A VIM típusú metallo-béta-laktamázok közül a VIM-2 fordul elő *Acinetobacter baumannii*-nál (Korea). Az utóbbi időben figyelték meg, hogy Koreában felbukkant a SIM-1 imipenemáz (imipenem rezisztencia).

C-típusú béta-laktamázok: *Acinetobacter baumannii* esetében kromoszómán kódoltak az ilyen típusú enzimek kódolásáért felelős gének (*ampC*, *bla* gének). A *bla* gének C típusú cephalosporinázt kódolnak (penicillinek, szűk és széles spektrumú cephalosporinok, de nem a cefepim és nem a carbapenemek rezisztenciájáért felelősek, ceftazidim rezisztencia). Az ADC gének számos variációja ismert *acinetobacter* fajokban.

D-típusú béta-laktamázok: OXA béta-laktamázok sorolhatók ide (penicillin rezisztencia, oxacillin rezisztencia). Képes a széles spektrumú cephalosporinokat bontani. A legnagyobb gond, hogy inaktiválja a carbapenemeket. A carbapenemeket hidrolizáló enzimek kromoszómán kódoltak: OXA-23 elterjedt Skóciában, Angliában, Brazíliában, Polinéziában, Koreában és Kínában. OXA-58 elterjedési területe Franciaország, Anglia, Argentína, Spanyolország, Törökország, Románia, Ausztria, Görögország, Skócia és Kuwait. OXA-40 és OXA-58 már elterjedt a Föld nyugati féltekén. OXA—51/69-szerű béta-laktamázok természetes módon fordulnak elő az *Acinetobacter baumannii* genetikai állományában, kromoszómán kódoltak és már négy kontinensen megjelentek. OXA-24 szintén kromoszómán kódolt. A legújabb eredmények alapján fontos szerepet tulajdonítanak neki a Tyr112 és Met223 oldalláncok katalizálásában.

Aminoglikozidok: Aminoglikozid-módosító enzimek, aminoglikozid foszfortranszferáz, aminoglikozid acetiltranszferáz, aminoglikozid nukleotidtranszferáz, illetve efflux pumpák által valósulhat meg a velük szemben kialakuló rezisztencia (Perez et al. 2007). Az aminoglikozidokat bontó enzimeket az *aphA1*, *aphA6*, *aacC1*, *aacC2*, *aacC4*, *aadA1* és *aadB*

gének közvetítik. Újabban már ismert az *aac(6)-Iad* gén, amely amikacin rezisztencia hátterében állhat, Japánban írták le (Perez et al. 2007). *Acinetobacter baumannii*-nál egyszerre két funkcióval rendelkező aminoglikozid-módosító enzimeket még nem írtak le.

Quinolonok: Általában a DNS-giráz enzim szerkezetében másodlagosan bekövetkező mutáció járul hozzá, ezt a *gyrA* és *gyrC* gének rezisztenciáért felelős régiói határozzák meg (Perez et al. 2007). Ennek következtében alacsonyabb affinitással fognak kötni a quinolonok a DNS-enzim komplexhez. Így quinolonokkal szembeni rezisztencia alakul ki. Quinolonokkal szembeni rezisztenciát efflux pumpák működése is okozhat. Quinolonok közé sorolható: ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, trovafloxacin, gemifloxacin, moxifloxacin. *Acinetobacter baumannii*-nál ciprofloxacin rezisztenciát kódoló gént vagy plazmidon kódolt quinolon rezisztenciáért felelős gént (*qnr* gének) még nem írtak le (Perez et al. 2007).

Tetracyclinek: Több módon alakulhat ki tetracyclin rezisztencia. Két transzpozonon kódolt efflux pumpa játszik szerepet ebben, ezek a TetA és TetB (Perez et al. 2007). A TetA csak a tetracyclint juttatja ki a sejtől, a TetB viszont mind a tetracyclint, mind a minocyclint. Ki kell emelnünk a riboszómavédő fehérje termelés jelentőségét. Ezt a fehérjét a *tetM* gén kódolja. Ez rezisztenciát alakít ki tetracyclinekkel, minocyclinekkel, doxycyclinnel szemben. Mindezekon kívül az AdeABC efflux pumpának is van szerepe a tetracyclin rezisztenciát tekintve. Ez a tetracyclinekkel, gentamicinnel, levofloxacinnal és chloramphenikollal szemben is védi a sejtet.

Polymyxinek: Polymyxin B és E (colistin) tartozik ide. Polymyxin B-vel szembeni rezisztencia 2001-től kezdődően ismert. Megjelent a heterorezisztencia *Acinetobacter baumannii* törzseknél. Feltételezhetően a colistinnal szembeni rezisztenciát a lipopoliszacharid változása okozza (Perez et al. 2007). Szerepet játszhat még az acidifikáció, aciláció vagy sejtmembránon lévő antigének (Perez et al. 2007).

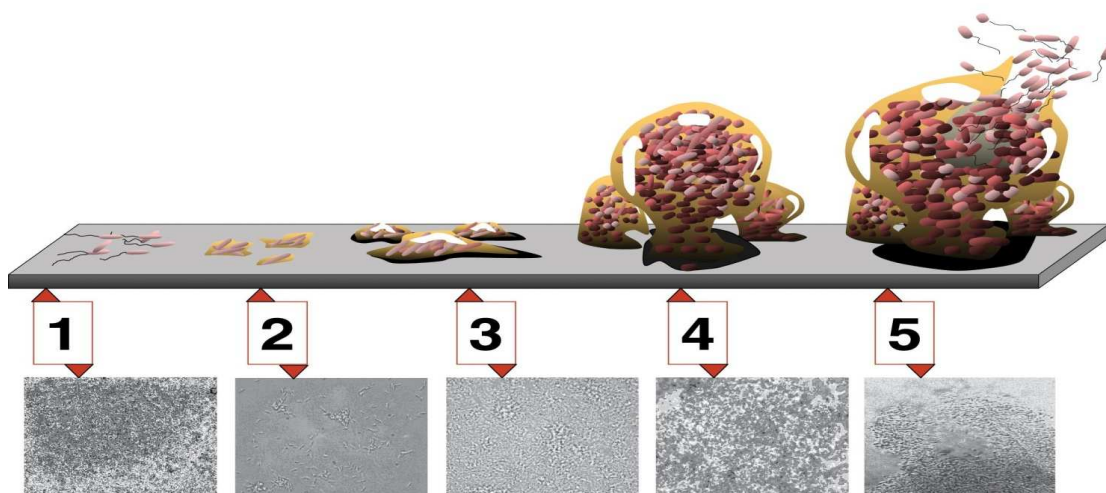
Külső membránproteinek és penicillinkötő fehérjék megváltozása: Egyenlőre ezek vizsgálata folyamatban van. Ma még csak annyit tudunk, hogy csökkent külső membránprotein képzés együtt járhat nagyobb mennyiségű C-típusú cephalosporináz kibocsátásával. Másrészt külső membránprotein elvesztése együtt járhat OXA-24 enzim termelésével, így kialakulhat a carbapenem rezisztencia. Mostanában derült ki, hogy a CarO fehérje imipenem és meropenem rezisztencia kialakulásához járulhat hozzá (Perez et al. 2007). *Acinetobacter baumannii*-nál a carbapenem rezisztencia kialakulását segítheti a PBP (Penicillin Binding Protein)-2 elvesztése. Ezt már leírták Spanyolország területén belül. Mindehhez hozzájárult ezen törzseknél a külső membránprotein elvesztése is.

Efflux pumpák: Számos antibiotikummal szemben alakítanak ki rezisztenciát. Számos típusuk ismert. *Acinetobacter baumannii*-nál az AdeABC jól ismert. Ez az aminoglikozidokkal, cefotaximmal, tetracyclinekkel, erythromycinnel, chloramphenicollal, trimethoprimmel és fluoroquinolonokkal szemben alakíthat ki rezisztenciát. Amennyiben az adott baktériumsejtnél túl sok fejeződik ki úgy carbapenem rezisztenciáért is felelős lehet. A megfelelő mennyiségben való képződéséért az *adeR* és *adeS* gének felelősek. Ezen génekben bekövetkező pontmutációk eredményezhetik az előbb említett efflux pumpa túlzott mértékű sejtfelszíni megjelenését és túlműködését. *Acinetobacter baumannii*-nál nemrég leírtak egy újabb efflux pumpát. Ez AbeM-ként vált ismertté. Fluoroquinolonokkal és más toxikus anyagokkal szemben alakít ki rezisztenciát.

Acinetobacter baumannii virulenciája és virulencia faktorai:

A virulencia nem más, mint a kórokozó azon képessége, amellyel segíti a kórokozó a gazdaszervezet ellenálló-képességének leküzdését. Virulenciát a virulencia faktorok összessége határozza meg. Virulencia faktorok közé sorolható: hidrofób tulajdonság (segíti katétereken stb. való megtapadást), tok (fagocitózis ellen véd), fimbria (kitapadást segíti), csilló vagy ostor (mozgás), enzimek (zsírsavbontás által sejthártya károsítása), sziderophorok (életben maradást segíti vasfelhasználás által), sejtfal lipopoliszacharid (lipid A - toxikus), biofilm. A baktériumok virulenciájáért felelős tulajdonságok nem fejeződnek ki állandóan, képzésüket nagymértékben befolyásolják a környezeti tényezők (Kocsis - Emődy 2003).

Biofilm: A biofilm nem más, mint a baktérium sejtek által termelt extracelluláris mátrixba ágyazott baktériumtömeg (Hoiby et al. 2010). Kialakulhat a fog felszínén, műanyagból készült eszköz, vagy készülék felszínén (pacemaker), üvegből készült eszközökön, epithel sejteken, gombafonalakon, polisztrénen, szívbillentyűkön, tüdőben, középfülben. Az antibiotikum rezisztencia és a biofilmképzés összefügg, mivel az antibiotikum nem jut el a baktériumhoz a biofilmképzés által, ezért ez hozzájárul az antibiotikum rezisztencia kialakulásához (King et al. 2009). Tudjuk, hogy a szabadon és a biofilmben előforduló baktérium sejtek tulajdonságai eltérnek, e közé sorolható az is, hogy 100-1000-szer nagyobb az antibiotikumokkal szembeni ellenálló-képessége a biofilmben lévő baktérium sejteknek, mint a szabadon lévőeknek, ezáltal krónikus fertőzések kialakulását segíti elő a biofilm megjelenése a szervezetben (Hoiby et al. 2010). Ennek tudható be az is, hogy a biofilm jelenlétének a krónikus tüdőgyulladás kialakulásában különösen fontos szerepe van (King et al. 2009). A biofilm kialakulását a **2. ábra** szemlélteti:



2. ábra Biofilm kialakulásának folyamata
(http://www.ecogien.ie/DF_Biofilm.htm)

1. Felszínhez kötődés, adhézió. Ez az egyik legjelentősebb folyamat a fertőzés korai fázisában. Fimbriáknak és az adhezineknek van ebben nagy szerepe.
2. Nagy mennyiségű extracelluláris poliszacharid mátrix termelése baktériumsejtek által.
3. Újabb és újabb baktériumsejtek létrejötte, megtelepedése. Más fajok baktériumsejtjei is betelepülhetnek, ekkor beszélünk bakteriális konzorciumról.
4. Kolonizáció, baktériumsejtek rohamos tempóban szaporodnak.
5. Leváló baktériumsejtek által való tovaterjedése a biofilmnek, mely hozzájárul a fertőzés gyors elterjedéséhez a szervezetben.

A biofilm fontos része a baktériumok által termelt poliszacharid, mely a szérumrezisztencia valószínűségét növeli (Gordon - Wareham 2010). Lényeges kiemelni, hogy a mutáció valószínűsége a biofilmben lévő baktérium sejteknél nagyobb ez viszont elősegíti, hogy a sejtek ellenállóbbak legyenek az antibiotikumokkal szemben (Hoiby et al. 2010). Ennek hátterében az áll, hogy a biofilmet képző baktériumsejteknél nő a géntranszfer gyakorisága is (Hoiby et al. 2010), így viszont egyik sejtől a másikba antibiotikum rezisztenciáért felelős gének juthatnak át. A biofilmen belül elhelyezkedő baktériumok szimultán képesek többfajta enzimet kibocsátani környezetükbe, ezzel is hozzájárulva az antibiotikum rezisztencia kialakulásához (Hoiby et al. 2010). Ezek képesek az efflux pumpák működését is felgyorsítani, ezáltal segítik a baktérium sejtől kipumpálni a bejutott antibiotikumot (Hoiby et al. 2010). Boles és Singh mutatta ki, hogy az endogén, sejten belüli oxidatív stressz növeli

az antibiotikum rezisztencia lehetőségét biofilmet képző baktérium sejtek esetében (Hoiby et al. 2010).

Tok poliszacharid jelenléte esetén a baktérium ellenállhat a fehérvérsejtek antibakteriális hatásának (Russo et al. 2010). Gátolhatja a fagocitózist poliszacharidjai által, mivel ezek erősen hidrofil tulajdonságúak, negatív töltésűek így a negatív töltésű fagocitasejteket taszítják (Kocsis - Emödy 2003). Emellett a C3b opszonizáló (felületet beborító) hatását megakadályozhatja. Az irodalom fő virulencia faktorként említi *Acinetobacter baumannii* esetében (Russo et al. 2010).

Fimbriák közül némelyik képes agglutinálni 0-s emberi vércsoport vörösvértestjeivel, mannóz gátolhatja, ilyenkor a fimbriának a mannóz receptora. Ha viszont a fimbria mannóz rezisztens mannóz jelenlétében is hemagglutinál a receptor (Eijkelkamp 2011, Braun - Vidotto 2004). A fimbriáknak szerepük van a felszínhez való tapadásban, így a biofilm képzésben (Gordon - Wareham 2010). Fimbriális adhezinek meghatározhatják a gazdaszervezeti fajlagosságot is (Kocsis - Emödy 2003). Legnagyobb részét a major alegység képezi, minor alegységek a végén helyezkednek el. Elektronmikroszkóppal láthatók. Fehérjetermészetűek. Körülbelül ezer alegység képezi őket. Két μm hosszú képletek a baktérium felszínén.

Szérumrezisztencia kialakulásához a lipopoliszacharid részben hozzájárul (King et al. 2009). Jelentős szerepe van viszont kialakulásában a komplemenrendszer gátlásának (King et al. 2009). Kísérletek során azt tapasztalták, hogy a vérszérumban hosszú ideig túlélő törzsek csekély mértékű biofilmet termelnek (King et al. 2009). Szérumrezisztencia esetén a baktérium kivédi a komplement és immunglobulin rendszert. A baktériumok által termelt extracelluláris poliszacharid, amely a biofilm fontos alkotóeleme, hozzájárulhat a szérumrezisztenciához (Gordon - Wareham 2010).

Sziderofórok a baktériumok által környezetükbe kibocsátott vaskötő fehérjék. A baktérium életben maradását növelik azáltal, hogy megkötik a kötött vasat, amely nélkül a baktérium nem marad életben. Fontos virulencia faktor. *Acinetobacter baumannii* esetében a legjobban tanulmányozott sziderofór az acinetobactin. *Acinetobacter baumannii*-nál három sziderofór termelésért felelős génklaszter ismert (Eijkelkamp 2011). Az acinetobactint ezen génklaszterek kódolják (Eijkelkamp 2011). A sziderofór kibocsátásban feltételezhetően efflux pumpák vesznek részt (Eijkelkamp 2011). A baktérium sejt felszínén vas-sziderofór komplexet kötő receptorok vannak (Eijkelkamp 2011). Jellemzően akkor termelődnek, amikor vashiányos állapot alakul ki (Eijkelkamp 2011).

Korábban már tapasztalták, hogy több virulencia faktor együttes jelenléte növeli a szervezetben való tovaterjedés valószínűségét (King et al. 2009). Amennyiben jobban megismerjük a virulencia faktorokat és az antibiotikum rezisztenciát úgy hatékonyabban tudjuk megelőzni, illetve leküzdeni a fertőzéseket és járványokat.

II. Célkitűzés

A Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézetébe pécsi intenzív osztályokról, 2007-2011 között, érkezett mintákból izolált multirezisztens *Acinetobacter baumannii* törzsek antibiotikum rezisztenciájának, virulencia faktorainak vizsgálata, illetve a törzsek azonos eredetének kimutatása molekuláris mikrobiológiai módszerrel.

III. Anyag és módszer

Tápfolyadékok:

Mueller-Hinton tápfolyadék (MH broth) (Biolab Kft.):

21 g port 1 l desztillált vízben feloldunk. Autoklávozzuk 121°C-on 15 percig. Lehülve sterilen steril csövekbe szétmérjük.

Trypticase soy broth tápfolyadék (TSB) (Scharlau Kft.):

30 g port feloldunk 1l vízben. 15 percig autoklávozzuk 121°C-on. Lehülve sterilen steril csövekbe szétmérjük.

Táptalajok:

Mueller-Hinton táptalaj (BioRad kft):

35 g port 1 l desztillált vízben 5 percig feloldunk. Autoklávozzuk 121°C-on 15 percig, majd kissé lehülve még folyékony állapotban Petri csészékbe 20-20 ml táptalajt öntünk.

Chrom-azurol S (CAS) táptalaj:

Törzs oldatok:

2mN CAS oldat (0,121 g CAS 100ml desztillált vízben oldva.)

1mM Fe oldat (1mM $\text{FeCl}_6\text{H}_2\text{O}$, 10mM HCl)

0.2 M 5-szulfoszalicilsav oldat

Elkészítés:

piperazin oldat: 4,307 g piperazin 30 ml vízben oldva pH 5,6. 6,26 ml cc. HCl-al
0,0219 g hexadeciltrimetilammónium bromid (HDTMA) 50ml vízben elkeverve majd ehhez
7,5 ml CAS oldatot, 1,5 ml Fe-oldatot, piperazin oldatot, 2 ml 5-szulfoszalicilsav oldatot
adunk és kiegészítjük vízzel 100 ml-re.

Táptalaj: Az előbbi oldatból adunk 1:1 arányban még folyékony minimal agar táptalajhoz,
amely 4% glukózt és 3% agart tartalmaz. Így végső formában a glukóz koncentráció 2%, a
táptalaj agaróz tartalma 1,5%.

festékek:

Kristályibolya oldat: 2% formalin, 0,5% etanol, 0,13% kristályibolya festék.

standard antibiotikum korongok (Bio-Rad Kft.):

ampicillin, ampicillin-sulbactam, amoxilillin-clavulánsav, cephalexin, nitrofurantoin,
cefuroxim, tobramycin, gentamycin, meropenem, imipenem, ceftazidim, ceftriaxon, cefepim
ciprofloxacin.

Klonalitás és antibiotikum rezisztencia vizsgálata:

Acinetobacter törzsek klónalitásának vizsgálata RAPD-PCR-al:

A vizsgálathoz Ready mixet (2x), steril PCR vizet, ERIC 2 primert (AAG TAA GTG ACT
GGG GTG AGC G) és főzött baktériumsejteket használtunk fel. Az alkalmazott PCR
program a következő volt: denaturáció 94 °C 1 perc, annealing 50°C 1 perc, polimerizáció 72
°C 2 percig. A ciklust 35-ször ismétlődött. Végül 72 °C-on 10 perc követte. A futtatás 1%-os
agaróz gélben történt 130V feszültséggel. Molekulasúly markarnak a Smartladder által
gyártott markert használtuk. 260 nm-es UV fény alatt értékeltük az eredményt.

Antibiotikum érzékenységi vizsgálat korong diffúziós módszerrel

(Kirby-Bauer módszerrel):

Első lépésként Mueller-Hinton tápfolyadékba oltottuk a törzseket és 1-3 órán át inkubáltunk, majd Mueller-Hinton táptalajra szélesztettük a mintáinkat. A kiszélesztett baktériumokra standard koncentrációjú antibiotikum korongokat tettünk (Kirby-Bauer módszer) és 37⁰C-on 24 órán át inkubáltunk. Az inkubáció után a korongok körül kialakult gátlási zónák nagyságát vizsgáltuk. Amennyiben kialakult gátlási zóna a vizsgált törzs érzékeny volt az adott antibiotikumra, ha nem alakult ki, akkor pedig rezisztens volt. A vizsgálat során standard gyári antibiotikum korongokat használtunk.

Virulencia faktorok vizsgálata:

Biofilmképzés vizsgálata:

A törzsek táptalajon történt egynapos tenyészetéből egy-egy telepet üvegcsövekben lévő steril TSB tápfolyadékba oltottuk. 24 órán át 37⁰C-on inkubáltunk. Ezt követően eltávolítottuk a tápfolyadékot, majd 1-szer mostuk fiziológiás sóoldattal. Néhány perces kristályibolya oldattal történő festést követően desztillált vízzel mostuk le a nem kötődött festéket.

Agglutináció:

Tok poliszacharid kereszt-reakció kimutatása latex agglutinációval

Egy cseppnyi PASTOREX K1 Meningitis latex (Bio-Rad Kft.) kitből kicseppentettünk egy cseppet a mellékelt kartonra, majd ebbe egy telep baktérium mennyiséget elkevertünk. A latex szemcsék agglutinációját pár percen belül meg lehetett figyelni. Negatív kontrollnak a kit negatív kontrollját használtuk.

Fimbriális adhezinek kimutatása hemagglutinációval

Vizsgálatunkhoz alvadásban gátolt birkavérrel dolgoztunk. A vért 2500 rpm-mel 5 percig lecentrifugáltuk, majd a felülúszót leszívtuk. A vörösvértestek mosását a következőképpen végeztük: a leszívott mennyiséggel azonos mennyiségű fiziológiás sóoldatot adtunk a vérhez, újból centrifugáltuk, majd eltávolítottuk a felülúszót. Ezt háromszor ismételtük. Végül fiziológiás sóoldattal 8%-os vörösvérsejt szuszpenziót készítettünk. Az így elkészült szuszpenzióból tárgylemezre egy cseppnyit tettünk s ezután összekevertük a baktérium teleppel. Pár perc elteltével megnéztük történt-e agglutináció.

Szérumrezisztencia:

5 ml fiziológiás sóoldatba belekevertük a baktériumot. 600 nm-en beállítottuk a csíraszámot 3×10^8 értékre McFarland standard alapján. 10^6 , majd 10^5 hígításokat készítettünk Eppendorf csőben. Ez utóbbi hígításból 10 mikrolitert kivettünk és hozzáadtuk 90 mikroliter vérszérumhoz. Ebből 10 mikrolitert a nulladik, majd harmadik órában kivettünk és Mueller-Hinton táptalaj felszínére oltottuk. 24 órán át 37°C -on történő inkubálás után csíraszámolást (telepszámolást) végeztünk. Összehasonlítottuk a 0. és a 3. óra után kitett minták telepszámaikat.

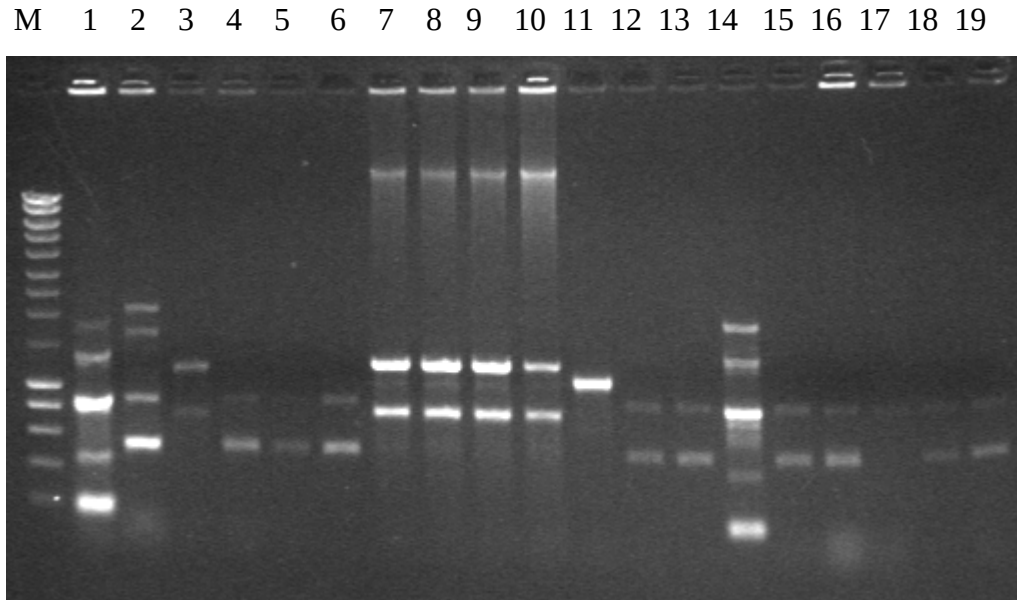
Sziderofórok kimutatása:

CAS táptalajra kiszélesztettük a baktériumokat majd 24 órán keresztül 37°C -on történő inkubálást követően megvizsgáltuk a telepek színét. Narancssárga szín jelezte a sziderofór jelenlétét.

IV. Eredmények és értékelésük

Kloonalitás és antibiotikum érzékenység vizsgálata:

***Acinetobacter* törzsek klonalitásának vizsgálata RAPD-PCR-al:**

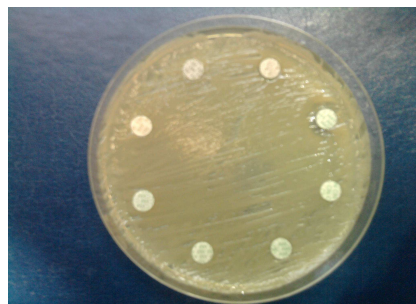


3. ábra A törzsek RAPD-PCR amplifikációs termékei 1% agaróz gélelektroforézis után (M=molekulasúly marker; 1.és 14. *Escherichia coli* - klinikai izolátum, 2. *Acinetobacter sp.* - klinikai izolátum, 3.-5. *Acinetobacter baumannii* (eü. személyzet szűréséből), 7.-10. *Achromobacter sp.* - klinikai izolátum, 11.-13. és 15.-19. *Acinetobacter baumannii* - klinikai izolátum)

A RAPD-PCR alapján a legtöbb törzs egy klónból származik. Látható, hogy a 3.-5. jelzésű illetve a 12., 13., és 15.-19. törzsek azonos termékeket adtak gélelektroforézis után (**3. ábra**). Valószínűleg egy klónhoz tartoznak.

Antibiotikum érzékenységi vizsgálat korong diffúziós módszerrel

(Kirby-Bauer módszerrel):



4. ábra Antibiotikum érzékenységi vizsgálat

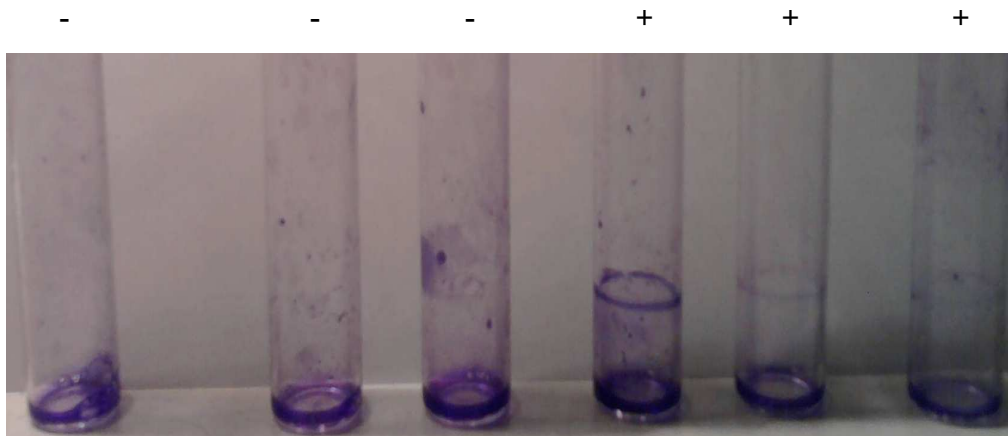
		Carbapenem		Cephalosporin		Aminoglikozid		Polimyxin	Glycylcyclin
	AMPICILLIN/ SULBACTAM	IMIPENEM	MEROPENEM	3. GEN.C	4.GEN.C.	GENTAMICIN	TOBRAMYCIN	COLISTIN	TIGECYCLIN
1	R	R	R	R	R	R	É	É	É
2	R	R	R	R	É	R	R	É	É
3	R	R	R	R	R	R	É	É	É
4	R	R	R	R	R	R	É	É	É
5	R	R	R	R	R	R	É	É	É
6	R	R	R	R	R	R	É	É	É
7	R	R	R	R	R	R	É	É	É
8	R	R	R	R	R	R	É	É	É
9	R	R	R	R	R	R	É	É	É
10	R	R	R	R	R	R	É	É	É
11	R	É	É	R	R	R	R	É	É
12	R	É	É	R	R	R	R	É	É
13	R	É	É	R	R	R	R	É	É
14	R	É	É	R	R	R	R	É	É
15	R	É	É	R	R	R	R	É	É
16	É	R	R	R	É	R	R	É	É
17	R	R	R	R	R	É	É	É	É
18	R	R	R	R	R	R	R	É	É
19	R	R	R	R	R	R	R	É	É
20	R	É	É	R	R	R	É	É	É

2. táblázat Antibiotikum érzékenységi vizsgálat eredménye

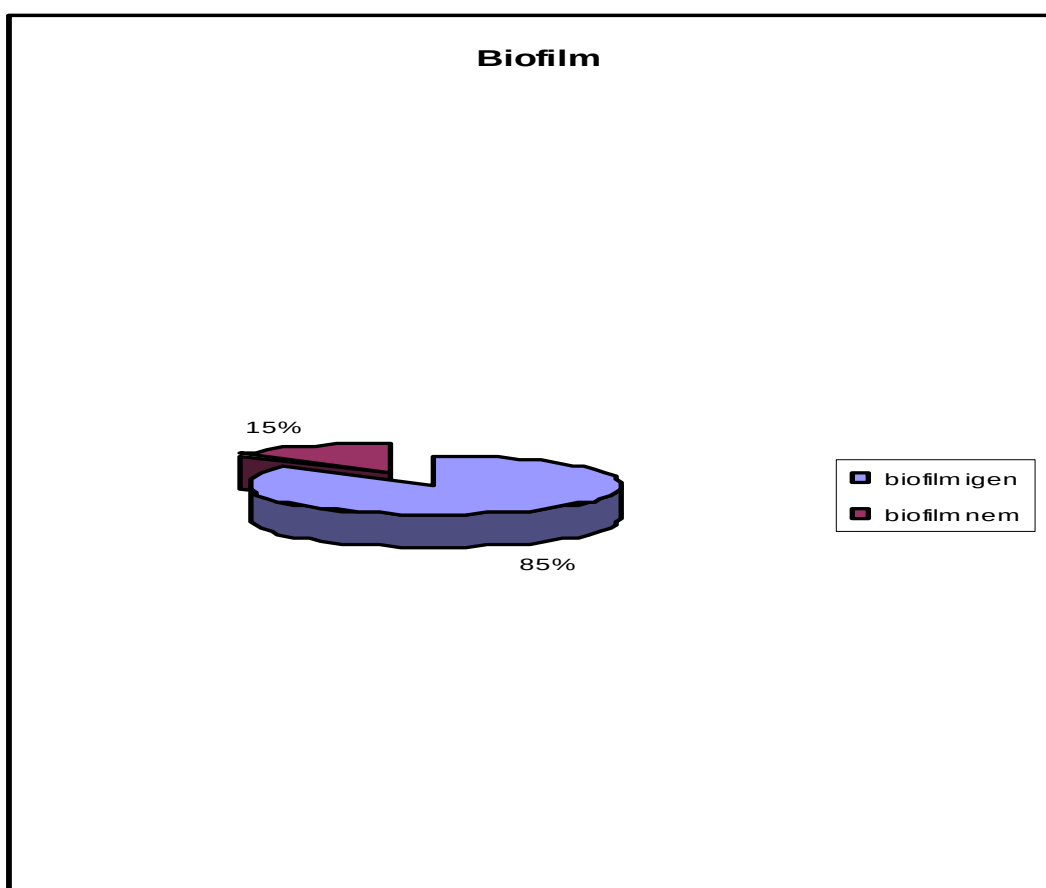
Vizsgálatunkban az adott antibiotikumra érzékeny volt az a törzs, amelynél az antibiotikum korong körül gátlási zóna alakult ki. Amennyiben nem volt gátlási zóna, akkor a törzs rezisztensnek mutatkozott (**4. ábra**). Ez alapján azt találtuk, hogy a vizsgált törzsek széles spektrumú antibiotikum rezisztenciával rendelkeznek (**2. táblázat**). A törzsek többségére kizárólag csak a tobramycin, colistin és tigecyclin hatott, tehát ezek a törzsek csak ezekre az antibiotikumra érzékenyek.

Virulencia faktorok vizsgálata:

Biofilmképzés vizsgálata:



5. ábra: Biofilm képzés vizsgálatának eredményei



6. ábra Biofilm képzés mértéke a vizsgált törzseknél

	Biofilm
1	+
2	+
3	-
4	+
5	+
6	+
7	+
8	-
9	-
10	+++
11	+++
12	+
13	+
14	+
15	+
16	+
17	+
18	+
19	+
20	+

3. táblázat Biofilm képzés vizsgálatának eredményei

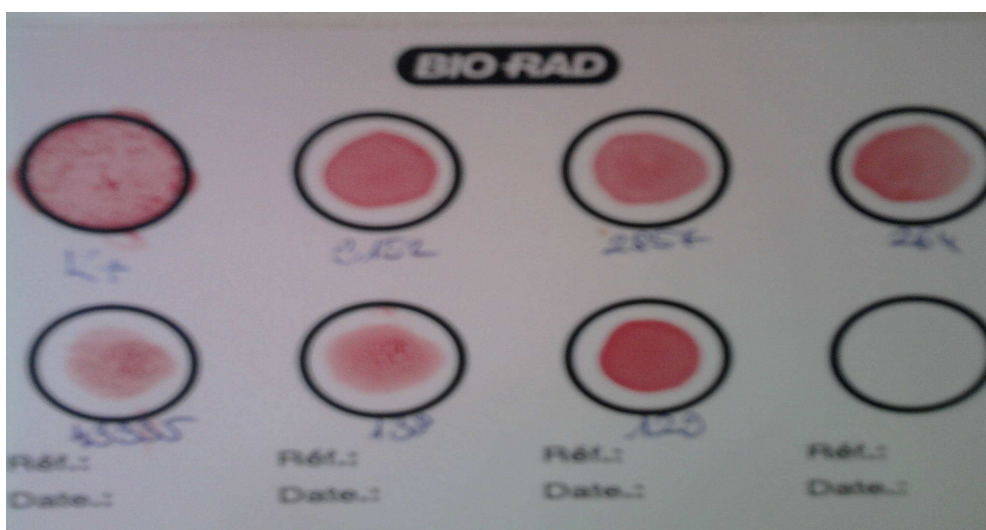
A vizsgálat során pozitívnak tekintettük azt a törzset, melynél üvegfelszínhez kitapadt baktériumtömeg volt megfigyelhető (**4. ábra**). Biofilm képzést nagy arányban mutattunk ki. A vizsgált törzsek 85%-a képez biofilmet (**5. ábra**). Nagyon érdekes jelenséget figyeltünk meg: bizonyos törzsek intenzívebben képeznek biofilmet az átlaghoz képest (**3. táblázat**).

Agglutináció:

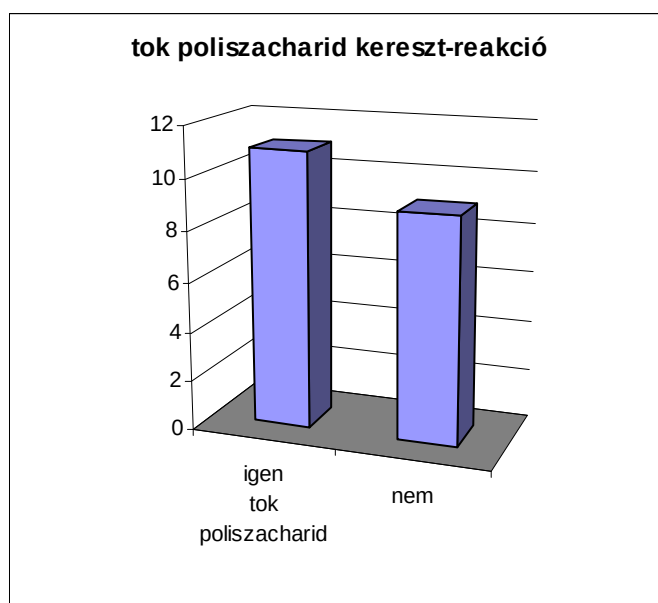
Tok poliszacharid kereszt-reakció kimutatása latex agglutinációval

+

-



7. ábra Tok poliszacharid kereszt-reakciók kimutatása



8. ábra Tok poliszacharid kereszt-reakció pozitivitás a törzsek között

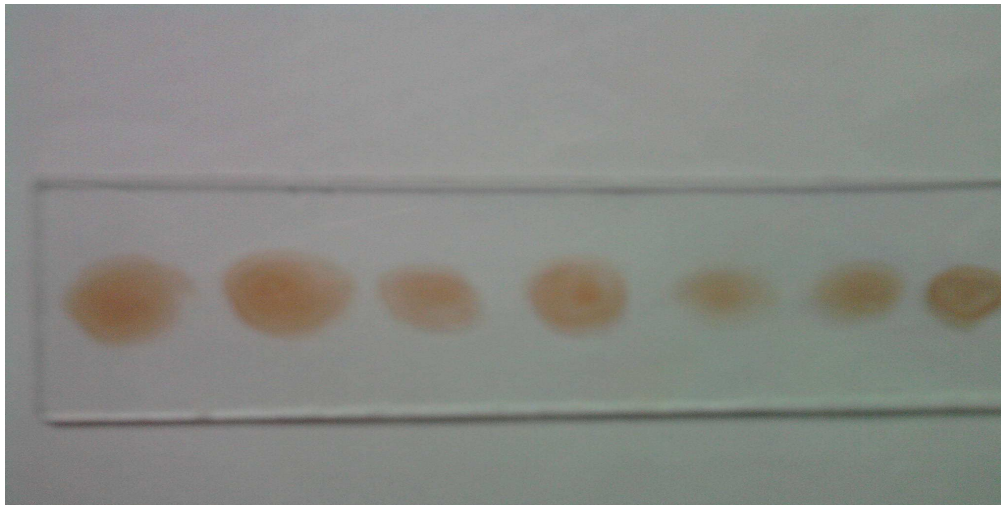
	Tok poliszacharid
1	-
2	-
3	-
4	+
5	+
6	+
7	-
8	-
9	-
10	+
11	+
12	+
13	+
14	-
15	+
16	+
17	-
18	-
19	+
20	+

4. táblázat Tok poliszacharid kereszt-reakció eredményei

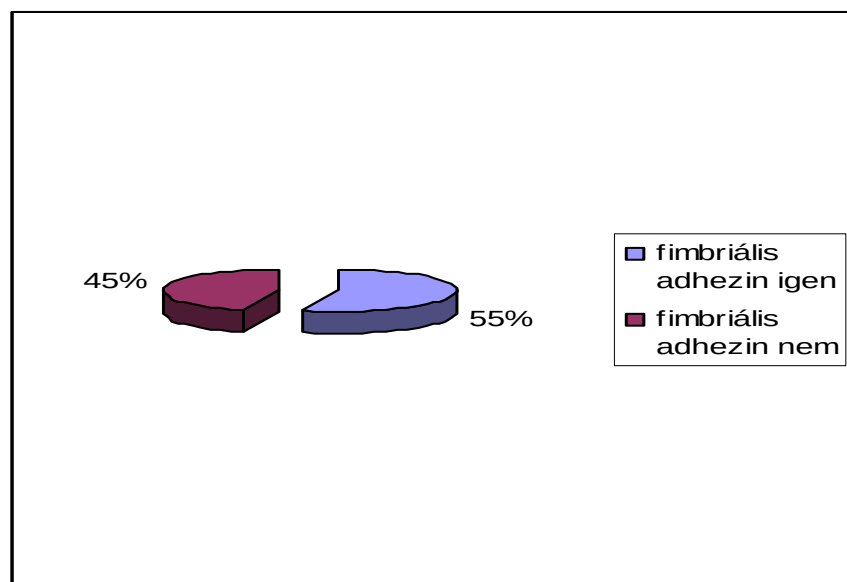
A tok poliszacharid kereszt-reakció kimutatásánál pozitív volt az a minta, amelynél megjelent a latex szemcsék agglutinációja (**7. ábra**). A kiértékelés szubjektív. Nagy mértékű pozitivitást tapasztaltunk (**8. ábra**, **4. táblázat**). Feltételezzük, hogy a pozitív eredményeket az *Escherichia coli* K1 tok poliszacharidjának és az *Acinetobacter baumannii* tok poliszacharidjának motivum azonossága adta.

Fimbriális adhezinek kimutatása hemagglutinációval

- +



9. ábra Fimbriális adhezinek kimutatása



10. ábra Fimbriális adhezinek előfordulása a vizsgált törzseknél

	Fimbriális adhezin
1	-
2	-
3	-
4	+
5	-
6	-
7	+
8	+
9	-
10	+
11	+
12	-
13	-
14	+
15	+
16	+
17	+
18	+
19	-
20	+

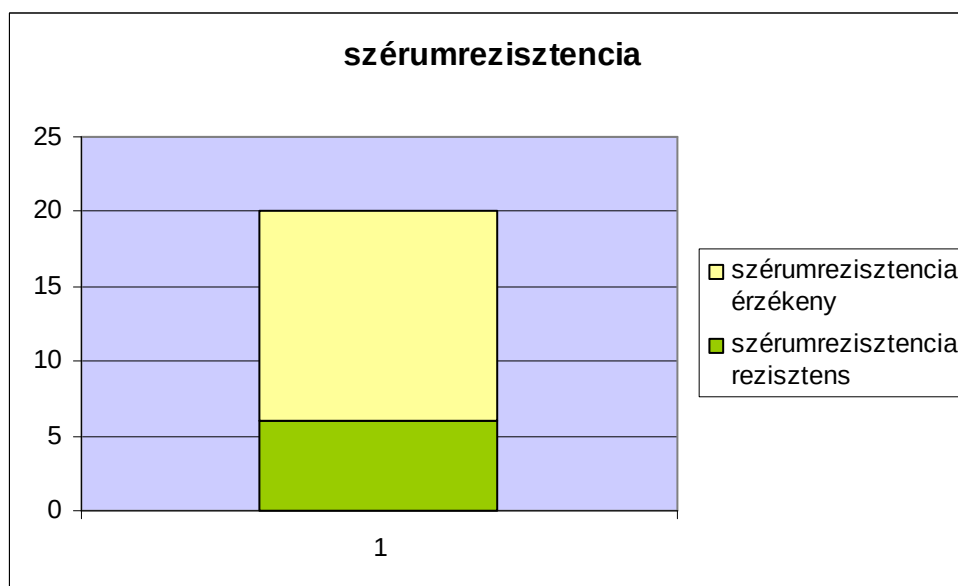
5. táblázat Fimbriális adhezinek kimutatásakor kapott eredmények

A törzsek jó részénél kimutatható fimbriális adhezin (**9. ábra**). Fimbriális adhezint a törzsek kevéssel több, mint felénél ki tudtunk mutatni (**10. ábra**). A kiértékelés szubjektív. Eredményeink a táblázatban láthatók (**5. táblázat**).

Szérumrezisztencia:



11. ábra Szérumrezisztencia vizsgálata



12. ábra Szérumrezisztencia megoszlása a vizsgált törzsek között

	Szérumrezisztencia
1	É
2	É
3	R
4	É
5	É
6	É
7	É
8	É
9	É
10	É
11	É
12	É
13	R
14	R
15	É
16	É
17	R
18	R
19	É
20	R

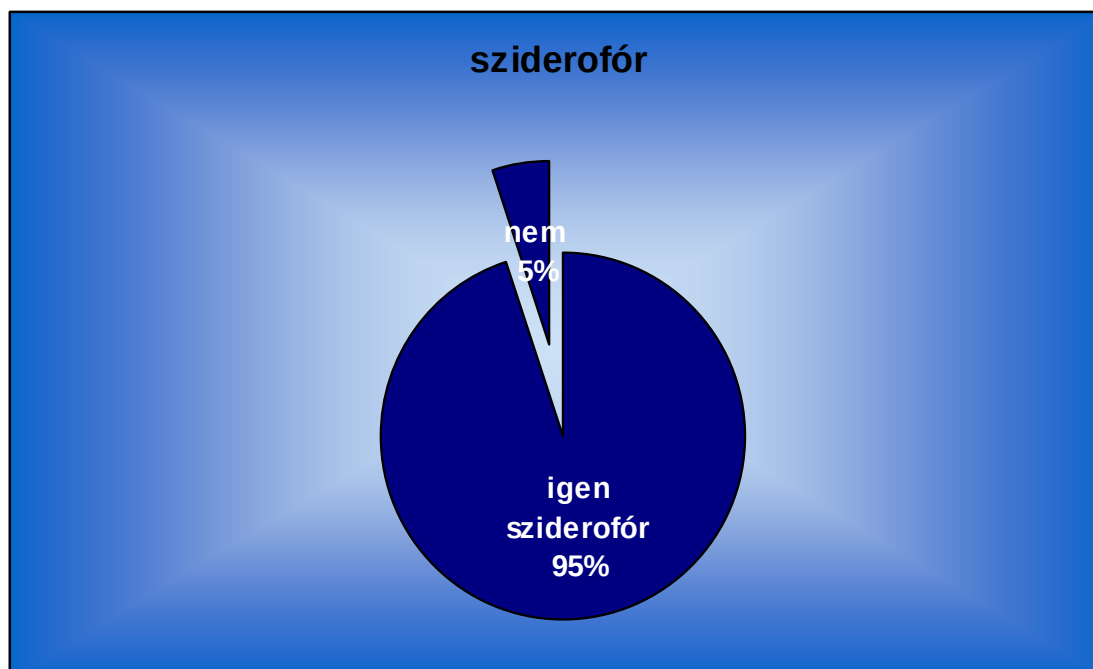
6. táblázat Szérumrezisztencia vizsgálat eredményei

Szérumrezisztencia vizsgálatánál azt tapasztaltuk, hogy kevés törzs volt rezisztens. A törzsek jelentős része érzékeny (**11., 12. ábra**). A kísérletet Braun-Vidotto 2004-es munkája alapján végeztük el. Táblázatban láthatók az eredményeink (**6. táblázat**).

Sziderofór kimutatása:



13. ábra Sziderofór kimutatása CAS táptalajon



14. ábra Sziderofór kibocsátás mértéke a vizsgált törzseknél

	Sziderofór
1	+
2	+
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	-
9	+
10	+
11	+
12	+
13	+
14	+
15	+
16	+
17	+
18	+
19	+
20	+

7. táblázat Sziderofór kimutatásánál kapott eredmények

Sziderofór jelenlétét narancssárga színreakció jelezte (**13. ábra**). Sziderofórok nagyarányú kibocsátását tapasztaltuk (**14. ábra**). Egy törzs kivételével az összes vizsgált törzs képes sziderofórt kibocsátani környezetébe. A kísérletet Schwyn-Neilands (1987) munkája alapján végeztük el. Táblázatunk az eredményeket tartalmazza (**7. táblázat**).

	Biofilm	Tok poliszacharid Kereszt-reakció	Fimbriális adhezin	Szérumrezisztencia	Sziderofór
1	+	-	-	É	+
2	+	-	-	É	+
3	-	-	-	R	+
4	+	+	+	É	+
5	+	+	-	É	+
6	+	+	-	É	+
7	+	-	+	É	+
8	-	-	+	É	-
9	-	-	-	É	+
10	+++	+	+	É	+
11	+++	+	+	É	+
12	+	+	-	É	+
13	+	+	-	R	+
14	+	-	+	R	+
15	+	+	+	É	+
16	+	+	+	É	+
17	+	-	+	R	+
18	+	-	+	R	+
19	+	+	-	É	+
20	+	+	+	R	+

8. táblázat Kísérletek eredményei összesítve

Összegezve a kísérleteink eredményeit (**8. táblázat**) és összevetve az irodalmi adatokkal elmondható, hogy a biofilmet képző törzseknél a biofilm képzés mértéke eltérő. Érdekes, hogy a nagy mértékű szérumrezisztenciát mutató törzsek nem vagy csak csekély mértékben képeztek biofilmet. Ez megegyezik az irodalmi adatokkal (King et al. 2009). A vizsgált törzsek ellen már csak néhány antibiotikum használható. Így a tobramycin, tigecyclin

és colistin antibiotikum tűnik a leghatásosabbnak, viszont az utóbbi szer nephrotoxikus és neurotoxikus (Kurcik - Trajkoska 2009, Towner 2006, Werndt et al. 1997). Fenn áll a veszélye, hogy bármikor ezekkel szemben is kialakulhat a rezisztencia. Ezáltal féltő, hogy minden antibiotikumnak ellenálló *Acinetobacter* törzsek jelennek meg, melyekkel szemben jó ideig nem lesz hatékony gyógyszer. A tobramycin hatékonyságát hivatalos adatok támasztják alá (<http://www.oek.hu/oek.web?to=1048&nid=505&pid=1&lang=hun>). Az általunk tapasztalt növekvő mértékű antibiotikumrezisztencia a világ számos pontján tapasztalható, különösen a cephalosporinokkal szemben (Pfeifer et al. 2010). Irodalmi adatok szerint a fő virulencia faktor a tok poliszacharid *Acinetobacter baumannii* esetében (Russo et al. 2010). Kísérletünkben csak az azonos motívumra épülő kereszt-reakció vizsgálatokra támaszkodva azt tapasztaltuk, hogy a reakció kisebb mértékben fordult elő így lehet, hogy nem ez a virulencia faktor mutatható ki legnagyobb mértékben. A pozitív eredmények hátterében az *Escherichia coli* K1 tok poliszacharidjának és az *Acinetobacter baumannii* tok poliszacharidjának az összetevői között lévő kis azonosság is állhat. Az azonosság megállapítására további vizsgálatokra lesz szükség. Fimbriális adhezinek sok törzsnél megtalálhatók. Tudjuk ezekről, hogy a biofilm kialakulását elősegíthetik (Gordon - Wareham 2010). Ez alapján az lenne várható, hogy a biofilmet képző törzseknél nagy arányban jelenjen meg, mégsem ezt tapasztaltuk. Nagyon kevés szérumrezisztens törzset sikerült kimutatnunk. Szérumrezisztencia vizsgálatánál eredményeink azt mutatják, hogy a törzsek többsége elpusztul a szérum antibakteriális hatása következtében. Általában a szérumrezisztens törzsek biofilmképzést mutattak. Mindezt megerősítik irodalmi adatok is (King et al. 2009). Sziderofór kibocsátása egy törzs kivételével minden törzsnél megfigyelhető volt. Genetikai vizsgálatunk alátámasztotta, hogy a legtöbb törzs egy klónból származtatható. Külön érdemes kiemelni, hogy voltak olyan vizsgált törzsek, amelyeknél egy virulencia faktor kivételével minden más virulencia faktor megfigyelhető volt. Megfigyelhető, hogy a két nagyon intenzíven biofilmet képző törzs ezek közé tartozik. Ez feltételezi azt, hogy ezek a törzsek különösen virulensek, gyakrabban okoznak fertőzéseket.

V. Összefoglalás

Világszerte egyre nő a kórházi fertőzések és járványok száma. A halálozási arány magas, elérheti az 54%-ot! Gram-negatív baktériumok által okozott kórházi fertőzések és járványok ma már elérik az összes kórházi fertőzés 70- 80%-át. Mégis a közeljövőben ezen baktériumok ellen kifejlesztett antibiotikum nem várható. Intenzív osztályok különösen érintettek. Ezeken az osztályokon az egyik leggyakrabban fertőzést okozó Gram-negatív baktérium az *Acinetobacter baumannii*. Ismert, hogy nagyon gyorsan antibiotikum rezisztenssé válik. Antibiotikumokkal szembeni rezisztenciája világszerte rohamos mértékben nő. Bár patogenezise komplex, kevés virulencia faktorát ismerjük és ezekről is csak kevés információnk van. Annyit biztosan tudunk, hogy a virulencia faktorok környezeti - fertőzés alkalmával gazdaszervezeti - tényezőktől függően fejeződnek ki.

Munkánk során a Pécsi Tudományegyetem klinikáihoz tartozó intenzív osztályokról származó multirezisztens *Acinetobacter baumannii* törzsek virulencia faktorainak a vizsgálata volt a célunk. Szerettünk volna egy átfogó képet kapni arról, hogy milyen mértékű az antibiotikum rezisztencia, mekkora mértékben fejeződnek ki a virulencia faktorok, melyek ezek illetve, hogy hány klónból származtathatók a törzseink. Ezáltal akartunk információt nyerni a pécsi intenzív osztályokon 2007-2011 közötti időszakban kialakult fertőzésekről.

Kimutattuk, hogy a törzsek közül szinte az összes képez biofilmet. Viszont a biofilm képzése eltérő mértékű. Mi az eltérő mértékű biofilm képzés hátterében eltérően kifejeződő géneket feltételezünk. A biofilmet képző törzsek valószínűsíthetően virulensebbek. Antibiotikumok közül a legtöbb törzs már csak néhány antibiotikumra: tobramycin, tigecyclin, colistin érzékeny nagymértékben. Elképzelhető, hogy a közeljövőben ezek a törzsek már ezekre az antibiotikumokra sem fognak reagálni. Félő, hogy minden antibiotikumnak ellenálló törzsek alakulnak majd ki! A nagymértékű antibiotikum rezisztenciát mutató törzsek biofilm képzése kis mértékű. Tok poliszacharid és fimbriális adhezin sok törzsnél jelen van, de nem akkora mértékben, hogy azt feltételezhetnénk, hogy ezek játszanak igazán nagy szerepet a szervezetben való tovaterjedésben. Tok poliszacharidoknál tapasztalt kereszt-reakció miatt további vizsgálatokra lesz szükség. Ezen kívül szükség lesz további kísérletekre a fimbriális adhezinek vizsgálatánál is, mivel a kiértékelés szubjektív. Szérumrezisztens törzs kevés volt kimutatható viszont

valószínűsíthető, hogy ezek virulensebbek, mert ezek a törzsek ellen tudnak állni a vérszérum antibakteriális hatásának. Sziderofórt egy törzs kivételével mind kibocsát a környezetébe. A törzsek többsége egy klónból származtatható. Egy klónból származtatott törzsek feltételezhetően vissza-vissza térő járványok okozói lehetnek.

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy *a biofilm képzése és a sziderofór termelése segíti legjobban a baktériumot a szervezetben való tovaterjedésben, valamint a nagymértékű antibiotikum rezisztencia kialakulása jelentősen könnyíti a nagy területen való elterjedését és a szervezetben való hosszútávú életben maradását a baktériumnak.*

Remélhetőleg eredményeinkkel segítjük a későbbiekben az *Acinetobacter baumannii* által okozott kórházi fertőzések visszaszorítását, megelőzését.

VI. Irodalom

Braun G., Vidotto C. (2004): Evaluation of Adherence, Hemagglutination, and Presence of Genes Codifying for Virulence Factors of *Acinetobacter baumannii* Causing Urinary Tract Infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99(8): 839-844.

Bergogne-Bérézin E., Towner K. J. (1996): *Acinetobacter* spp. As a Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. Clinical Microbiology Review. 9(2): 148-165.

Durante-Mangoni E., Zarrilli R. (2011): Global Spread of Drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Future Microbiology. 6(4): 407-422.

Eijkelkamp B. A. , Hassan K.A. , Paulsen I. T. , Brown M. H. (2011): Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. BMC Genomics. 12(126): 1-14.

Gergely L. (1999): Orvosi mikrobiológia. Semmelweis Kiadó Rt. Budapest.

Gordon N. C., Wareham D. W. (2010): Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanism of virulence and resistance. International Journal of Antimicrobial Agents. 35: 219-226.

Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. (2010): Antimicrobial resistance of bacterial biofilms. International Journal of Antimicrobial Agents. 35: 322-332.

Jurányi R. (szerk.) (1998): A fertőző betegségek általános és részletes járványtana. Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest.

King L. B., Swiatlo E., Swiatlo A., McDaniel L. (2009): Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 55: 414-421.

Kocsis B., Emődy L. (2003): A baktériumok patogénmintázata és a gazdaszervezeti felismerés. Magyar Immunológia. 2(4): 10-19.

Koeleman J. G. M., Stoof J., Van Der Bijl W. V., Vandenbrücke – Grauls C. M. J. E., Savelkoul P. H. M. (2001): Identification of Epidemic Strains of *Acinetobacter baumannii* by Integrase Gene. Journal of Clinical Microbiology. 39(1): 8-13.

Kurcik-Trajkovska B. (2009): *Acinetobacter spp.*-A Serious Enemy Threatening Hospitals Worldwide. Macedonian Journal of Medical Sciences. 2(29): 1-6.

Orosi P. Dr., Farkas A. Dr., Berkes I., Salné Nagy Gy., Szentkereszty Z. Dr., Mályi K. Dr., Dán A. Dr. (2007): Nosocomialis surveillance eredményei a Kenézy Gyula Kórház Intenzív Osztályán, két év adatai alapján. Orvosi Hetilap. 31: 1469-73.

Perez F., Hujer A. M., Hujer K. M., Decker B. K., Rather P. N., Bonomo R. A. (2007): Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 51(109): 3471-84.

Pfeifer Y., Cullik A., Witte W. (2010): Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. International Journal of Medical Microbiology. 300: 371-379.

Russo T. A., Luke N. R., Beanan J. M., Olson R., Sauberman S. L., MacDonald U., Schultz L. W., Umland T. C., Campagnari A. A. (2010): The K1 Capsular Polisaccharide of *Acinetobacter baumannii* Strain 307-0294 Is a Major Virulence Factor. Infection and Immunity. 78(9): 3993-4000.

Schwyn B., Neilands J. B. (1987): Universal chemical assay for detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry. 160: 47-56

Szalka A. (2000): Fertőző betegségek, infektológia Tegnap, ma, holnap. LAM. 10(6): 476-81.

Szalka A. (2008): Meg tudunk-e küzdeni a multi – és pánrezisztens baktériumokkal?. LAM. 18(10): 646-48.

Szalka A. (2011): Az infektológia változása az elmúlt két évtizedben. LAM. 21(6-7):417-23.

Towner K. (2006): The Genus *Acinetobacter*. Prokaryotes. 6: 746-58.

Wendt C., Dietze B., Dietz E., Rüden H. (1997): Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. Journal of Clinical Microbiology. 35(6): 1394-97.

http://www.ecogien.ie/DF_Biofilm.htm 2010. 02. 10.

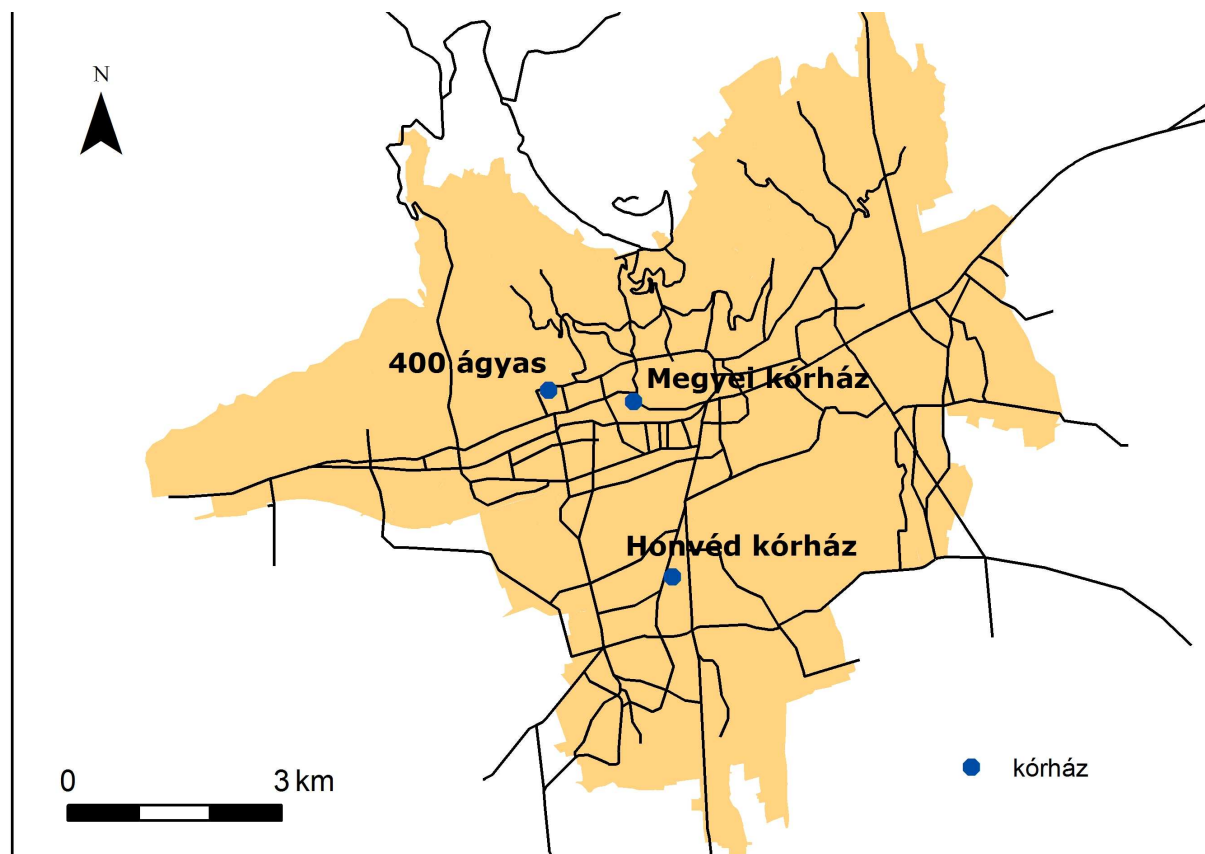
<http://www.oek.hu/oek.web?to=1048&nid=505&pid=1&lang=hun> 2012. 04. 23.

<http://phil.cdc.gov/phil/details.asp> 2012. 04. 29.

VII. Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm témavezetőmnek Dr. Kerényi Mónikának, hogy mindvégig támogatott, biztatott és segített. Nagyon szeretném megköszönni a hasznos tanácsokat, melyeket kaptam. Nagyon köszönöm belső konzulensemnek Dr. Jakab Ferencnek a segítségét és támogatását. Mindig hálás leszek Morschhauser Tamásnak és Ronczyk Leventének a térkép elkészítésében nyújtott segítségért. Végül szeretném megköszönni Sulc István Dávidnak, hogy mindig számíthattam rá és bármikor fordulhattam hozzá, ha segítségre volt szükségem.

VIII. Függelék



I. számú melléklet Vizsgálatunkban részt vett pécsi kórházak