

Záró beszámoló

OTKA nyilvántartási szám: T037475

Kutatási téma címe: **Antibiotikum rezisztencia alakulása klinikailag releváns aerob és anaerob baktériumok körében; a rezisztencia mechanizmus genetikai hátterének tanulmányozása molekuláris módszerekkel**

1. Bevezető információk, a kutatás célja, a munkatervben vállalt kutatási program ismertetése

A Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvos- és Gyógyszerésztudományi Centrum, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézetében a kar és a régió betegeinek klinikai mintáiból rutin mikrobiológiai tenyésztés és diagnosztika történik legfőbb feladatként, de mint egyetemi intézet a felmerülő, orvosi mikrobiológiai kérdésekben alap és alkalmazott kutatási feladatokat is végez. Az intézet bakteriológiai részlegének anaerob laboratóriuma a hazai Anaerob Kórokozók Referencia laboratóriumaként is funkcionál, így valamivel hangsúlyosabb az anaerob patogének vizsgálata, kapcsolatokat ápolunk a megfelelő nemzetközi anaerob referencia ill. anaerob témában kutató egyéb laboratóriumokkal, és a hazai laboratóriumokból kikerülő anaerob izolátumok további analízisre gyakran hozzánk kerülnek. Így a klinikai mikrobiológiai alap analízis, a kitenyésztett kórokozók jellemzése antibiotikum rezisztenciájuk és a megbetegítő képességük szempontjából ideális helyzetűnek tekinthető intézetünkben. Az egyszerű leíró, fenotípusos vizsgálatoknál azonban a mai tudományosság többet tesz lehetővé és kíván: a mechanizmusok hátterének genetikai, molekuláris biológiai vizsgálatát, amely az antibiotikum rezisztencia és virulencia mechanizmusok tanulmányozása esetén az élet- és kórtani tudományokban a modern infraindividuális biológia molekuláris jellegének megfelel, és a jelenségek összefüggő és alapvető megértését szolgálja. A célzott vizsgálataink hidat jelentettek a (mikro)biológia teszt- és típusorganizmusainak (pl. *Escherichia coli*) mélyreható analízise és a biológiai változatosság epidemiológiai analízise között.

A kórokozók antibiotikum rezisztencia tulajdonságai változatosak és időben és térben is változhatnak. Ez azt is jelenti, hogy a XXI. sz.-ban is az antibiotikumok nagy száma ellenére továbbra is antibiotikum rezisztencia problémákkal nézünk szembe. Ilyenek pl. a kiterjedt-spektrumú β -laktamázok (ESBL), az inhibítor rezisztens ESBL enzimek, a karbapenemázok és a Gram pozitív mikroorganizmusok glikopeptid rezisztenciái, amelyek jelen projektünk fő célterületei voltak mind a kiválasztott klinikailag igen fontos aerob és anaerob kórokozók esetén.

Intézetünk anaerob referencia laboratórium státuszának megfelelően jelentős kutatási eredményeket ért el az anaerob patogének vizsgálata területén, a jelen projektben részt vevők is eddigi munkásságának főbb eredményeit ezen területen érte el (PhD, nagydoktori fokozatok).

A *Bacteroides* fajok klinikai mintákból a leggyakrabban izolált „strict” anaerob kórokozók. Klinikailag a *B. fragilis* a legjelentősebb, az össz *Bacteroides* fertőzések 60-80 %-át adja, ezen felül típusorganizmusa az anaerob baktériumoknak és egy a törzsfajlás során korán elvált bakteriális törzsnek, a *Bacteroidetes* phylumnak (korábban *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* – CFB- phylum). A bacteroidesek rendelkeznek a legtöbb antibiotikum rezisztencia mechanizmussal az összes anaerob kórokozó között, szinte minden antibiotikum család ellen van leírt rezisztencia mechanizmusuk, és a rezisztencia szintek is itt a legmagasabbak. Meg kell említeni még, hogy a vastagbélflóra legabundánsabb tagjai is, mintegy 10^{11} *Bacteroides* sejt található 1 gramm székletben, és a gazdaszervezet számára kedvező ökológiai hatásuk is van. A bélflórában mint antibiotikum rezisztencia faktor reservoir szerepelhetnek sokszor antibiotikum rezisztenciát kódoló speciális, transzferábilis genetikai elemek (kis és nagy plazmidok, mobilizálható és konjugatív transzpozonok) hordozásával. A széles hatásspektrumú karbapenemek és antianaerob nitroimidazolok fontos terápiás lehetőséget jelentenek a bacteroidesek okozta életet veszélyeztető infekciók ellen, de rezisztens *Bacteroides* törzsek jelentek meg ellenük szinte világszerte, és a rezisztencia szint emelkedni látszik. E két rezisztencia mechanizmus főként inaktiváló enzimek termelésén alapul, amelyek fenotípusos expressziójához inszerciós szekvencia (IS) elemek a rezisztencia gének (*cfiA* karbapenemek, *nim* nitroimidazolok) upstream régiójába való megfelelő orientációjú integrációja szükséges. Ezen integráció szerepe, hogy feltett, vagy igazolt *Bacteroides* specifikus promótereket szolgáltatassanak a rezisztencia géneknek. A *cfiA* gének kromoszómális lokalizációjúak, *B. fragilis* specifikusak, és transzferüket eddig nem tudták kimutatni. Valamint jellemző, hogy a *cfiA* pozitív *B. fragilis* törzsek egy genetikai altípusát jelentik a fajuknak. Ez molekuláris tipizálási módszerekkel és a törzsek kromoszómális DNS-ének hibridizációs fokának vizsgálatával derült ki. Valamint megfigyelték a β -laktamáz gének (*cepA* normál cefalosporináz és a *cfiA*) és az enterotoxin gén, *bft*, differenciális megoszlását is a két altípusban. A *nim* génekből A-G altípusokat ismerünk, amelyek ca. 75% homológiát mutatnak egymás között. Az eddig legjobban jellemzett A-D gének közül a B kromoszómáisan, az A, C, D plazmidon elhelyezkedőnek bizonyult, és mind a négy génnek a mobilitása bizonyított.

Jelen projektünk előzményeként vizsgáltuk az imipenem rezisztencia és a fontos *cfiA* rezisztencia gén prevalenciáját hazai *Bacteroides* izolátumokon, izoláltuk és jellemeztük az első hazai imipenem és metronidazol rezisztens *Bacteroides* törzseket.

A bacteroidesek egy másik fontos rezisztenciamechanizmusa a cephamycineket, cefoxitin, cefotetan, is bontó A osztályú, klavulánsavval gátolható CfxA cefalosporináz termelése. A rezisztencia gén, *cfxA*, elhelyezkedése a kromoszómába specifikus helyen inszertálódó MTn4555 mobilizálható transzpozon. Az MTn4555 szekvenciája és transzfer mechanizmusa jól leírt, viszont epidemiológiája már kevésbé.

Az anaerob bacteroideseken kívül aerob pathogének fontos rezisztencia mechanizmusai is a vállalt kutatási célok közt szerepeltek. Ezek az Enterobacteriaceae fajok fontos β -laktamáz termelésének és egyes fontos Gram pozitív pathogének β -laktám és glikopeptid rezisztenciájának vizsgálatát jelentette, amelyek kutatása szintén az intézetünk hagyományai között szerepel.

A bacteroides fajok karbapenem és metronidazol rezisztencia mechanizmusainak és a hordozó genetikai elemeknek a vizsgálatokor az IS elemek szerepével együtt felmerült más mobilis elemek tanulmányozásának igénye is, így a speciális cefoxitin rezisztenciát kódoló, MTn4555 mobilizálható transzpozon és *cfxA* rezisztencia gén analízise is vizsgálatra került.

2. Eredményeink

2.1. A klinikailag jelentős anaerob *Bacteroides* fajok fontos antibiotikum rezisztencia mechanizmusainak epidemiológiai vizsgálata és a hordozó genetikai elemek analízise

2.1.1. A hazai első imipenem és metronidazol rezisztens *Bacteroides* izolátumok leírása után külföldi laboratóriumokkal (USA, Kuwait, UK, Svédország) való együttműködésben újabb karbapenem rezisztens törzsek analízisét kezdtük meg. Elsőként az USA-ból, néhány Kuwaitból és újabb Magyarországról származó izolátumok vizsgálatát végeztük el, és közzöltük az eredményeket. Röviden 15 ilyen törzs esetén detektáltuk az imipenem rezisztencia fokát (minimális gátló koncentráció, MIC), a karbapenemáz produkciót, a *cfiA* géneket és az aktiváló IS elemeket ill. hiányukat. Ahol a *cfiA* gén upstream régiójában IS inszerció volt magas imipenem rezisztenciát és imipenemáz termelést tapasztaltunk. Ezeknél a törzseknél az IS elemek kimutatásánál már leírt (IS1186, IS4351, IS1187, IS1169, IS613) és új IS elemek (IS943 és hibrid típusok, IS614B és IS614C ld. később is) előfordulását tapasztaltuk. Az

IS943 teljes nukleotid szekvenciáját megállapítottuk (GenBank Acc. no. AF519175), a kódolt transzpozáz enzim aminosavszekvenciája alapján az IS4 IS elem családba volt sorolható, és hozzá a legnagyobb homológiát mutató protein a *B. vulgatus* eredetű MTn4555 Orf9/TpI volt, jelezve, hogy a TpI szintén egy IS elem transzpozáza (ld. később is). A hazai és kuwaiti törzsek *cfiA* pozitívak voltak, az upstream régióban nem hordoztak IS elemet, de emelkedett imipenemáz produkciót és emelkedett imipenem MIC értékeket (2-8 mg/l), vagy rezisztens kategóriába (≥ 16 mg/l) tartozó rezisztencia szinteket tapasztaltunk. Ezen törzsek esetén a *cfiA* gén IS elem független aktivációját feltételeztük a *cfiA* gén egy alacsony aktivitású saját promóterén keresztül.

Közlemény: Sóki és mtsai. Molecular characterization of imipenem-resistant, *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates from the USA, Hungary and Kuwait. *J Med Microbiol* 2004; 53: 413-419.

IF: 2,484

Az IS elemektől független *cfiA* „aktiváció” témájában igazolni próbáltuk az expresszió fokozódását a feltételezett alap *cfiA* promóter segítségével. A CfiA mRNS-detektáltuk kvantitatív Real Time RT-PCR segítségével LightCycler berendezést és Roche RT-PCR SybrGreen I kitet használva. Folyamatban van a transzkripció-iniciációs hely (TIS) meghatározása 5'RACE analízis segítségével. E vizsgálatokat egyéb kiegészítő vizsgálatok elvégzése mellett szintén folytatásra és közlésre érdemesnek találjuk.

2.1.2. Egyesült Királyságbeli együttműködés révén a normál flóra bacteroideseiben is kerestük az imipenem rezisztens *Bacteroides* törzseket és a háttérben lévő rezisztencia mechanizmust, amely vizsgálatok felvilágosítást adtak a potenciális rezisztencia veszélyre és esetlegesen a fertőzési folyamat egyes aspektusaira. A bevont két helyszín (Nottingham, UK és Szeged, Magyarország) nagyjából egyező eredményeket adott: IS elem aktiválta magasfokú rezisztenciával rendelkező törzset nem találtunk, de valószínűleg IS elemtől függetlenül aktivált *cfiA* pozitív *B. fragilis* törzseket igen nagyjából azonos prevalenciával. Találtunk még egy imipenem rezisztens *B. distasonis* törzset, amely az irodalomban részlegesen jellemzett, karbapenem rezisztenciát mutató *B. distasonis* törzsek által termelt egyéb karbapenemázok típusához tartozhat, és egyéb nem azonosított rezisztencia mechanizmussal rendelkező, az imipenem rezisztenciát nem erősen kifejező törzseket is. Leírtuk az IS független *cfiA* aktiváció heterogén megjelenési típusát az ún. preformált gradiens rezisztencia detekció, ismertebb nevén E-teszt, esetén.

Közlemény: Sóki és mtsai. Screening of isolates from faeces for carbapenem-resistant

Bacteroides strains; existence of strains with novel types of resistance mechanisms. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24: 450-454.

IF: 2,064

2.1.3. Megkezdttük a *B. fragilis* törzsgyűjteményünk molekuláris tipizálási és génmegoszlási vizsgálatát a korábbi eredmények alátámasztása ill. finomítása céljából. A bevezetőben említést nyert, hogy a *B. fragilis* populáció két fő, jól elkülönülő csoportra osztható: Homológia I. osztály, törzsei a *cepA* és *bft* géneket hordozzák, és a Homológia II. osztály, a törzsei a *cfiA* géneket hordozzák.

Összesen 275 Magyarországon izolált *B. fragilis* törzs került vizsgálatra, 24 hordozta a *bft-1*, vagy *bft-2* gént és 14 a *cfiA* gént, együttes hordozást a korábbiaknak megfelelően nem tapasztaltunk. Az enterotoxin gén, *bft*, típusának (néhány aminosavas eltérés az 1-3 altípusok között) megállapítására PCR-RFLP módszert dolgoztunk ki és alkalmaztunk (a *bft* gének 1142 bp-os, a gének kódoló szakaszát átfogó szegmentjét amplifikálva és azt *MboI* restrikciós enzimmel emésztve *bft-1,2* és *3* specifikus mintázatot kaptunk gélelektroforézisben). 14 *bft-1* és 7 *bft-2* allél előfordulását tapasztaltuk. Vizsgáltuk különböző klinikai mintákban az *bft* allélok előfordulását a célból, hogy következtetéseket vonjunk le a fertőző képességre és a megbetegedési folyamatokra.

Közlemény: Terhes G., Sóki J., Urbán E., Nagy E. *Bft-1* is the most prevalent isoform among enterotoxinogenic *Bacteroides fragilis* strains from Hungary. *Az Anaerob folyóiratba közlésre elküldve.*

Terhes G. Investigation of some clinically important toxin-producing anaerobic bacteria and their epidemiology. PhD Thesis

A tárgyalt vizsgálat során *cfiA* pozitív *B. fragilis* prevalenciája 5,1 % volt, ami jól egyezik az általunk korábban tapasztaltakkal (5,6 %). A pozitív törzsek IS elem analízise azt mutatta, hogy hordoznak IS elemeket (IS614B, IS4351, IS1186), de nem a *cfiA* gén upstream régiójában. Ennek ellenére volt olyan törzs, amely emelkedett imipenem MIC értéket mutatott, és E-teszttel vizsgálva heterogén rezisztencia profilja volt. Vizsgáltuk a kimutatott, vagy estelegesen a genomokban meglévő más IS elemek a *cfiA* upstream régiójába való transzpozícióját, a tesztörzseket 10^9 sejt/ml denzitású kultúráinak aliquotjait 16mg/ml imipenemet tartalmazó lemezekre oltva (Podglajen et al. 1992, FEMS Lett. 91: 21-30). Kísérleteinkben az IS elemek a *cfiA* gén elé való ugrása variabilitást mutatott: volt olyan, hogy adott törzs esetén nem kaptunk rezisztens telepeket egy adott kísérletben, míg máskor kaptunk ugyan, de nagyon kis frekvenciával (néhányszor 10^{-8} /sejt). Ez megegyezik az irodalmi értékekkel, de az, amikor nem kaptunk rezisztens telepeket, a transzpozíció

szabályozásának ismeretlen oldalát is felveti. Az alacsony mobilitásból arra is következtettünk, hogy a *de novo* rezisztencia kialakulás valószínűleg *in vivo* is ritka, nem fenyegető veszély, hanem a rezisztens törzsek terjedése jelent nagyobb fenyegetést. Utóbbit igazolni látszik, hogy bizonyos imipenem rezisztens törzsek, *cfiA*, *nimB*, IS1186 és IS4351 genetikai konstitúciójúak, és molekuláris tipizálási módszerekkel közeli rokonságot mutatnak. A fenti eredményeket poszterek formájában előzetesen közöltük, és *in extenso* **közlemény előkészületben**.

2.1.4. A *bft* és *cfiA* együttes vizsgálatok eredményeként egy olyan *B. fragilis* törzs került analízisre, amely a *bft-1* és *cfiA* géneket is hordozta. A törzset, *B. fragilis* R19881, az Egyesült Királyságban izolálták, kapcsolataink révén került hozzánk. Jellemzésekor a fentiekén kiderült még, hogy metronidazol rezisztens, de *nim* gén független, laktát-dehidrogenáz aktivitás mérések alapján a sejt redukciós rendszerének átalakulásával kialakuló rezisztencia mechanizmusú. A *B. fragilis* törzsek molekuláris tipizálásával kapcsolatban bevezettük az RAPD-PCR típusú ERIC (Enterobacterial-repetitive-intergenic-consensus) szekvenciák előfordulásán alapuló az AP-PCR típusú M13 primerekkel végzett PCR tipizálási módszereket, melyeket elvégezve a *bft* és *cfiA* géneket hordozó törzsek elkülönültek. A fent említett törzs molekuláris tipizálási módszerekkel a *cfiA* pozitív törzsekre jellemző mintázatot adott, így valószínűsítjük, hogy a *bft-1* gén egy *cfiA* pozitív törzsbe jutásáról van szó, amely virulenciafokozódás mellett antibiotikum rezisztencia fokozódás is végbe ment az adott törzsben. Ilyen *bft* és *cfiA* gént együttesen hordozó törzs léte az eddigi nézetek alapján kuriózum, a fenti témában egy **rövid közlemény közlésre elküldve**.

2.1.5. Megkíséreltük a *cfiA* gén transzformációval való átvitelét érzékeny gazdatörzsbe történő transzformációval a *cfiA* gént meghatározó genetikai elem méretének, és valószínű típusának (mobilizálható vs. konjugatív transzpozon) meghatározására. Elektrokompétens *Escherichia coli* és *B. fragilis* 638R sejteket preparáltunk (Smith és mtsai. Plasmid 1990; 24: 100-109), mind ampicillin rezisztens *E. coli*, mind metronidazol rezisztens *B. fragilis* transzformánsokat kaptunk 10^7 telep/ μg DNS hatékonysággal. De *cfiA* pozitív *B. fragilis* törzsek (n=17) kromoszómális DNS-ét használva imipenem rezisztens *B. fragilis* transzformánsokat nem kaptunk. A negatív eredményt okozhatta, hogy a nagy molekulatömegű kromoszómális DNS transzformációs hatékonysága alacsony volt, restriktív-modifikációs kizárás volt a gazdatörzsben, vagy a *cfiA* elem nem volt képes integrálódni.

2.1.6. További karbapenem rezisztens törzsekkel rendelkezünk az Egyesült Királyságból (n=7, 1998-2001 időszak) és Svédországból (n=8, 1990-2004 időszak) is, és a J Med Microbiol 2004; 53: 413-419 említett közleményhez hasonlóan vizsgáltuk a rezisztencia mechanizmusokat. Mind a 15 törzs, magas fokú karbapenem rezisztenciával rendelkezett, *cfiA* gént hordozott, és minden esetben IS elem (IS1186 4 törzs, IS942 2 törzs, IS1187 1 törzs, IS614B 7 törzs, és IS614C 1 törzs) volt kimutatható a *cfiA* gén upstream régiójában. Az IS elemek aktiváló szerepe mellett megfigyeltük, hogy a gyakori IS1186 és IS614B időben eltérően jelentkezett: IS1186 1990-es évek első fele, IS614B 1990-es évek második felétől. Az IS614B és IS614C elemek részletesebb jellemzését is elvégeztük, meghatároztuk a teljes nukleotid szekvenciájukat. Már az előbb említett Sóki és mtsai. J Med Microbiol 53:413 közleményünkben feltételeztük, hogy ezek az IS elemek hibridjei a Japánban korábban leírt IS614 és IS612, valamint az európai országokban és az USA-ban megtalált IS942 elemeknek. A teljes szekvenenciaanalízis és ClustalW multiple alignment ezt a feltételezést megerősítette. Ezen két hibrid IS elem további jellemzése (promóterszekvenciák meghatározása folyamatban 5'RACE analízissel Dr. I. Podglajennel együttműködésben, kópiaszámok és transzpozíciós képesség meghatározása) után a jelentőségüknek megfelelően **a közlemény előkészületben.**

2.1.7. A *cfiA* gének expresszójának IS elemeken keresztüli szabályozása mellett a hasonló expressziós mechanizmussal rendelkező *nim* géneket és az őket hordozó genetikai elemeket is vizsgáltuk az aktiváló IS elem típusa, a plazmidon ill. kromoszómán való elhelyezkedés és utóbbi jelleg a *cfiA* gén pozitivitással való összefüggése szempontjából. Öt, A-E, *nim* gén típust hordozó *Bacteroides* törzset (n=26) analizáltunk. A *nimA-E* gének és az aktiváló IS elemek génspecifikus asszociációját (*nimA* IS1168, *nimB* IS1168 és IS612, *nimC* IS1170 és *nimE* IS*Bf6*) tapasztaltuk amellet, hogy az IS inszerciós helyek is *nim* gén specifikusak voltak. Ez utóbbi két jelleg azt, valószínűsíti, hogy az IS inszercióval történő változás ritkább mint a horizontális terjedés. A *nimA-D* gének estén kromoszómális és a már leírt plazmidoktól eltérő plazmidokon való elhelyezkedést is tapasztaltunk. A kromoszómális *nim* gének pozitív asszociációt mutattak a *cfiA*-pozitivitással, feltevéseink szerint azt is jelentheti, hogy a *nim* és *cfiA* gének közös elemek lokalizálódnak ezen törzsekben.

Az újabban leírt *nimE* gének esetén konjugációs transzferrel és Southern hibridizációval meghatároztuk a hordozó elemet, egy ca. 8.3 kb-os plazmidot (pBF388c), ezen a plazmidon való lokalizációt, 1.5 kb-os *EcoRV* fragment, és ez utóbbi alapján klónoztuk a *nimE* fragmentet. A pBF388c *nimE* fragmentje nukleotid szekvenciájának (GenBank Acc. no.

AM042593) meghatározásával a megfelelő strukturális elemek (invertált ismétlődések a végeken, hipotetikus transzpozáz kódolása) megléte révén egy új IS elemet, *ISBf6* is azonosítottunk. Ezt az elemet megtaláltuk más hasonló, 8.3 kb-os, *nimE* gént hordozó plazmidon a *nimE* géntől upstream PCR-mapping segítségével, ami újfent a horizontális terjedés fontosságát emeli ki.

Közlemény: Sóki és mtsai. Molecular investigation of genetic elements contributing to metronidazol resistance in *Bacteroides* strains. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:212-220.

IF: 3,611

2.1.8. Az *IS943* transzpozáz és a *MTn4555 orf-9* közti homológia és az *MTn4555* a *B. vulgatus* CLA341-es formájának jól karakterizált volta, de megfelelő survey-ek hiánya, terelte a figyelmünket a bacteroidesek cefoxitin rezisztenciája felé. Detektálni kívántuk a cefoxitin rezisztencia szintjét a *Bacteroides* törzsgyűjteményünk random kiválasztott tagjain (n=86), *cfxA* gént, az *orf-9*-et hordozó IS elemet, amelyet „házilag” *IS944*-nek jeöltünk, a *cfxA* gén szabályzó régiójának változatait az *IS944*-gyel együtt, az *MTn4555* esetleges egyéb változatait és mobilitását.

86 *Bacteroides* izolátumból 18 *cfxA* és 2 *orf-9* pozitív törzset találtunk, az *orf-9/IS944* pozitív törzsek 2 *cfxA* gént hordozó *B. fragilis* vonalban helyezkedtek el, mindkét elem a *cfxA* gén szabályzó régiójában. Primereket terveztünk a *cfxA* gén teljes upstream régiójának amplifikációjára, és segítségével ca. 2 ill. 2,5 kb-os termékeket kaptunk az *IS944* pozitív törzsekben, 1 törzsben 2,2 kb-os terméket, amelyben az *IS614* elem valamely nem azonosított formája volt kimutatható, 13 törzsben 1 kb-os terméket, 1-1 törzsben pedig 0,5 kb-os terméket ill. nem volt amplifikáció. Valószínűleg az 1 kb-os fragment reprezentálja a *cfxA* pozitív törzsek túlnyomó részében az alap formáját az *MTn4555*-nek. Az 1 kb-os fragment nukleotid szekvenálással kapott szekvenciáját összehasonlítva a *B. vulgatus* CLA341 megfelelő régiójának nukleotid szekvenciájával azt kaptuk, hogy abból az *IS944* teljes része és egy 360 bp-os másik rész hiányzik. Az *IS944* inszerciója olyan, hogy hibrid promotert alkot a *cfxA* saját *Bacteroides* specifikus promotere és az *IS944* terminális megfelelő motívuma. Az *IS944*-et hordozó törzsek cefoxitin rezisztencia szintjei magasabbak voltak a csak alap szabályzó régiót hordozó törzsekéinél. A 360 bp-os szegment nagyon érdekes abból a szempontból, hogy egy „mini” IS elem lehet, mivel célszekvencia duplikációt és „inverted repeat”-eket talátunk jelentősebb CDS nélkül. Ez az elem, amelyet *ISSBf1*-nek jelölünk (insertion sequence satellite), és valószínűsített mobilitását egy a sejtekben rezidens IS elem transzpozáza aktivitásának köszönheti.

Az MTn4555 egyéb változatainak PCR térképezése lefedő PCR fragmentek amplifikálásán keresztül folyamatban van, és összefüggésbe tudjuk hozni a talált alacsony konjugációs mobilitásukkal (ca. 10^{-8} / donor sejt).

(Fenti eredmények poszter formában való megjelentetésre elfogadottak, valamint eredményeink *in extenso* **közlése is előkészületben.**)

2.2 Jelentős aerob pathogének β -laktám és glikopeptid rezisztenciájának felmérése és azok molekuláris analízise

2.2.1. Inhibitor rezisztens TEM (IRT) β -laktamáz termelő *E. coli* törzsek prevalenciájának felmérése és molekuláris vizsgálatuk.

2001-2002 során intézetünkben izolált *E. coli* izolátumok korong diffúzióval ampicillin/klavulánsav kombinációra rezisztens törzsei (n=36) kerültek további analízisre. E-teszt módszerrel detektáltuk a amoxicillin, amoxicillin/klavulánsav és ceftazidim, ceftazidim/clavulánsav MIC értékeket, a törzsek jó része amoxicillin és amoxicillin clavulánsav rezisztens volt, de mivel a ceftazidim MIC értékcsökkenés a ceftazidim és ceftazidim/klavulánsav relációban minden esetben igen jelentős volt a törzset nem minősítettük inhibitor rezisztens β -laktamáz termelőnek. Megtörtént a TEM és SHV gének PCR módszerrel való kimutatása, és enzimaktivitás mérés nitrocefirin szubsztráttal gátlószer nélkül és az jelenlétében. De jelentős gátlást nem tapasztaltunk, így a törzseinket csak alap ESBL termelőnek tudtuk minősíteni.

2.2.2. Nozocomiális járványból izolált ESBL termelő *Klebsiella pneumoniae* törzsek analízise. 2003 során ESBL termelő *K. pneumoniae* törzsek halmozódását tapasztaltuk az SZTE, ÁOK, Gyermekgyógyászati Klinika Intenzív Osztályán. Molekuláris tipizálási módszerekkel, ERIC és M13 PCR vizsgáltuk a „járványból” származó és környezeti törzsek genetikai rokonságát, amely a „járványos” törzsek között magas fokú volt, amelyet plazmid profil analízissel is meg tudtunk erősíteni (5,3, 24 és 60 kb-os plazmidok a „járványos” törzsekben). Sajnos további vizsgálatok elvégzésére nem volt kapacitásunk.

2.2.3. Vancomycin rezisztencia szűrése kórházi bennfekvő betegek székletéből *Enterococcus* törzsek tenyésztésével.

A munkatervben a Staphylococcusok glicopeptid rezisztencia-helyzetének felmérése ellátási körzetünkben szerepelt a meghatározott témák között. Vancomycin rezisztens, vagy mérsékelten rezisztens Staphylococcus törzset nem izoláltak munkatársaink, de egy felmérést végeztünk a fontosabb kérdésnek számító glikopeptid rezisztens *Enterococcus* törzsek izolálására.

2002 és 2004 folyamán az SZTE, II. Belgyógyászati Klinika Haematológiai Osztályáról 76 ill. 210 beteg székletmintáit vizsgáltuk vancomycin-cefuroxim szelektív véres agaron. A kinövő telepeket tovább vizsgáltuk vancomycin és teicoplanin agar diffúziós és E-teszt módszerrel. A vizsgálatban a rezisztens törzsek alacsony előfordulása volt tapasztalható, 1 rezisztens törzset izoláltunk, amely VanA fenotípusú volt és a *vanA* gént hordozta. Egybevetve a korlátozott glikopeptid felhasználást az adott osztályon és Magyarországon az alacsony rezisztencia szint jól magyarázható. Ezen eredmények Short communication, vagy Letter formájában való **közlése előkészületben.**

2.2.4. Karbapenem rezisztens *Pseudomonas aeruginosa* törzsek izolálása laboratóriumunk mintaanyagából. (Nem szerepelt a munkaterv pontosan meghatározott tételei között, de a jelentős aerob kórokozók fontos antibiotikum rezisztenciái között szerepel.)

2004 és 2005 folyamán laboratóriumunkban pánrezisztens *P. aeruginosa* törzsek kerültek izolálásra, amelyek a karbapenem antibiotikumokra - imipenem, meropenem -, is rezisztenciát mutattak. Felmerült, hogy a *P. aeruginosa* jelentős, metallo- β -laktamáz (MBL) termelésen alapuló rezisztenciamechanizmusáról lehet itt is szó. Az elvégzett MBL tesztek, MBL E-teszt, és EDTA gátlás korong diffúzióban, VIM gén PCR más rezisztencia mechanizmust valószínűsít.

(A zárójelentés terjedelmére a még nem közölt eredmények tárgyalása miatt a magasabb korlátot, 25 oldal, vettük irányadónak.)