Légúti infekciót okozó baktériumok terápiás hatékonyságot befolyásoló rezisztenciáinak és rezisztencia mechanizmusainak vizsgálata

Dr. Hajdú Edit

Doktori (PhD) értekezés

Témavezetők: Dr. Nagy Erzsébet

Dr. Vágvölgyi Csaba

Szegedi Tudományegyetem Biológia Doktori Iskola

Vezető: Prof. Dr. Maróy Péter

Szegedi Tudományegyetem

Szent-Györgyi Albert Orvos és Gyógyszerésztudományi Centrum

Általános Orvostudományi Kar

Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet

Szeged, 2007

Tartalomjegyzék

	Oldal
Tartalomjegyzék	2.
Rövidítések	4.
Bevezetés	6.
1. Légúti infekciók	6.
2. A leggyakoribb, terápiás nehézséget jelentő légúti kórokozó baktériumok	8.
2.1. *Streptococcus pneumoniae*	8.
2.2. *Pseudomonas aeruginosa*	12.
2.3. A leggyakoribb, nozokómiális pneumóniát okozó *Enterobacteriaceae* családba tartozó Gram-negatív baktériumok	14.
Célkitűzések	17.
Anyagok és módszerek	19.
1. Baktérium törzsek	19.
2. Mintavételi módszerek	20.
3. Baktériumok azonosítása	21.
4. A *Streptococcus pneumoniae* törzsek tipizálása	21.
5. Antibiotikumokkal szembeni rezisztencia meghatározása	22.
6. Antibiotikum rezisztencia mechanizmusok vizsgálata	23.
7. Szinergizmus vizsgálatok	25.
8. Biofilm termelés vizsgálat	27.
9. Direkt E-teszt vizsgálat cysticus fibrosisos betegek köpetmintáinak primer tenyészetén	28.
10. Antibiotikum fogyás meghatározása	29.
11. Az adatok statisztikai elemzése	29.
Eredmények	30.
1. *Streptococcus pneumoniae* törzsek vizsgálata során kapott eredményeink	30.

2. A cysticus fibrosisos betegek mintáiból izolált *Pseudomonas aeruginosa* törzsek vizsgálata során kapott eredményeink 44.
3. Alsó légúti mintából izolált ESBL termelő, *Enterobacteriaceae* családba tartozó Gram-negatív baktériumok előfordulása beteganyagunkban 49.
4. Az antibiotikum szinergizmus vizsgálataink eredményei Gram-negatív, légúti mintákból izolált törzsek eseteiben 52.
5. A Gram-negatív bélbaktériumok béta-laktám típusú rezisztencia mechanizmusainak vizsgálatával kapott eredményeink 58.

Megbeszélés 62.

1. *Streptococcus pneumoniae* törzsek vizsgálata 62.

2. A cysticus fibrosisos betegek mintáiból izolált *Pseudomonas aeruginosa* törzsek vizsgálata 69.

3. Alsó légúti mintákból izolált ESBL termelő Gram-negatív baktériumok előfordulása beteganyagunkban 71.
4. Az antibiotikum szinergizmus vizsgálataink Gram-negatív, légúti mintákból izolált törzsek eseteiben 72.
5. A Gram-negatív baktériumok béta-laktamáz típusú rezisztencia mechanizmusainak vizsgálata 74.

Összefoglalás 77.

Summary (angol nyelvű összefoglalás) 81.

Irodalmi hivatkozások 84.

Köszönetnyilvánítás 94.

Függelék

1. Az értekezéshez felhasznált közlemények jegyzéke
2. Szent-Györgyi Albert Orvos- és Gyógyszerésztudományi Centrum Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásetikai Bizottság engedélye
3. Szülői nyilatkozat (minta)

Rövidítések

2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)	ABST
Advisory Committee on Immunization Practices	ACIP
Anatomical – Therapeutic – Chemical	ATC
American Type Culture Collection	ATCC
Állami Népegészségügyi Szolgálat	ÁNTSZ
Bronchoalveolaris lavage	BAL
Centers for Diseases Control and Prevention	CDC
Clinical and Laboratory Standards Institute	CLSI
Community Acquired Pneumonia (közösségben szerzett tüdőgyulladás)	CAP
Concanavalin-A	ConA
Cysticus Fibrosis	CF
Colony Forming Unit (telepképző egység)	CFU
Defined Daily Dose (átlagos felnőtt napi dózis)	DDD
Dezoxiribonuklein sav	DNS
Enzym-Linked Lectinsorbent Assay	ELLA
European Antimicrobial Resistance Surveillance System	EARRS
Extended Spectrum Beta-Lactamase (széles spektrumú béta-laktamáz)	ESBL
Fractional Inhibitory Concentration	FIC
Hospital Acquired Pneumonia (kórházban szerzett tüdőgyulladás)	HAP
Járványügyi Bakteriológiai Hálózat	JBH
Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet	KMDI
Kórházi-Egyetemi Mikrobiológiai Laboratórium	KML
Methicillin Rezisztens *Staphylococcus aureus*	MRSA
Minimal Inhibitory Concentration (minimális gátló koncentráció)	MIC
National Committee for Clinical Laboratory Standards	NCCLS
National Nosocomial Infection Surveillance System	NNIS
National Type Culture Collection	NTCC
Optikai Denzitás	OD
Országos Epidemiológiai Központ	OEK
Országos Közegészségügyi Intézet	OKI

Penicillin Binding Protein (penicillin kötő fehérje)	PBP
Pneumococcus Polysaccharid Vaccina	PPV
Polysaccharid-protein Conjugat Vaccina	PCV
Phosphat-Buffer-Salina	PBS
Single-Stranded Confirmation Polymorphism	SSCP
Solar Powered Satellite System	SPSS
Triphenil tetrazolium chlorid	TTC
Tryptic Soy Broth	TSB
Wheat Germ Agglutinin	WGA
World Health Organisation	WHO

Bevezetés

A baktériumok okozta légúti fertőzések, melyek lehetnek közösségben szerzettek, kórházi eredetűek és speciális betegséghez társulóak, mint pl. a cysticus fibrosis, az infekciózus kórképek között a legnagyobb számban fordulnak elő. Kezelésük sokszor jelent terápiás nehézséget, mert a különböző típusú rezisztencia mechanizmusok révén a légúti infekcióban szerepet játszó baktériumok egyre több antibiotikum hatásával szemben válnak ellenállóvá.

1. Légúti infekciók

A felső légutak infekcióinak kórokozói elsősorban vírusok, amelyek közül keveset tudunk célzottan kezelni. A felső légúti bakteriális fertőzések gyakran virális infekciót követően lépnek fel. A folyamatban szerepet játszanak azok a baktériumok, amelyek a nasopharynxban tünetmentesen telepednek meg. A vírusinfekció hatására kialakult hámsejtkárosodás, a csillószőrös hengerhámsejtek csillói által végzett légút tisztító mechanizmus sérülése, a felszaporodott nyák és a nyálkahártya duzzanat miatt elszaporodnak az ott jelen lévő baktériumok, és gyulladást váltanak ki.

A *Streptococcus pneumoniae (S. pneumoniae),* a *Haemophilus influenzae (H. influenzae)* és a *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis)* az esetek mintegy 80%-ában szerepelnek etiológiai tényezőként az akut bakteriális sinusitisben és az otitis mediaban. A krónikus sinusitisben a szájflóra anaerob baktériumai dominálnak az előbbiek mellett (1).

Az alsó légúti infekciók közül az akut bakterialis bronchitisben, a krónikus bronchitis acut exacerbatiojában a *Mycoplasma pneumoniae* és a *Chlamydia pneumoniae* mellett szintén gyakran megtalálható kórokozóként a *S. pneumoniae,* a *H. influenzae* és a *M. catarrhalis*.

A pneumóniát okozó baktériumok típusa függ attól, hogy a pneumónia közösségben (otthon) szerzett vagy kórházi eredetű, azon belül lélegeztetett betegnél jelentkezik-e vagy sem.

A Center for Diseases Control and Prevention (CDC) adatai szerint az USA-ban évente kb. 4,5 millió beteget kezelnek közösségben szerzett pneumóniával. A betegség incidenciája 170/100 000 lakos (2). Az életkor előrehaladtával a betegség előfordulása nő, s a betegek kb. 20%-a kerül kórházba. A várható kórokozó függ a beteg életkorától és a meglévő egyéb alapbetegségtől. A kórházi ellátást igénylő otthon szerzett pneumónia esetén legnagyobb arányban még mindig a *S. pneumoniae* a kórokozó (1, 3). A pneumococcus okozta súlyos légúti infekció legnagyobb számban az 5 évnél fiatalabb és a 65 évnél idősebb embereket veszélyezteti. A kórházban kialakuló pneumóniák esetében a kórokozók elsősorban az oropharynxot kolonizáló Gram-negatív baktériumok, az adott kórházi osztályon gyakrabban előforduló nozokómialis törzsek (methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* – MRSA, Extended Spectrum Beta-lactamase – ESBL - termelő *Klebsiella pneumoniae, Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Acinetobacter baumannii, Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa*). A lélegeztetéssel összefüggő pneumónia során a felső légutakat kolonizáló mikroorganizmusok a lélegeztetés következtében az egész tüdőt elárasztatják. Az USA-ban 1000 kórházi felvételre 4-7 kórházi eredetű pneumónia jut. Az intenzív osztályon kezelt betegek kb. 25%-nál alakul ki pneumónia. Mortalitása igen magas, 29-70%, amely nagyban függ a megfelelően választott empírikus kezeléstől (4). A kórházi kezelések számának emelkedésével 1984 és 1995 között a 100 000 lakosra jutó kórházi eredetű pneumóniák száma 36-ról 48-ra nőtt (2). A cysticus fibrosis alapbetegségben szenvedő betegek esetében a légutak korai kolonizációját ill. később súlyos pneumóniát okozhat a *P. aeruginosa* és a *S. aureus* (5).

2. A leggyakoribb, terápiás nehézséget jelentő légúti kórokozó baktériumok

2.1. *Streptococcus pneumoniae*

Pasteur 1880-ban fedezte fel a *S. pneumoniae*-t, majd nem sokkal később igazolódott, hogy ez a baktérium a lobáris pneumónia kórokozója. A baktérium Gram-pozitív, lándzsa vagy lángnyelv alakú coccus, amely párokban, esetleg rövid láncokban helyezkedik el. Párban való elhelyezkedéskor a baktériumok laposabb felükkel fordulnak egymás felé. A tok nélküli törzsek a tenyésztés során apró, 1 mm átmérőjű telepeket képeznek, míg a tokkal rendelkezők nagyobb, 2-3 mm-es telepekben tenyésznek. A baktérium tápigényes, csak véres agaron tenyészthető, amelyen enyhe alfa hemolízist mutat. A baktérium autolizinje miatt az idősebb telepek közepe besüpped. A virulens, invazív infekció kialakítására képes törzsek tokkal rendelkeznek (6).

A *S. pneumoniae* törzsek számos virulencia faktorát ismerjük. A pneumolizin egy hemolizin, amely a leukociták fagocitózisát gátolja. Az IgA proteáz a nyálkahártyát védő szekretoros IgA-t bontja. A neuraminidáz az agyszövet glikoproteinjében lévő N-acetil-neuraminsavat hasítja, és a meningitis kialakulásában van szerepe. A hialuronidáz segíti a baktérium szöveti penetrációját, a tok poliszacharid védi a baktériumot a fagocitózistól. A tok poliszacharid szerkezetileg sokféle, ez alapján a *S. pneumoniae* törzsek 90 különböző szerotípusba sorolhatók. Közülük a 6, 9, 14 és 23 szerotípusokat „gyermekkori típusok”-nak is nevezik, mert gyakrabban izolálhatók gyermekek súlyos infekcióiból. Ezek között találhatók leggyakrabban a különböző rezisztencia mechanizmusokkal rendelkező törzsek is. Az egyes szerotípusokkal szemben termelődött specifikus ellenanyag véd az azonos szerotípusú tok poliszachariddal rendelkező baktérium által később okozott invazív infekciótól, de a lokális gyulladás kialakulását nem előzi meg. A kifejlesztett védőoltásoknak ez az alapja (6).

A *S. pneumoniae* korábban 100%-ban érzékeny volt a penicillinekre. 1974-ben írták le először Dixon és munkatársai a penicillin rezisztens *S. pneumoniae* törzsek megjelenését. (7, 8). A penicillin célmolekulája a baktérium citoplazma membránjában elhelyezkedő fehérje – penicillin binding protein (PBP) -, amely transzpeptidáz, transzglikoláz működése révén a sejtfal peptidoglikán szintézisében játszik szerepet. A penicillin irreverzibilisen kötődik a PBP-khez, ezáltal inaktiválja azokat. A PBP-k szintézisét mozaik gének irányítják, így a változás mértékétől függően létrejöhet alacsonyabb és magasabb szintű penicillin, valamint amoxicillin és 3. generációs cefalosporinokkal szembeni rezisztencia (9). A pneumococcus okozta infekciókban ma már nem a penicillin-G az első választandó antibiotikum, de *in vitro* vizsgálatokban nagyon jól reprezentálja a béta-laktám antibiotikumokkal szembeni érzékenységet. Abban az esetben, ha a baktérium mérsékelten érzékeny a penicillin-G-re, az esetek túlnyomó többségében az amoxicillin kellő terápiás hatással rendelkezik. Ez a klinikai tapasztalat vezetett ahhoz a szakmai ajánlásváltozáshoz, amely során 2000-ben a National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) az amoxicillinnel szembeni rezisztencia határt felemelte 0,5 mg/l-ről 2 mg/l-re.

Az egészséges emberek közel 50%-a tünetmentesen hordozza a baktériumot a nasopharynxban, elsősorban kisgyermek korban (10, 11, 12). A baktérium okozta fertőzés kialakulásában nagy szerepe van az előzetes vírusfertőzésnek, különösen az influenzát követi gyakran a *S. pneumoniae* okozta pneumónia. A vírusfertőzés fokozza a baktérium kötődését a légúti hámhoz. A nasopharynxból a baktérium a belélegzett levegővel együtt lekerül az alveolusokba, ahol gyulladást okozva terjed tovább.

Az alsó légúti infekciók, elsősorban a közösségben szerzett pneumónia (Community Acquired Pneumonia: CAP) leggyakoribb kórokozója még ma is a *S. pneumoniae*, amely által okozott fertőzésekkel szemben már rendelkezünk védőoltással.

Ez a vakcina nem tudja a pneumóniát megelőzni, de jelentősen csökkenti a másodlagos invazív pneumococcus infekciók (bakteriaemia, meningitis) kialakulásának az esélyét, így csökkenti a pneumococcus fertőzés okozta halálozást. Az USA-ban évente 40 000 beteg hal meg pneumococcus infekció következtében, sokkal több, mint bármely más - védőoltással megelőzhető - bakteriális fertőzésben (2).

A peumococcusok ellen két, eltérő immunogenitású vakcinát fejlesztettek ki. A Pneumococcus Polysaccharid Vaccina (PPV) immunogenitása viszonylag alacsony (80%), mert csak a baktérium tok poliszacharidját tartalmazza, amely gyenge immunválasz kialakítására képes. Ismételt oltás nem emeli az ellenanyag választ. Bármilyen mértékű hatékonyság csak érett immunrendszerű emberben, 2 éves kor felett várható. A Magyarországon forgalomban lévő „Pneumovax 23" (MSD US) és a „Pneumo23" (Sanofi Paris France) vakcinák a *S. pneumoniae* 23 tok poliszacharid antigénjét tartalmazzák (szerotípusok: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, és a 33F). A másik típusú vakcinában a baktérium tok poliszacharidját valamilyen fehérje komponenshez kötötték, így az általa kiváltott immunválasz jóval erősebb, újabb oltással a hatás fokozható. A Polysaccharid-protein Conjugat Vaccina 7 szerotípus (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F) antigénjét tartalmazó vakcina (7PCV), amelyet „Prevenar" (Wyeth Pensylvania US) néven hoztak forgalomba. A 7 szerotípuson túl keresztreaktivitással a 6A, 9A, 9L, 18B és a 18F szerotípusokkal szemben is képes védettséget kialakítani (13). A Pneumococcus Polysaccharid-protein Vaccina 9 (9PPV) és a 11PPV az USA-ban már bevezetett újabb konjugált vakcinák. A 9PPV az 1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F, míg a 11PPV az 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F és a 23F szerotípusok kapszuláris poliszacharidját tartalmazza diphteria toxoidhoz, ill. a másik formában tetanus toxoidhoz kötve (14). Klinikai vizsgálatokat végeznek már a 14-valens pneumococcus vakcinával is. A

vakcinák bevezetésétől nem csak az oltottak védettségét várják, hanem feltételezik, sőt a legújabb felmérések alapján igazolták is, hogy a kisgyermekek környezetében élő felnőtt és idős emberek is kevésbé betegszenek meg *S. pneumoniae* okozta súlyos infekcióban (15, 16, 17).

Amerikai felmérések szerint a pneumococcus fertőzések miatt elhunytak fele megmenthető volna a vakcinák széleskörű alkalmazásával (2). Számos, egy-egy országra, illetve több országra kiterjedő felmérés készült, amelyben az egészségesek illetve a betegek mintáiból izolált törzsek szerotípus meghatározását végezték el (18, 19, 20, 21). Más tanulmányban az invazív pneumococcus infekciókból izolált törzsek szerotípus spektrumát vizsgálták (17). Mindezek a vizsgálatok azt célozzák, hogy helyi adatok segítsék a rendelkezésre álló védőoltások hatékonyságának az előrejelzését. Az USA-ban a pneumococcus poliszacharid vakcina 23 szerotípusa okozza a gyermekek és a felnőttek között az invazív pneumococcus infekciók 85-90%-át. A 7 szerotípust tartalmazó konjugált vakcina (Prevenar) azok ellen a szerotípusok ellen véd, amelyek az USA-ban a 6 évnél fiatalabb gyermekek körében 86%-ban a bakteriaemiáért, 83%-ban a meningitisért, 65%-ban az acut otitis media-ért felelősek. (2). Magyarországról kevés adattal rendelkezünk ahhoz, hogy átfogó képet alkossunk a leggyakrabban előforduló szerotípusokról (22, 23, 24).

Az USA-ban az Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) a poliszacharid pneumococcus vakcinát ajánlja 65 éves kor felett, immunkárosodott betegeknek, 2 év feletti gyermekeknek és felnőtteknek, azoknak, akik súlyos tüdő, vagy szívbetegek, cukorbetegek, alkoholisták, krónikus májbetegek, liquor csorgásos betegek, valamint a 2 év feletti funkcionális vagy anatómiai aspleniás betegeknek (2).

Számos európai ország - így hazánk is - kidolgozta a saját vakcinációs politikáját a pneumococcus fertőzések megelőzésére (25, 13).

2.2. ***Pseudomonas aeruginosa***

A *P. aeruginosa* Gram-negatív, aerob, laktózt nem bontó, vékony pálca. A természetben széles körben elterjedt, megtalálható a talajban, vizekben, növényeken, állatokban, az emberben is. A nedves helyeket kedveli, könnyen elszaporodik a kórházi környezetben, elsősorban a vizes helyeken, a lélegeztető gépek párásítójában. A klinikai izolátumok közel fele kékes-zöld pigmentet, pyocyanint termel. A *P. aeruginosa* ismert kórházi patogén, elsősorban az immunkárosodott betegekben hoz létre különböző fertőzéseket (6).

A *P. aeruginosa* okozta fertőzések kialakulásának három szakasza ismert. A baktérium először megtapad a nyálkahártya felszínén, kolonizálva azt. A megtapadt baktériumok helyi fertőzést hozhatnak létre, majd bejutva a véráramba szóródhatnak. A nyálkahártya felszínekhez való kötődés képessége, melyet a baktérium által termelt extracelluláris poliszacharid nagymértékben elősegít, különösen fontos szerepet játszik a cysticus fibrosisos (CF) betegek légúti infekcióinak, valamint a lélegeztetett betegek pneumóniájának patomechanizmusában.

A *P. aeruginosa* számos virulencia faktorral rendelkezik, így pílus adhezinekkel, amelyekkel a baktérium a sejtek felszínén tud "végigmenni", nem-pílus eredetű adhezinekkel, amelyek az epiteliális felszínhez való kötődésért felelősek. A *P. aeruginosa* külsején elhelyezkedő lipopoliszacharid egy nem-pílus adhezin, amely a transzmembrán regulátort köti. A baktériumok 90%-a rendelkezik exotoxin A-val, amely a protein bioszintézis bénításával sejthalálhoz vezet, így ez az exotoxin felelős a lokális szövetpusztulásért. Az exoenzim S a légúti szövetek degradációjáért felelős. A rhamnolipid szerkezetű hemolizinek szolubilizálják a légutak azon surfactant foszfolipideit, melyek a tüdőt védik a kollabációtól. A rhamnolipid gátolja a mucociliáris

transzportot és a légutak epitheliumának ciliáris funkcióit, valamint szerepük van a proteinek és lektinek roncsolásában is. A leukocidin a leukocitákat, a limfocitákat és egyéb szöveteket lizálja. A Las A és Las B elasztáz az elasztin nevű proteint bontja, mely a tüdő expanziójáért és kontrakciójáért felelős, így jelentős szerepet játszik az akut fertőzések kialakulásában. Végül az alginát is virulencia faktor, egy mannuronsavból és glukuronsavból álló polimer, amely viszkózus gélt képez a baktérium körül, segítve a kolonizációt és a biofilm képzést (6, 26).

A *P. aeruginosa* okozta pneumónia kialakulásában, a lélegeztetett betegeknél és a CF-es betegeknél is meghatározó szerepe van a baktérium biofilm képző tulajdonságának. A biofilm egy szubsztrátum felszínén immobilizálódott, mikrobiális eredetű szerves polimer-mátrixba ágyazódott sejtcsoport. Metabolikusan csak kevéssé aktív, így számos gyógyszer számára az extracelluláris poliszacharid-mátrix áthatolhatatlan. Biofilm megtalálható számos helyen a normál humán szervezetben is, pl. fogak felszínén, de megtalálható testüregekbe helyezett katétereken, kanülökön, protéziseken, pacemakereken, sebészeti dréncsöveken. A szabadban előforduló biofilmeknél a szervezetben kialakulók sokkal komplexebbek, mert itt a szervezetből származó anyagok, sejtek, extracelluláris fiziológiás proteinek is részt vesznek a kialakításában. Az antibakteriális gyógyszerek a szervezet saját védekező mechanizmusa nélkül nem képesek fellépni a kórokozók ellen. A biofilm mögé bújt baktériumok gyakran még a fagocitáknak is ellenállnak. Emiatt feltétlenül szükséges a biofilm képzés csökkentése, vagy a képződött biofilm roncsolása a kezelés hatékonyságának biztosításához. Egyes makrolid antibiotikumok bizonyítottan hatékonyak a pseudomonasok alginát produkciójának visszaszorításában, amelyet kiegészítő kezelésként alkalmaznak a CF-es, és az ehhez klinikailag igen hasonló, japán felnőtteknél jelentkező diffúz panbronchiolitis kezelésében (27, 28, 29, 30, 31, 32, 33,

34). A pseudomonasok ill. más biofilm képző baktériumok által termelt alginát, a gazdaszervezet immunválaszát provokálja, és folyamatos antigén-antitest kapcsolódást hoz létre a légutak felszínén. A termelődő antigének hatására immunkomplexek alakulnak ki, melyek az odaáramló neutrophil granulocitákkal együtt lerakódnak a szövetekben és destruktiv elváltozásokat okoznak. Számos tanulmány, összefoglaló értekezés foglalkozik a cysticus fibrosisban szenvedő betegek *P. aeruginosa* okozta kolonizációjának, majd a fellépő infekcióinak kezelési lehetőségeivel (27, 35, 36, 37, 38, 39).

A *P. aeruginosa* törzsek antibiotikumokkal szembeni rezisztenciáját a biofilmen kívül számos antibiotikummal szembeni természetes rezisztenciája, valamint a különböző mechanizmusokon alapuló szerzett rezisztenciája adja. A szerzett rezisztencia mechanizmusok közül az antibiotikum bontó enzimek jelenléte, az efflux pumpa mechanizmus és a megváltozott sejtfal permeabilitás a leggyakoribb.

2.3. A leggyakoribb, nozokómiális pneumóniát okozó *Enterobacteriaceae* családba tartozó Gram-negatív baktériumok

A *K. pneumoniae*, az *E. aerogenes* és *E. cloacae*, az *Escherichia coli* és a *S. marcescens* a leggyakrabban kórházi eredetű pneumóniát okozó Gram-negatív bélbaktériumok. Mindegyik laktózt bontó, a *K. pneumoniae* kivételével mozgó pálcák. Jelen vannak a környezetünkben, a talajban, vízben, és az emberi bélflóra állandó vagy átmeneti tagjai. A *K. pneumoniae* gyakran, a többi ritkán képez tokot (6).

Kórházi környezetben az infekció kialakulása szempontjából rezervoár lehet a beteg gastrointestinalis traktusa, az ápolószemélyzet keze. Az intubált, az immunszupprimált és az antibiotikum kezelésben részesülő betegek oropharynxa gyakran kolonizálódik Gram-negatív pálcákkal, ahonnan a kolonizáló baktériumok könnyen, gyorsan tovaterjedhetnek, és infekciót okozhatnak (9, 40). A béta-laktám

antibiotikumok túlzott használatával egyre gyakrabban izolálnak klinikai mintákból ESBL termelő törzseket. A súlyos infekciók mortalitása igen magas, 50-100% között van. Multirezisztens törzsek egyre gyakrabban fordulnak elő, mint nozokómialis patogének a csecsemő és gyermekosztályokon is (41, 42).

A Gram-negatív baktériumok béta-laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztenciáját igen sokféle béta-laktamáz enzim okozhatja. Az első béta-laktamázt termelő törzset 1940-ben írták le, még a béta-laktám antibiotikumok széleskörű használata előtt. Az enzim a természetben azoknak a baktériumoknak a túlélését segíti, amelyek természetes béta-laktámot termelő mikroorganizmusok környezetében élnek (43). Az első plazmid mediálta béta-laktamázt termelő törzsről 1965-ben görög szerzők számoltak be egy hemokultúrából kitenyészett baktériumban. Az enzim elnevezését – TEM - a beteg nevéből alkották (Temoniera) (44).

A béta-laktamáz enzimek a béta-laktám antibiotikumokhoz reverzibilisen kötődnek és a béta-laktám gyűrű felhasadásával hatástalanítják a molekulát. A béta-laktamáz enzimeket szubsztrát profiljuk, béta-laktamáz gátlóval szembeni érzékenységük, izoelektromos pontjuk, molekulasúlyuk alapján különbözőképpen csoportosítják. A leggyakrabban alkalmazott a Bush-Livermore féle csoportosítás, amely class A-B-C-D és nem besorolható csoportot képez, függetlenül a kódoló gén helyétől (6). A béta-laktamáz inhibítorok képesek a béta-laktamáz enzimeket irreverzibilisen inaktiválni. A béta-laktám antibiotikumokat bontó enzim lehet kromoszómán, vagy plazmidon kódolt. A kromoszómális béta-laktamázok különböző csoportokba sorolhatók, legelterjedtebbek az AmpC típusú enzimek. Az enzimtermelés lehet folyamatos, amikor a baktériumok különböző mennyiségben, állandóan termelik az enzimet, és lehet indukálható, amelynél egy másik antibiotikum hatására kezdődik el az enzim termelése. Az indukció mértéke függ az indukáló szertől. Mutáció révén

létrejöhetnek stabilan derepresszált enzimtermelő törzsek, amelyek igen nagy mennyiségben, folyamatosan termelik a béta-laktamáz enzimet. Ez elsősorban klinikai izolátumoknál jelenik meg indukáló antibiotikum kezelés alatt, a kezdetben hatékonynak tűnő kezelés későbbi kudarcát okozva. A plazmidon kódolt béta-laktamázok elsősorban a „class A" csoportba sorolhatók, igen elterjedtek a különböző baktérium fajok között. A rezisztencia gének a plazmid átadással más speciesekbe is átkerülhetnek, a terápiás nehézség mellett ebben rejlik a veszélyességük. Ide tartoznak az un. szűkebb spektrumú, a széles spektrumú és a béta-laktamáz inhibitorok bontására is képes enzimek (45, 46, 47).

1983-ban írtak le először olyan rezisztencia plazmidot, amely az adott baktériumot rezisztenssé tette az újonnan kifejlesztett 3. generációs cefalosporinokkal szemben, és ez a rezisztencia átvihető volt egyik baktériumból a másikba (48). Ez a plazmid hordozta egy ESBL enzim genetikai kódját, amely enzim elsősorban az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumokban fordul elő, de megjelenhet pseudomonasokban is. Az enzimet először Kliebe és munkatársai közölték 1985-ben (49), elnevezése Philippon és munkatársai nevéhez fűződik (50). Leggyakrabban a TEM és az SHV típusú béta-laktamáz enzim génjének a mutációjával jön létre. Eddig 130-nál több TEM típusú és 50-nél több SHV típusú ESBL enzimet különítettek el. Az előbbi csoportokba nem sorolható enzimeket CTX-M-nek jelölik (cefotaxim és ceftazidim ellen magasan aktív), amelyből eddig 40-nél több ismert (51, 52). A mutáció néhány aminosavat érint, ezzel az enzim szubsztrát profilja jelentősen kiszélesedik, így bontani képes az összes cefalosporint és monobaktamot, de hatástalan a karbapenemekre.

Célkitűzések

1. Munkánk egyik célja a *S. pneumoniae* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálata volt. Elemeztük az Intézetünkben 1997-2005 között izolált *S. pneumoniae* törzsek rezisztencia adatait korcsoportonként, mintánként, időszakok, járó- és fekvőbetegek szerint. Tünetmentes óvodások pneumococcus orrhordozásáról szintén adatokat kívántunk gyűjteni. Választ kerestünk arra, hogy a random gyűjtött *S. pneumoniae* törzsek szerotípusa milyen arányban esik egybe a hazánkban forgalomban lévő pneumococcus védőoltásokkal, így a védőoltás alkalmazása várhatóan milyen hatékonyságot eredményezhet? A penicillinre magas rezisztenciát mutató törzseknél vizsgáltuk, hogy egy új, orális, 3. generációs cefalosporin, a cefditoren *in vitro* vizsgálatokkal hatékony-e a penicillinre rezisztens pneumococcusokra, és várhatóan alkalmazható-e ezen rezisztens törzsek által okozott fertőzések kezelésében?
2. Célunk volt vizsgálni és követni a cysticus fibrosisban szenvedő betegek légutait kolonizáló ismert patogén baktériumok előfordulási arányát a Szegedi Gyermekkórház Cystás Fibrosis Ambulanciáján gondozott betegeknél 1999-2001 között. Olyan könnyen alkalmazható detektáló rendszert kívántunk beállítani, amellyel a CF-es betegek légúti mintáiból izolált *P. aeruginosa* törzsek biofilm képzését, továbbá a baktériumok tenyészetében *in vitro* körülmények között a makrolid antibiotikumok biofilm képzést csökkentő hatását mérni tudjuk.
3. A Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Orvos-és Gyógyszerésztudományi Centrum Általános Orvostudományi Kar (SZTE ÁOK) Belgyógyászati Intenzív Osztályán alsó légúti infekció miatt kezelt betegek különböző módon vett mintáiból kitenyészett baktériumok egyezőségét vizsgáltuk az optimális mintavételi eljárás meghatározása céljából. A továbbiakban a nozokómiális alsó légúti infekciókból származó mintákban az *Enterobacteriaceae* családba tartozó

Gram-negatív baktériumok jelenlétét, valamint ugyanezen esetekben az ESBL termelés előfordulási arányát kívántuk meghatározni.

4. A Gram-negatív légúti patogén baktériumok multirezisztens törzseivel szemben potenciálisan hatékony, szinergista antibiotikum kombináció lehetséges alkalmazása céljából vizsgáltuk különböző *in vitro* módszerekkel a béta-laktám/béta-laktamáz gátló, béta-laktám/fluorokinolon, béta-laktám/ aminoglikozid antibiotikumok együttes hatását.
5. A potenciálisan légúti patogén Gram-negatív baktériumok rezisztencia mechanizmusait kívántuk tanulmányozni hagyományos és molekuláris módszerekkel.

Anyagok és módszerek

1. Baktérium törzsek

S. pneumoniae törzsek: Intézetünkben 1997-2005 között különböző klinikai mintából izolált *S. pneumoniae* törzs adatait éves bontásban, valamint 1998-2001 és 2002-2005 között izolált törzseket négy éves összesítésben elemeztük. A random módon válogatott, 2001. január és június között Intézetünkben izolált 57 *S. pneumoniae* törzs szerotípus meghatározását végeztük el. A 35 *S. pneumoniae* törzs 3-6 éves tünetmentes óvodás gyermek nasopharyngeális mintáiból származott. A vizsgálatokat a Szent-Györgyi Albert Orvos- és Gyógyszerésztudományi Centrum Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásetikai Bizottság engedélyével és a szülők írásos hozzájárulásával végeztük (az engedély másolatát és a szülői nyilatkozat mintáját a függelékben mellékeltük). A cefditoren-pivoxillal végzett vizsgálatainkba 1993-1995 között a Heim Pál Kórház (Budapest) osztályain és ambulanciáin ellátott, felső légúti infekcióban szenvedő gyermekek mintáiból izolált 93, nagy százalékban penicillinre rezisztens, valamint 35, az Intézetünkben izolált, pneumonia miatt kezelt felnőtt beteg *S. pneumoniae* törzsét vontuk be.

Pseudomonas spp. törzsek: A biofilm termelés vizsgálatokat cysticus fibrosisban szenvedő gyermekek felső és alsó légúti mintáiból származó *P. aeruginosa* törzsekkel végeztük. Az E teszttel végzett szinergizmus vizsgálatokba elsősorban intenzív osztályon kezelt, nozokomiális pneumoniás betegek alsólégúti mintáiból tenyésztett *Pseudomonas* spp-ket vontunk be.

Enterobacteriaceae törzsek: A cefoperazon béta-laktamáz gátló kombináció vizsgálatokba bevont 7 *E. coli* és 9 *K. pneumoniae* törzset Intézetünkben izoláltuk. A béta-laktamáz típusú rezisztencia mechanizmus vizsgálatainkat 170 *K. pneumoniae,* 82 *E. cloacae* és 15 *S. marcescens* törzzsel végeztük. A *K. pneumoniae* törzsek

Magyarország különböző területeiről, az *E. cloacae* törzsek két centrumból, míg a *S. marcescens* törzsek a Szegedi Tudományegyetem egyik klinikáján zajlott nozokómiális járványból (légúti mintákból és hemokultúrából) származtak.

Vizsgálatainkba egy betegtől egy izolált törzs adatait vontuk be azért, hogy a többször ugyanattól a betegtől kitenyészett azonos érzékenységű törzs ne torzítsa az elemzés eredményét.

Az egyes vizsgálatokban American Type Culture Collection (ATCC), ill. National Type Culture Collection (NTCC) kontroll törzseket alkalmaztunk.

A vizsgálataink során alkalmazott kontroll törzsek listáját az 1. táblázat tartalmazza.

Kontroll törzs	Vizsgálat
S. pneumoniae ATCC 49619	MIC érték meghatározás E-teszttel
S. pneumoniae NTCC 7465	MIC érték meghatározás mikrodilúciós módszerrel
S. pneumoniae NTCC 13593	MIC érték meghatározás mikrodilúciós módszerrel
E. coli NTCC 10418	MIC érték meghatározás mikrodilúciós módszerrel
E. coli ATCC 25922	Korongdiffúziós rezisztencia meghatározás
P. aeruginosa ATCC 27853	Korongdiffúziós rezisztencia meghatározás

1. táblázat. A vizsgálatainkban alkalmazott kontroll törzsek

2. Mintavételi módszerek

Az óvodások körében végzett surveillance vizsgálatok során a felső légúti minták közül a nasopharynxból vett mintát részesítettük előnyben, mivel ott a tünetmentesen hordozott baktériumok, illetve az egyes felső légúti infekcióért felelős baktériumok legtöbb esetben színtenyészetben találhatók. A CF-es betegeknél torokváladékot tenyésztettünk, ami a betegek kolonizáltsági állapotára ad felvilágosítást. Az alsó légúti minták közül a köpetet előzetes citológiai megfelelés után (>25 fehérvérsejt és <10 laphámsejt/látótér 100x-os nagyítással, legalább 40 látótér vizsgálata) dolgoztuk fel. A

lélegeztetett betegek trachea váladékát citológiai vizsgálat eredményével is kiegészítettük, mert ez támpontot adott arra, hogy valóban van-e a betegnek bakteriális alsó légúti gyulladása, vagy a kitenyészett baktériumok a felső légutakból származnak. A szignifikáns baktériumszám ezeknél a mintáknál $\geq 10^5$ telepképző egység/ml (Colony Forming Unit/ml - CFU/ml). A lélegeztetett betegekből származó védett bronchoalveolaris lavage (BAL) minta tenyésztése klinikailag jól használható eredményt ad, mert a felső légutak flórája nem szennyezi. A szignifikáns baktériumszám ebben az esetben $\geq 10^3$ CFU/ml. Kis számban származtak a baktériumok egyéb mintákból (pleurális punktátum, hemokultúra, liquor) is.

3. Baktériumok azonosítása

A klinikai mintákból izolált, illetve a surveillance vizsgálatok során a nasopharynxban hordozott törzseket telepmorfológia, mikroszkópos vizsgálat és hagyományos, a rutin diagnosztikában alkalmazott szokványos biokémiai tulajdonságok vizsgálatával határoztuk meg (6). Egyes esetekben automatával (VITEK1, VITEK2, bioMérieux, L'Etoile, France) identifikáltuk a baktériumokat.

4. A *Streptococcus pneumoniae* törzsek tipizálása

4.1. Szerotipizálás

A *S. pneumoniae* törzseket specifikus antiszérumok alkalmazásával, agglutinációs módszerrel (Mast Group Ltd. Bootle UK) szerotipizáltuk a gyártó utasításainak megfelelően. A törzseket Todd-Hewitt levesben egy éjszakán át 37°C-on tenyésztettük, majd 2000 g-vel 10 percig 4°C-on centrifugáltuk. A reszuszpendált üledékből 15µl-t 10µl antiszérummal hoztunk össze tárgylemezen és figyeltük az agglutinációt.

5. Antibiotikumokkal szembeni rezisztencia meghatározások

5.1. Korongdiffúziós módszer

A rutin diagnosztikai vizsgálatok során az egyes baktériumok antibiotikum rezisztencia korongdiffúziós módszerrel határoztuk meg. A kapott gátlási zónák minősítését az NCCLS/Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) aktuális ajánlásoknak megfelelően végeztük. A *S. pneumoniae* törzsek esetén csak akkor fogadtuk el a penicillin és származékainak érzékenységét, ha a vizsgálatban alkalmazott 1μg tartalmú oxacillin korong körül a gátlási zóna ≥20 mm volt. Ellenkező esetben MIC (Minimal Inhibitory Concentration) értéket határoztunk meg E-teszttel (53).

5.2. MIC érték meghatározás E-teszttel

A vizsgálatot az AB Biodisk (Solna, Sweden) ajánlásának megfelelően végeztük. A *S. pneumoniae* törzseknél minden olyan esetben MIC értéket határoztunk meg penicillinre, amoxicillinre és ceftriaxonra, amikor az 1μg oxacillin hatóanyagot tartalmazó korong (Oxoid Basingstoke, Hampshire, UK) alkalmazásakor a gátlási zóna ≤19mm volt. Penicillinre érzékenynek értékeltük a törzset, ha a MIC ≤0,06 mg/l, mérsékelten érzékenynek, ha a MIC 0,12 és 1 mg/l közötti, rezisztensnek MIC ≥2 mg/l esetén. Amoxicillinre érzékeny volt egy törzs MIC ≤2mg/l, mérsékelten érzékeny MIC = 4mg/l, rezisztens MIC ≥8mg/l esetén. Ceftriaxonra érzékenynek minősítettük azt a nem meningitises betegtől származó *S. pneumoniae* törzset, amelynél a MIC ≤1mg/l, mérsékelten érzékenynek MIC = 2mg/l, rezisztensnek MIC ≥4mg/l, meningitis esetén a törzs érzékeny volt MIC ≤0,5mg/l, mérsékelten érzékeny MIC = 1mg/l, rezisztens MIC ≥2mg/l esetén. A Gram-negatív baktériumok esetében az értékelést szintén az NCCLS/CLSI ajánlása szerint végeztük (53).

5.3. **MIC érték meghatározás agardilúciós módszerrel**

A vizsgálatot kettős léptékű hígítási sorral végeztük 5% defibrinált lóvért tartalmazó Mueller-Hinton agaron, illetve vért nem tartalmazó Mueller-Hinton agaron (Oxoid Basingstoke, Hampshire, UK) a vizsgált baktérium törzstől függően. A törzsek PBS-ben (Phosphat-Puffer-Salina) elkészített 0,5 McFarland sűrűségű szuszpenziójából a táptalaj felszínére 25 tüskét tartalmazó replikátorral vittük fel a cseppeket. A beoltott lemezeket 16-24 órán át inkubáltuk 37 ^{o}C-on. Azt az antibiotikum hígítási értéket vettük a baktérium MIC értékének, ahol növekedés már nem volt látható. Az eredmények értékelésénél az NCCLS/CLSI határértékeit alkalmaztuk (53).

5.4. **MIC érték meghatározás mikroleves hígításos módszerrel**

A vizsgálni kívánt antibiotikumokból felező hígítási sort készítettünk mikrotitráló lemezben (256 mg/l-től 0,125mg/l-ig). A vizsgált törzs 24 órás lemeztenyészetéből 0,5 McFarland sűrűségű szuszpenziót készítettünk 2x Mueller-Hinton levesben, amelyből minden lyukba 100 µl-t mértünk. A mikrotitráló lemezeket lefedtük, 24 órán keresztül normál atmoszférán 37 ^{o}C-ra inkubáltuk, majd vizuálisan, ill. 1% TTC (triphenil tetrazolium chlorid) oldat hozzáadásával értékeltük. A vizsgált törzsnek az adott antibiotikumra mért MIC értékét az a koncentráció adta, ahol már szemmel látható zavarosodás, vagy a TTC oldat piros elszíneződése nem volt látható (54).

6. Antibiotikum rezisztencia mechanizmusok vizsgálata

6.1. **Béta laktamáz termelés vizsgálata kromogén szubsztrát alkalmazásával**

A vizsgált Gram-negatív baktérium izolált telepét rávittük a nitrocefin tartalmú korongra (Difco, Sparks, US), amely pozitív esetben néhány másodpercen belül piros elszíneződést mutatott. A béta-laktamáz termelő törzsek szubsztrát profiljának

meghatározását mikrokolorimetriás módszerrel, a friss tenyészetek ultrahangos feltárása után Escamilla módszerével végeztük (55).

6.2. **Enzim indukciós vizsgálatok**

A módszer alapja, hogy egyes antibiotikumok jó hatékonysággal serkentik a baktériumokat béta-laktamáz termelésre, míg maguk ellenállnak az enzim hatásának, azaz jó indukáló szerek. Más antibiotikumok jó szubsztrátjai a termelődő béta-laktamáz enzimnek, de kevésbé hatékonyak az enzimtermelés indukálásában, tehát jó indikátorok. A vizsgálat során az antibiotikum érzékenység korongdiffúziós módszerrel történő vizsgálatával azonos módon elkészített baktérium szőnyegre feltett indukáló antibiotikumot tartalmazó korong közepétől 14-16 mm-re helyeztük fel az indikátor antibiotikumot tartalmazó korongot. A lemezeket a szokásos módon inkubáltuk. Ha az indikátor antibiotikum korong körüli gátlási zónája >1mm-nél jobban benyomódik az indukáló antibiotikum oldalánál, vagyis azon az oldalon több enzim termelődött - ami elbontotta az indikátor antibiotikumot - akkor a törzs indukálható béta-laktamáz enzimet termelt. Alkalmazott indukáló antibiotikumok: cefoxitin, imipenem. Indikátor antibiotikumok: cefuroxim, cefoperazon, cefotaxim, ceftazidim (56).

6.3. **ESBL termelés kimutatás korongdiffúzióval**

A rutin korongdiffúziós módszerrel történő antibiotikum érzékenység meghatározás alkalmával kettős korong diffúziós módszerrel határoztuk meg az ESBL termelést két korong - ceftazidim és amoxicillin/klavulánsav - segítségével. ESBL termelő törzsek esetében a két korong egymás felé eső részén kiszélesedett, vagy pillangó alakban megjelenő baktérium növekedés-gátlást észlelünk. Abban az esetben, ha ez a jelenség nem volt látható, de a baktérium a 3. generációs cefalosporinokra az NCCLS/CLSI gátlási zónáknál szűkebb zónát mutatott, akkor öt korong (ceftazidim, cefotaxim,

aztreonam, cefepim és amoxicillin/klavulánsav) módszerrel, Jarlier és munkatársai szerint vizsgáltuk az ESBL termelés jelenlétét (57).

6.4. **ESBL termelés kimutatás E-teszttel**

Bizonyos esetekben megerősítő vizsgálatként az ESBL termelés fenotípusos kimutatására ceftazidim/ceftazidim-klavulánsav, vagy cefotaxim/cefotaxim-klavulánsav tartalmú E-teszteket alkalmaztunk. Akkor igazolt a vizsgált törzs ESBL termelése, ha a klavulánsav nélküli antibiotikummal kapott MIC érték és a klavulánsavval kombinált antibiotikummal kapott MIC érték hányadosa legalább 3 (58).

6.5. **ESBL termelés molekuláris szinten történő vizsgálata**

Az ESBL termelő *K. pneumoniae*, *E. cloacae* és *S. marcescens* törzsekből a plazmid DNS-t Magic Miniprep DNA Purification Kittel (Promega, Madison, WI, USA) extraháltuk. A szeparálást követően az elektroforézist 0,7%-os agaróz gélen végeztük, a gélt ethidium bromiddal festettük. A plazmid DNS TEM és SHV génjeit TEM és SHV specifikus primerekkel amplifikáltuk. Az SHV gének egyes típusainak elkülönítésére SSCP (single-stranded conformation polymorphism) analízist alkalmaztunk. Az amplifikált terméket *Pst*I enzimmel emésztettük, majd polyacrylamid gélen szeparáltuk ismert SHV gén standardokkal együtt. Az ssDNS fragmenteket (single-strand – egyszálú DNS) ezüst nitráttal festettük.

7. **Szinergizmus vizsgálatok**

A szinergizmus vizsgálatokat Gram-negatív, főként légúti mintákból izolált baktériumokkal végeztük. A vizsgált antibiotikumok: cefoperazon klavulánsavval vagy szulbaktámmal kombinálva (sakktáblatitrálás, ölési görbe), ciprofloxacin, piperacillin, ceftazidim, imipenem, tobramycin, amikacin (szinergizmus vizsgálat E teszttel)

7.1. **Sakktábla (chequerboard) titrálás**

A cefoperazon - béta-laktamáz gátló (szulbaktám, klavulánsav) kombinációk vizsgálatát Lorian leírása szerint chequerboard titrálással vizsgáltuk Takátsi-féle mikrotitráló lemezben (54). Vízszintesen a cefoperazon felező hígítását készítettük el, a függőleges sorokba a béta-laktamáz gátlók kémcsőben végzett felező hígításait mértük be azonos – 50-50 µl – térfogatban. A függőleges „A” sor csak a béta-laktamáz gátló hígítási sorát, a vízszintes 12. sor csak a cefoperazon hígítási sorát tartalmazta, így ezekben a sorokban a kombináció nélküli MIC értékek leolvashatók voltak. Az A8-as lyuk csak baktérium szuszpenziót tartalmazott, ez volt a növekedési kontroll. A kombináció nélküli és a kombinációban mért MIC értékekből kiszámoltuk a Fractional Inhibitory Concentration-t, a FIC indexet: FIC=MIC”A”(„B”)/MIC”A”+MIC”B”(„A”)/MIC”B”. A kapott eredményt értékeltük: ha a FIC index $\leq$0,5, a hatás szinergén, ha a FIC 0,5< $\leq$1, a hatás additív, ha a FIC 1< $\leq$2, a hatás indifferens, ha a FIC >2, a hatás antagonista (59).

7.2. **Ölési-görbe (killing-curve) módszer**

A cefoperazon és klavulánsav/szulbaktám kombinációk közös hatását ölési görbe vizsgálattal állapítottuk meg. A vizsgált baktérium 24 órás véres agar tenyészetéből 10^5 CFU/ml csírászámot állítottunk be Mueller-Hinton levesben. Vizsgáltuk a cefoperazon 1xMIC, 2xMIC értékének megfelelő koncentrációjának a hatását önállóan, valamint 1 mg/l klavulánsavval, 1mg/l ill. 16 mg/l szulbaktámmal kombinálva. A tenyészeteket Ehrlen-Mayer lombikban rázatva 37°C-on normál atmoszférán inkubáltuk. Csíraszám meghatározást végeztünk az antibiotikum mentes tenyészetből, majd minden egyes antibiotikumot illetve antibiotikum és béta-laktamáz gátló kombinációt tartalmazó tenyészetből 6 és 24 óra múlva. A kapott ml-kénti csíraszámok 10-es alapú logaritmusát az idő függvényében ábrázoltuk (54).

7.3. **Szinergizmus vizsgálat E-teszttel**

A vizsgált baktériumok friss tenyészetéből 0,5 McFarland sűrűségű szuszpenzióval végeztük a vizsgálatokat. Az egyik Mueller-Hinton agar lemezre először a kombináció „A” tagját tartalmazó E-teszt csíkot, a másikra a „B” tagját tartalmazó E-teszt csíkot helyeztük. 30 perces szobahőn történő inkubálás után - amely idő alatt az antibiotikum teljes mértékben bediffundál a táptalajba - az E-teszteket eltávolítottuk és szigorúan ugyanarra a helyre az „A” antibiotikum helyére „B”-t, a „B” antibiotikum helyére „A” antibiotikum tartalmú csíkokat helyeztünk. Ezután a lemezeket 16-24 óráig 37°C-on, normál atmoszférán inkubáltuk. Inkubáció után az antibiotikumok MIC értékét külön-külön és kombinációban is meghatároztuk. Az egyedi és a kombinációban alkalmazott antibiotikumok esetén meghatároztuk a FIC indexet és értékeltük a kombináció együttes hatását.

8. **Biofilm termelés vizsgálat**

A CF-es gyermekek légúti mintáiból izolált, vizuálisan is mucoid *P. aerugonosa* törzsek biofilm termelését mértük Enzym-Linked Lectinsorbent Assay (ELLA) módszerrel Leriche leírása szerint (60). A kísérletekhez a lektinek egyszerű cukrokhoz való kötődését vettük alapul. Két különböző peroxidázzal jelölt lektint (Concanavalin-A - ConA és Wheat Germ Agglutinin - WGA) alkalmaztunk és a baktériumok által termelt biofilmhez való kötődésüket vizsgáltuk. A baktériumok biofilm termelését 96 lyukú műanyag mikrotitráló lemezben vizsgáltuk. A 96 lyukú mikrotitráló lemez első hat oszlopába ConA-t mértünk, amely a biofilm D-glükóz és D-mannóz részeihez kötődik, míg a 7-12 oszlopban WGA-t használtunk, amely az N-acetyl-D-glükózamint ismeri fel specifikusan. A peroxidázzal jelölt ConA-ból ill. a WGA-ból felező hígítási sort

készítettünk, amelyet a mikrotitráló lemez oszlopaiba fentről lefelé csökkenő koncentrációban mértünk be. A tápfolyadékkal (Tryptic Soy Broth – TSB – élesztőkivonattal kiegészítve) bevitt baktériumoknak a kialakult biofilmhez nem kötődő, folyadékban lévő frakcióját steril PBS pufferrel kimostuk, majd peroxidázzal jelzett lektineket alkalmaztunk a biofilm láthatóvá tételére. Kötődés után a kitapadt lektinhez kötött peroxidázt 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABST) szubsztrát hozzáadással tettük láthatóvá. A jól detektálhatóan biofilmet termelő törzseknél vizsgáltuk a biofilm termelés gátlását clarithromycin hozzáadásával. Ennél a vizsgálatnál Leriche módszerét úgy módosítottuk, hogy a TSB tápfolyadékban 50, 100, 200, 300, 400 mg/l végső koncentrációjú clarithromycint oldottunk. A naponkénti tápfolyadék csere után meghatároztuk a biofilm termelés változását ELLA módszerrel a kezeletlen törzshöz viszonyítva.

9. Direkt E-tesz vizsgálat CF-es betegek köpetmintáinak primer tenyészetén

Romló klinikai állapotú CF-es betegek köpetéből cytológiai vizsgálatot és mucolizist követően 100 µl-nyi mintát véres agar táptalajra plétoltunk, majd antipseudomonas hatású antibiotikumokat tartalmazó E teszteket helyeztünk fel (cefoperazon, ceftazidim, piperacillin/tazobactam, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, aminoglikozidok). A lemezeket 16-24 órán át inkubáltuk 37 ^{o}C-on, normál atmoszférán. Vizsgáltuk a kísérő garatflóra érzékenységét a vizsgált antibiotikumokkal szemben, valamint a különböző MIC értékkel bíró *P. aeruginosa* telepek és egyéb, multirezisztens baktériumok jelenlétét (AB Biodisc Stokholm, Sweden, Solna, E-teszt továbbképzés).

10. Antibiotikum fogyás meghatározása

1998 és 2005 között vizsgáltuk a Csongrád megyei és az országos béta-laktám antibiotikumok [Anatomical - Therapeutic - Chemical (ATC) csoport: J01C] és a makrolid, lincosamid [J01F] csoportba tartozó antibiotikumok fogyását. Az éves antibiotikum felhasználási adatok forrása az IMS PharmMIS adatbázis nagykereskedelmi eladása volt. Az antibiotikumok csoportosítása, és fogyasztásuk kalkulálása az egészségügyi világszervezet, a World Health Organisation (WHO) ATC – DDD (Defined Daily Dose – átlagos felnőtt napi dózis) indexének 2005-ös verziója alapján történt (61). A népességi adataink a Központi Statisztikai Hivatal adatbázisából származtak. Az antibiotikum fogyásnak, a *S. pneumoniae* törzsek penicillinekre és makrolidokra való rezisztencia előfordulásra való hatásának megítéléséhez csak az antibiotikumok per os formuláit vettük be az elemzésünkbe. Az országos és a helyi (Csongrád megye) antibiotikum fogyási adatokat DDD/1000 lakos/napban adtuk meg (62).

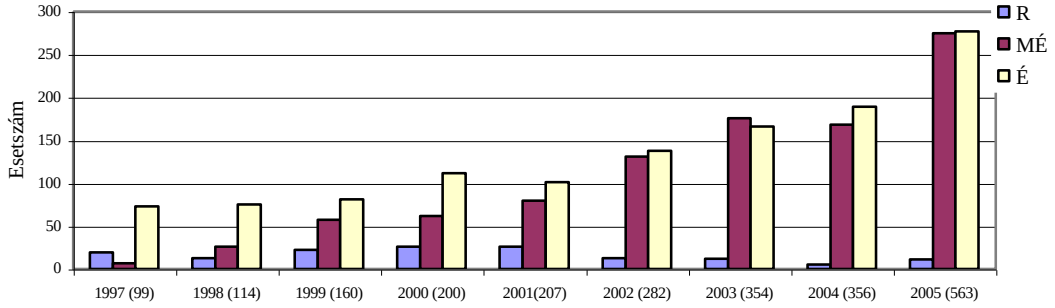
11. Az adatok statisztikai elemzése

A rezisztencia adatokat a laboratóriumunk informatikai rendszeréből gyűjtöttük. Egy betegtől egy izolátum adatait vettük figyelembe. A vizsgált időszakokban a járó- és fekvőbetegek mintáiból, valamint a 14 év alatti és feletti betegek mintáiból izolált *S. pneumoniae* törzsek adatainak elemzésére Khi-négyzet és Fisher féle egzakt próbát alkalmaztunk az SPSS program csomag segítségével (verzió 13.0). A statisztikai elemzés során a $p \leq 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

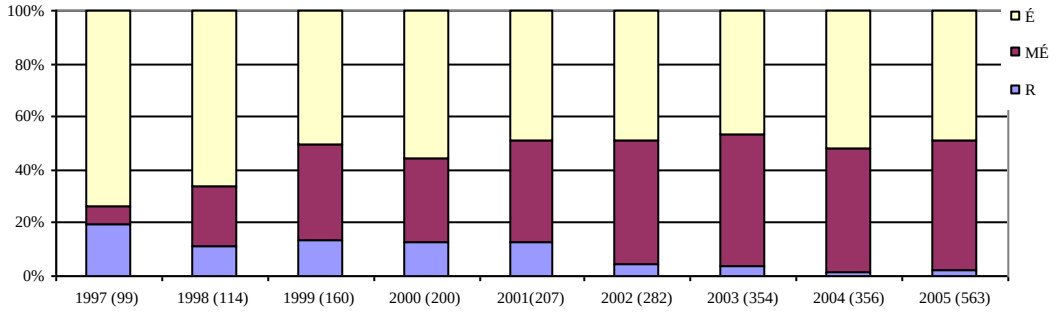
1. *Streptococcus pneumoniae* törzsek vizsgálata során kapott eredményeink

A *S. pneumoniae* törzsek penicillin érzékenységi adatait 1997-től 2005-ig a Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézetben (KMDI) különböző mintákból izolált törzseknél elemeztük. A gyermekek mintáiból (0-14 év) izolált *S. pneumoniae* törzsek penicillin érzékeny/mérsékelten érzékeny/rezisztens esetszámát az. 1. ábrán mutatjuk be. A penicillinnel szembeni érzékenység %-os megoszlását a gyermekek mintáiban a 2. ábra mutatja.



R: penicillinre rezisztens, MÉ: penicillinre mérsékelten érzékeny, É: penicillinre érzékeny

1. ábra. Gyermekek mintáiból izolált *S. pneumoniae* törzsek megoszlása penicillin érzékenységük alapján 1997-2005 között (esetszám)



2.ábra Gyermekek mintáiból izolált *S. pneumoniae* törzsek %-os megoszlása penicillin érzékenységük alapján 1997-2005 között (esetszám)

A vizsgált időszakban a penicillinre mérsékelten érzékeny törzsek aránya fokozatosan emelkedik 1999-ig, majd a következő években az arány közel változatlan. A terápiás gondot okozó penicillinre rezisztens törzsek száma és aránya 2002-től csökkenő tendenciát mutat; míg 1997-ben 19% volt (19 eset), 2004-2005-re 1 ill 2%-ra esett vissza (5 ill. 11 eset).

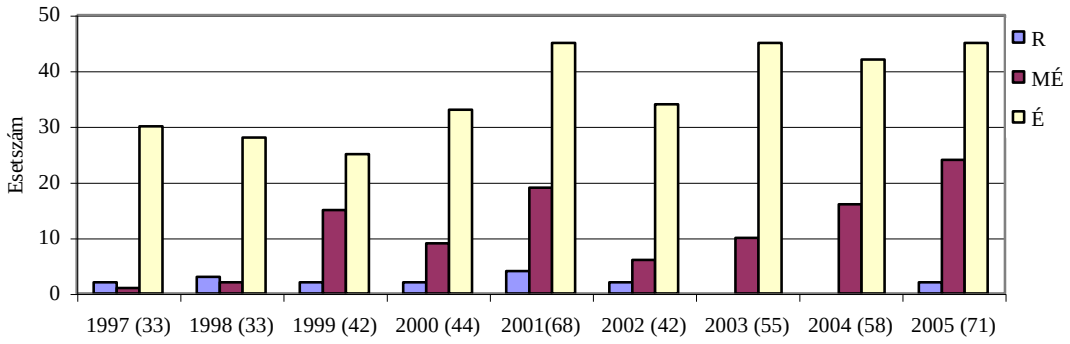
A 2. táblázatban az izolált törzsek származási helyét mutatjuk be. Annak ellenére, hogy a mintavételt infekciózus tüneteket mutató betegeknél végezték el, elenyésző számban tenyészett ki pneumococcus olyan mintából, amely az infekció valódi helyéről származott (alsó légúti minta, hemokultúra, liquor). Az esetek döntő többségében nagy valószínűséggel a baktérium hordozása állt fenn, vagy nem igazolható egyértelműen, hogy a tünetek hátterében a kitenyészett *S. pneumoniae* állt, mint fertőző ágens. Ennek elsősorban az az oka, hogy a kisgyermekektől nem lehet megfelelő kooperáció hiányában alsó légúti mintát nyerni. A kialakuló pneumonia ritkán annyira súlyos, hogy gépi lélegeztetés váljon szükségessé és így nyíljon lehetőség mély légúti váladék nyerésére. A súlyos esetben kialakuló pleurális folyadékgyülem punkciója során nyert mintából kitenyészett baktérium kórokozó szerepének megítélése egyértelmű. A felső légúti huruthoz társuló kötőhártya gyulladás kórokozója azonosítható a szemváladékból. Az otitis media miatt végzett paracentesis során vett fülváladék, valamint a sinusitises betegek arcüreg váladékának a mintaszáma 2005-ben emelkedett meg jelentősen, miután a speciális gyermek fül-orr-gégészeti ellátást végző egységet az egyetemi klinikához csatolták, és a minták tenyésztését Intézetünk végezte.

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Fülváladék	5	2	11	5	7	4	12	21	18
Arcüreg mosó	0	1	0	0	0	0	0	0	36
Orr/torok/NT*	89	109	139	182	189	269	328	325	517
Alsó légúti minta	0	1	2	3	2	2	4	3	1
Punktátum	0	0	2	3	1	1	2	1	2
Vizelet	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Hüvelyváladék	0	1	0	0	0	1	1	0	0
Szemváladék	4	0	6	6	7	5	4	6	6
Hemokultúra	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Liquor	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Gyomorváladék	0	0	0	0	0	0	1	0	0

*NT: nasopharyngealis tampon

2. táblázat A *S. pneumoniae* pozitív minták megoszlása gyermekek esetén

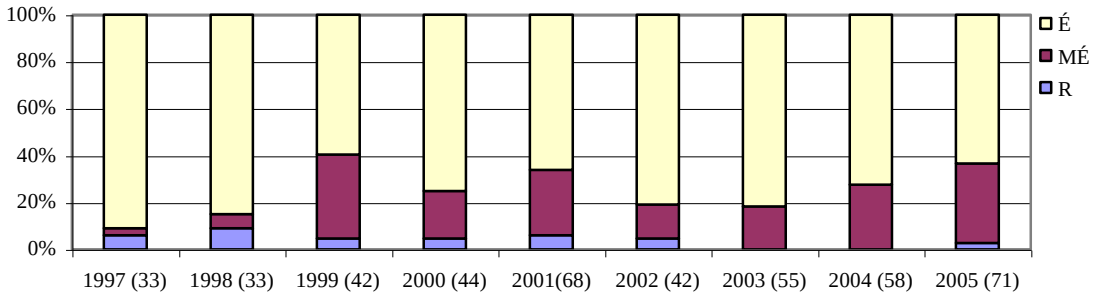
Felnőtt betegektől származó mintákból kitenyészett *S. pneumoniae* esetek száma minden évben igen alacsony volt (3.- 4. ábra).



3. ábra Felnőttek mintáiból izolált *S. pneumoniae* törzsek megoszlása penicillin érzékenységük alapján 1997-2005 között (esetszám)

A felnőttek mintáiból még kisebb számban tenyésztettünk ki penicillin rezisztens törzseket, mint a 14 éven aluliak mintáiból. A legnagyobb esetszám 2001-ben volt (4

eset). 2003-2004-ben egyetlen törzs sem volt penicillinre rezisztens (MIC ≥2 mg/l). A penicillinre mérsékelten érzékeny törzsek változó számban és arányban tenyésztek, emelkedő tendencia 2002-től figyelhető meg, bár az arány jóval alatta marad a gyermekek mintáiból kitenyészett penicillinre mérsékelten érzékeny pneumococcusok arányától (2005-ben gyermekeknél 50%, felnőtteknél 39%).



4. ábra Felnőttek mintáiból izolált *S. pneumoniae* törzsek %-os megoszlása penicillin érzékenységük alapján 1997-2005 között (esetszám)

Elemeztük a felnőtt betegek pneumococcus pozitív mintáinak összetételét, amelyet a 3. táblázatban mutatunk be.

	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Fülváladék	0	0	1	1	2	0	3	3	2
Arcüreg mosó	0	0	0	3	2	0	0	2	1
Orr/torok/NT*	11	5	7	14	18	17	20	13	14
Alsó légúti minta	11	10	19	8	19	15	20	26	34
Punktátum	3	3	5	3	6	2	4	3	1
Vizelet	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Hüvely/Ondó	0	9	4	4	5	4	0	1	1
Szemváladék	0	2	1	1	3	0	2	0	2
Hemokultúra	8	4	4	7	11	3	6	7	14
Liquor	0	0	1	3	2	0	0	3	2
Összes	33	33	42	44	68	42	55	58	71

*NT: nasopharyngealis tampon

3. táblázat A *S. pneumoniae* pozitív minták megoszlása felnőttek esetén

Az izolált törzsek 59-85%-ban valódi kórokozók voltak (nem orr/torok hordozás), mivel az infekció helyéről származtak. Így a felnőttek esetében sokkal kevésbé a hordozott, mint inkább a valódi kórokozók rezisztencia viszonyait tudtuk megítélni.

A laboratóriumunkban izolált *S. pneumoniae* törzsek releváns antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának előfordulását, annak változását elemeztük úgy is, hogy a vizsgált időszakot két időperiódusra bontottuk: I. 1998-2001, II. 2002-2005. Az első periódusban csak a klinikák fekvőbeteg osztályairól és járóbeteg ambulanciáiról, míg a második periódusban háziorvosoktól és a második szintű ellátást végző gyermekkórházból is emelkedő számban kaptunk vizsgálati anyagokat. A vizsgált 8 éves időszak alatt 2670 *S. pneumoniae* törzset izoláltunk a különböző klinikai mintákból. 1267 törzs származott fekvő betegektől, melynek nagyobb részét (983) 14 év alatti gyermekek mintáiból, kisebb részét (284) felnőttek mintáiból izoláltuk (4. táblázat). 1403 törzs járóbetegek mintáiból került izolálásra, melyek közül 14 év alattiaktól érkezett mintákból tenyészett ki 1204 és felnőttek mintáiból 189. A két időperiódust összehasonlítva jelentős eltéréseket találtunk, különösen a penicillinre rezisztens *S. pneumoniae* törzsek arányában. A 0-2 éves korcsoportban, mind a járó- mind a fekvőbetegek esetében a penicillin rezisztens *S. pneumoniae* törzsek aránya jelentősen csökkent a vizsgált két időszakban (20%-ról 4%-ra és 21%-ról 2%-ra). Azonos tendencia figyelhető meg a 3-14 éves gyermekek mintáiból izolált törzsek esetében is. A felnőtt betegek (>14 év) mintáiból izolált *S. pneumoniae* törzsek között igen alacsony volt a penicillin rezisztens (9% és 2,5%) törzsek aránya mindkét időszakban. A felnőttektől származó mintákban a penicillinre nem érzékeny (rezisztens és mérsékelten érzékeny együtt) *S. pneumoniae* törzsek aránya jóval alacsonyabb, mint a gyermekek mintáiból izolált törzseknél (felnőttek mintáiból izolált összes törzs esetén 24,5%, gyermekek mintáiból kitenyészett összes törzs esetén 42,4%). A penicillin rezisztens *S. pneumoniae*

törzsek aránya szignifikánsan csökkent a két időszakot összehasonlítva mind a fekvő- (14%-ról 3%-ra), mind a járóbetegek esetében (10%-ról 2%-ra). A penicillinre mérsékelten érzékeny törzsek aránya a két időszakot összevetve növekedett (34%-ról 44%-ra a fekvő betegek esetében; 28%-ról 51%-ra a járóbetegek esetében). A minták jóval nagyobb számban érkeztek gyermekektől, mint felnőttektől (73%-ban az I. időszakban, 80%-ban a II. időszakban), tehát az eredményeket sokkal jobban meghatározzák a gyermekkorúaktól származó mintákból izolált baktériumok érzékenységi adatai (4. táblázat).

Korcsoportok		*S. pneumoniae* törzsek száma		Penicillin rezisztens törzsek száma/% MIC ≥2 mg/l		Penicillin mérsékelten érzékeny törzsek száma/% MIC 0,12-1 mg/l		P	Amoxicillin rezisztens törzsek száma/% MIC ≥8 mg/l		Amoxicillin mérsékelten érzékeny törzsek száma/% MIC=4 mg/l		P	Ceftriaxon rezisztens törzsek száma/% MIC ≥1 mg/l		Ceftriaxon mérsékelten érzékeny törzsek száma/% MIC=0,5 mg/l		P
		I.	II.	I.	II.	I.	II.		I.	II.	I.	II.		I.	II.	I.	II.	
Fekvő beteg	0-2	158	335	32/20	13/4	58/37	180/54	<0.000	17/11	6/2	24/15	6/2	<0.000	6/4	3/1	3/2	11/3	KA
	3-14	193	297	26/13	7/2	68/35	129/43	<0.000	14/7	2/1	15/8	6/2	<0.000	4/2	0	2/1	8/3	KA
	15-65	85	103	7/8	3/3	22/26	28/27	0.270	5/6	1/1	4/5	3/3	KA	3/4	0	3/4	3/3	KA
	>65	41	55	4/10	1/2	12/29	11/20	0.097	1/2	0	3/7	1/2	KA	1/2	0	1/2	1	KA
Össz		477	790	69/14	24/3	160/34	348/44	<0.000	37/8	9/1	46/10	16/2	<0.000	14/3	3/0,4	9/2	23/3	<0.000
Járó beteg	0-2	115	373	24/21	9/2	36/31	208/56	<0.000	12/10	3/1	13/11	9/2	<0.000	6/5	2/0,5	1/1	9/2	KA
	3-14	181	545	12/7	9/2	55/30	297/53	0.001	6/3	3/1	11/6	9/2	<0.000	2/1	3/0,5	3/2	10/2	KA
	15-65	84	92	1/1	1/1	16/19	25/27	0.444	0	0	3/4	2/2	KA	0	0	0	1	KA
	>65	4	9	0	0	0	2	KA	0	0	1	0	KA	0	0	1	0	KA
Össz		384	1019	37/10	19/2	107/28	522/51	<0.000	18/5	6/1	27/7	20/2	<0.000	8/2	5/0,5	3	20	0.058

KA: kevés adat

I.: 1998-2001 II.: 2002-2005

4. táblázat Penicillin, amoxicillin és ceftriaxon magas és mérsékelt rezisztenciájának előfordulása *S. pneumoniae* törzseknél a vizsgált két időperiódusban

Az I. időszakban a penicillin rezisztens *S. pneumoniae* törzsek előfordulása gyermekek esetében 14,5% volt, felnőttek esetében 5,6%, a II. időszakban a gyermekek mintáiból 2,5%-ban a felnőttek mintáiban 1,9%-ban izoláltunk penicillin rezisztens *S. pneumoniae* törzset.

Az amoxicillin rezisztens és mérsékelten érzékeny törzsek előfordulása csökkenő tendenciát mutatott a két időperiódust összehasonlítva a járó és fekvő betegek, gyermekek és felnőttek esetében egyaránt. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az amoxicillin legtöbb esetben alkalmazható a *S. pneumoniae* törzsek okozta fertőzéses megbetegedések kezelésében. Ceftriaxonra rezisztens törzsek előfordulása csökkent, míg a mérsékelten érzékeny törzsek számában emelkedést tapasztaltunk, de ezek az esetszámok az összes izolált törzsnek igen kis százalékát képezték (4. táblázat).

Külön vizsgáltuk az invazív mintákból (vér, liquor, védett bronchoalveolaris lavage, punctatum) izolált *S. pneumoniae* törzsek penicillin rezisztenciájának előfordulását. Nem találtunk lényeges különbséget a penicillin rezisztens törzsek számában a felnőttek és a gyermekek mintáiból izolált törzsek esetében a két időszakot összehasonlítva. A penicillinre mérsékelten érzékeny törzsek aránya csak igen kis mértékben emelkedett mindkét betegcsoportban, így penicillinre nem érzékeny (rezisztens és mérsékelten érzékeny) törzsek előfordulási aránya is kismértékben növekedett (32,7% és 35%). Az invazív mintákból izolált 155 *S. pneumoniae* törzs közül a vizsgált 8 év alatt mindössze 9 törzs nem volt érzékeny amoxicillinre és 3 ceftriaxonra (5. táblázat).

	S. pneumoniae törzsek száma		Penicillin rezisztens törzsek száma MIC ≥2 mg/l		Penicillin mérsékelten érzékeny törzsek száma MIC 0,12-1 mg/l		Amoxicillin rezisztens törzsek száma MIC ≥8 mg/l		Amoxicillin mérsékelten érzékeny törzsek száma MIC=4 mg/l		Ceftriaxon rezisztens törzsek száma MIC ≥4 mg/l		Ceftriaxon mérsékelten érzékeny törzsek száma MIC=2 mg/l	
	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.	I.	II.
<14 év	7	44	2	2	3	19	1	1	2	1	0	0	0	1
>14 év	51	53	2	0	12	13	1	0	3	0	0	0	2	0
Összes	58	97	4	2	15	32	2	1	5	1	0	0	2	1

5. táblázat A penicillinre rezisztens és mérsékelten érzékeny *S. pneumoniae* törzsek előfordulása invazív mintából izolált törzseknél (Hemokultúra, liquor, védett bronchoalveolar lavage, pleuralis punctatum)

A 6. táblázatban az erythromycin és clindamycin rezisztens *S. pneumoniae* törzsek arányát mutatjuk be. Az erythromycin rezisztencia egységesen magas volt a járóbeteg gyermekek mintáiból izolált törzseknél a két időszakot vizsgálva (44% és 43%), és kissé magasabb volt, de jelentős különbséget nem mutatott az évek során a fekvőbetegeknél (49% és 48%). A felnőttek mintáiból izolált törzseknél az erythromycin rezisztencia arányt alacsonyabbnak találtuk minden vizsgált csoportban, de kissé emelkedő tendenciát mutatott mind a fekvő (I. periódus 24%, II. periódus 28%), mind a járó betegek esetében (I. periódus 22%, II. periódus 31%), a két időszakot összehasonlítva. A clindamycin rezisztencia minden esetben kissé alatta maradt az erythromycin rezisztencia aránynak.

	Korcsoportok	*S. pneumoniae* törzsek száma		Erythromycin rezisztens törzsek száma/%		p	Clindamycin rezisztens törzsek száma/%		p
		I.	II.	I.	II.		I.	II.	
Fekvő beteg	0-2	158	335	75/47	177/53	0.289	74/47	146/44	0.498
	3-14	193	297	98/51	126/42	0.078	80/41	115/39	0.571
	15-65	85	103	19/22	30/29	0.320	18/21	29/28	0.312
	>65	41	55	11/27	11/20	0.469	10/24	10/18	0.612
Összes		477	790	203/43	344/43	0.770	184/38	300/38	0.952
Járó beteg	0-2	115	373	62/54	170/46	0.135	59/51	142/38	0.013
	3-14	181	545	68/38	226/41	0.383	62/34	192/35	0.857
	15-65	84	92	17/20	28/29	0.166	18/21	20/22	1.000
	>65	4	9	2/0	3/0	KA	2/0	3/0	KA
Összes		384	1019	149/39	427/42	0.301	141/38	357/35	0.573

KA: kevés adat

6. táblázat Az erythromycin és clindamycin rezisztencia előfordulása *S. pneumoniae* törzseknél a vizsgált két periódusban

Az antibiotikum fogyási adatokat a 7. táblázatban mutatjuk be. A penicillinek fogyása (ATC kód: J01C) Magyarországon viszonylag állandó volt 1998 és 2005 között (átlag ± SD:8,45±0,51 DDD/1000 lakos/nap). Átmeneti emelkedés figyelhető meg 1999-ben. A penicillinek csoportján belül a széles spektrumú penicillinek (J01CA) fogyása csökkenő tendenciát mutatott, míg a penicillinek béta-laktamázzal kombinált csoportjában (J01CR) a fogyás folyamatosan emelkedett. A penicillinek csoportjának (J01C) és alcsoportjainak (J01CA; J01CR) felhasználása azonos tendenciát mutatott Csongrád megyében és országosan. A makrolid, lincosamid (J01F) csoport országos fogyása emelkedett az évek során, ugyanúgy, mint Csongrád megyében, ahol a fogyás minden évben kissé meghaladta a lakosságra standardizált országos adatokat.

(1. közlemény)

Év	J01C		J01CA		J01CR		J01F	
	Magyar-ország	Csongrád megye	Magyar-ország	Csongrád megye	Magyar-ország	Csongrád megye	Magyar-ország	Csongrád megye
1998	8.03	8.48	3.15	3.56	3.41	3.54	2.75	3.13
1999	9.50	10.64	3.63	4.39	4.24	4.67	3.70	4.08
2000	8.24	9.42	3.03	3.64	3.76	4.45	3.25	3.98
2001	8.66	9.57	3.23	3.65	3.98	4.66	3.03	3.66
2002	8.06	9.03	2.89	3.38	3.89	4.60	2.73	3.26
2003	9.01	9.76	3.22	3.49	4.55	5.29	3.05	3.55
2004	8.31	9.44	2.76	3.24	4.52	5.31	3.09	3.68
2005	8.58	9.72	2.62	3.22	5.22	5.81	3.90	4.08

J01C Béta-laktám antibiotikumok, penicillinek

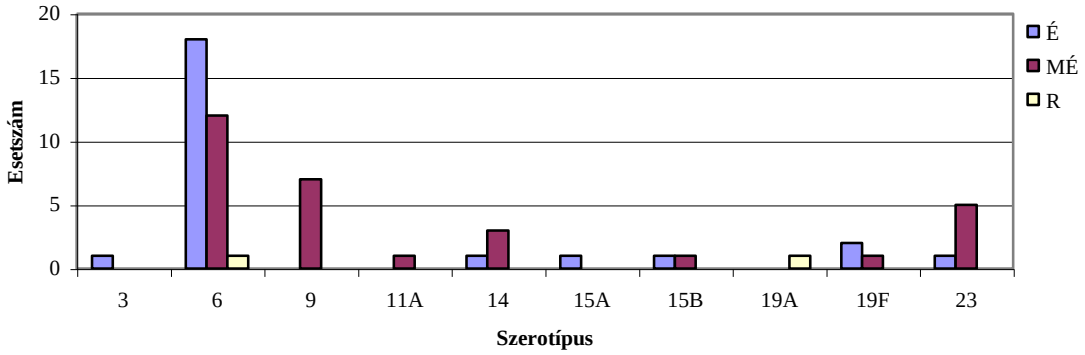
J01CA Széles spektrumú penicillinek

J01CR Béta-laktám béta-laktamáz kombináció

J01F Makrolidok, linkózamidok

7. táblázat A magyarországi és a regionális (Csongrád megye) járóbeteg antibiotikum fogyás a vizsgált antibiotikum csoportok esetében DDD/1000 lakos/nap; 1998-2005.

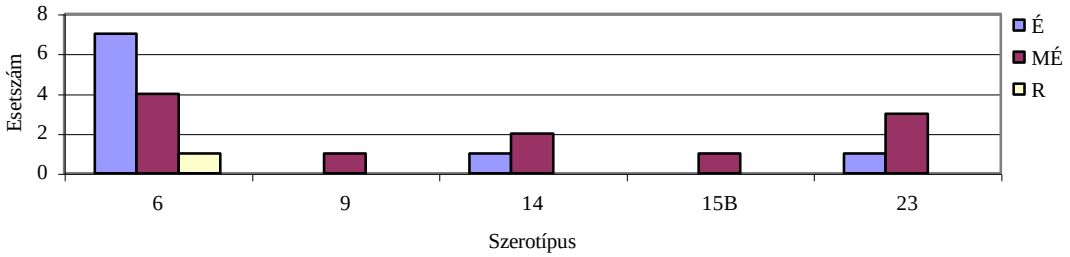
Kevés hazai adattal rendelkezünk a hordozott és a kórokozó *S. pneumoniae* törzsek szerotípus megoszlásáról. Munkacsoportunk elvégezte 2001. január és június között izolált, 57 random módon válogatott *S. pneumoniae* törzs szerotipizálását, melyeknek eredményét mutatjuk be a penicillinnel szembeni érzékenységgel együtt a 5. ábrán.



5. ábra A KMDI-ben 2001 január-június között izolált *S. pneumoniae* törzsek szerotípus szerinti megoszlása és penicillinnel szembeni érzékenysége. (N=57)

Egy törzs volt penicillinre rezisztens (MIC ≥2 mg/l), 30 penicillinre mérsékelten érzékeny. A legnagyobb számban a törzsek (N:31) a 6-os szerotípusba tartoztak.

Az 57 szerotipizált *S. pneumoniae* törzsből 21 származott 2 éves, vagy annál fiatalabb gyermektől. A 21 törzs 52%-a (11 törzs) volt penicillinre mérsékelten érzékeny, és az egy penicillinre rezisztens törzset is ebben a csoportban izoláltuk (6. ábra).



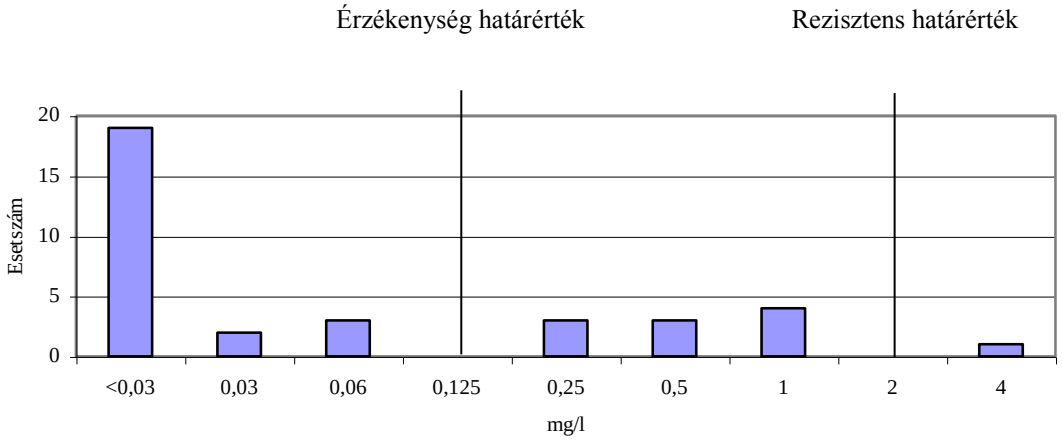
6. ábra A KMDI-ben 2001 január-június között izolált 2 évnél fiatalabb gyermekek mintáiból izolált *S. pneumoniae* törzsek szerotípus szerinti megoszlása és penicillinnel szembeni érzékenysége. (N=21)

A két éves kor alatti gyermekek mintáiból izolált törzsek szerotípusa 95%-ban (20 törzs) megegyezett az ebben a korban alkalmazható immunogén 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F szerotípus ellen védelmet kialakító konjugált vakcina szerotípusaival. A két évnél idősebb páciensek mintáiból kitenyészett *S. pneumoniae* törzsek szerotípusa 97%-ban (35 törzs) volt azonos a 23 valens pneumococcus poliszacharid vaccinában található szerotípusokkal.

Felnőttek mintáiból 8 törzs származott, amelyek közül egy törzs penicillinre érzékeny és 6-os szerotípusú, hat törzs penicillinre mérsékelten érzékeny, ebből kettő 6-os, kettő 9-es, kettő pedig 23F szerotípusú, egy pedig penicillinre rezisztens 19A szerotípusú volt. A felnőtt betegek közül kettőnek sinusitise, egynek otitis mediaja, négy betegnek pneumoniája, egy betegnek bronchitise volt. A minták minden esetben a

fertőzés helyéről származtak (2 sinus aspiratum, 1 középfül váladék, 2 hemokultúra és 2 trachea váladék), míg a gyermekektől származó pneumococcus pozitív 49 mintából egy mellkaspunktátumból, egy otitis media-s beteg fülváladékából, 5 sinusitises beteg nasopharyngealis mintájából származott. A többi esetben egyszerű hurutos tünetek miatt történt mintavétel az orrból vagy a torokból.

A betegektől származó mintákon túl megvizsgáltuk négy szegedi óvodában a 3-6 éves gyermekek esetében a *S. pneumoniae* orrhordozás előfordulási gyakoriságát. 195 tünetmentes gyermek nasopharynxát mintáztuk meg, keresve a szokásos felsőlégúti patogéneket. Eredményeinket a 8. táblázatban foglaltuk össze. A gyermekek felében találtunk baktérium hordozást, 35 esetben *S. pneumonie*-t, 27 esetben *H. influenzae*-t, 30 esetben *M. catarrhalis*-t, 28 esetben *S. aureus*-t izoláltunk. 17 gyermeknél két-, kettő gyermeknél háromféle baktérium tenyészett ugyanazon mintából. A 8. ábrán mutatjuk be a *S. pneumoniae* törzsek penicillin MIC értékeihez tartozó esetszámokat. Az izolált 35 *S. pneumoniae* törzs közül egy penicillinre, amoxicillinre, erythromycinre és clindamycinre is rezisztens volt. Ceftriaxon rezisztens törzset nem izoláltunk (8. táblázat).



Penicillin: érzékeny ≤0,06 mg/l, mérsékelten érzékeny 0,12-1 mg/l, rezisztens ≥2 mg/l

7.ábra Tünetmentesen hordozott *S. pneumoniae* törzsek penicillin MIC értékeinek megoszlása.

	Vizsgált gyermekek száma	Izolált *S. pneumoniae* törzsek száma	Penicillin rezisztens MIC ≥2 mg/l	Penicillin mérsékelten érzékeny MIC 1-0,12 mg/l	Amoxicillin Rezisztens MIC ≥8 mg/l	Amoxicillin mérsékelten érzékeny MIC 4 mg/l	Ceftriaxon Rezisztens MIC ≥4 mg/l	Ceftriaxon mérsékelten érzékeny MIC 2 mg/l	Erythromycin / clindamycin rezisztens
Belvárosi óvodák	122	14	1	10	1	2	0	1	11
Külvárosi óvodák	73	21	0	4	0	0	0	0	3
Összes	195	35	1	14	1	2	0	1	14

8. táblázat Tünetmentes óvodások hordozott *S. pneumoniae* törzseinek rezisztencia adatai

A négy óvoda közül kettő belvárosi, kettő külvárosi területen működik.

(2. közlemény)

Egy újonnan bevezetett oralis 3. generációs cefalosporin (cefditoren-pivoxil) hatékonyságát vizsgáltuk 93, 1993-1995 között izolált, nagy arányban penicillin rezisztens *S. pneumoniae* törzspopuláción. A törzsek 24%-a érzékeny, 22%-a mérsékelten érzékeny és 54%-a rezisztens volt penicillinre. A vizsgálatainkba bevontunk 35 olyan pneumococcus törzset, amelyet felnőtt pneumóniás betegek mintáiból izoláltunk (30 köpetből, 5 hemokultúrából származott). A vizsgált törzsek MIC értékeit a 9. táblázatban foglaltuk össze.

	MIC (mg/l)		
A törzsek eredete	MIC 50	MIC90	MIC tartomány
Pneumonia (35)			
Penicillin	≤0,03	0,06	≤0,03 – 0,25
Cefditoren	≤0,015	0,03	≤0,015 – 0,25
Felső légúti infekció (93)			
Penicillin	0,5	4,0	≤0,03 –64≤
Cefditoren	0,025	1,0	≤0,015 – 2,0

MIC 50: a törzsek 50%-ának MIC értéke

MIC 90: a törzsek 90%-nak MIC értéke

9. táblázat Felnőtt pneumoniás betegek és felső légúti hurutban szenvedő gyermekek mintáiból származó *S. pneumoniae* törzsek penicillin és cefditoren MIC értékei

Az 10. táblázatban a penicillin érzékeny/mérsékelten érzékeny és rezisztens csoportba sorolt törzsek cefditoren MIC értékeit mutatjuk be.

	Penicillin érzékeny (MIC ≤0,06mg/l) N=46	Penicillin mérsékelten érzékeny (MIC 0,12 - 1mg/l) N=27	Penicillin rezisztens (MIC ≥2mg/l) N=55
Penicillin MIC50	≤0,03	0,5	8
Penicillin MIC90	≤0,03	1,0	16
Cefditoren MIC50	≤0,015	0,12	0,5
Cefditoren MIC90	0,03	0,25	1,0

MIC 50: a törzsek 50%-ának MIC értéke

MIC 90: a törzsek 90%-nak MIC értéke

10. táblázat A vizsgált penicillin érzékeny, mérsékelten érzékeny és rezisztens törzsek penicillin és cefditoren MIC értékei

Vizsgálataink alapján az új, orálisan alkalmazható 3. generációs cefalosporin mért MIC értékei hasonló értékeket mutattak a penicillinre érzékeny és a mérsékelten érzékeny törzsekével, viszont a cefditorennel jóval alacsonyabb MIC értékeket kaptunk a penicillin rezisztens törzseknél. A legmagasabb cefditoren MIC értéket – 2 mg/l-t - két törzsnél mértük. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a cefditoren a magas penicillin rezisztenciával rendelkező *S. pneumoniae* törzsek esetében is hatékony antibiotikum lehet.

(3. közlemény)

2. A cysticus fibrosisos betegek mintáiból izolált *Pseudomonas aeruginosa* törzsek vizsgálata során kapott eredményeink

A Szegedi Gyermekkórház Cysticus Fibrosis Ambulanciáján kezelt betegek alsó és felső légúti mintáiból izolált potenciális patogén baktériumok megjelenését és folyamatos jelenlétét vizsgáltuk és elemeztük 1999. július és 2001. június között. A

kolonizáló baktériumok species szerinti és betegcsoportonkénti megoszlását mutatja be a 11. táblázat.

Kolonizáló baktérium	1999	2000	2001
P. aeruginosa	7	6	7
S. aureus	5	5	6
P. aeruginosa + *S. aureus*	1	2	1
S. aureus + *H. influenzae*	1	0	0
H. influenzae + *Enterobacteriaceae*	2	0	0
P. aeruginosa + *Candida* spp.	1	0	0
Burkholderia cepacia	0	1	0
Egyéb törzsek*	0	5	5
Nem kolonizált	7	5	3
Összes beteg	24	24	22

**K. pneumoniae, E. coli, Enterobacter* spp*, Stenotrophomonas maltophilia, Aeromonas* spp.

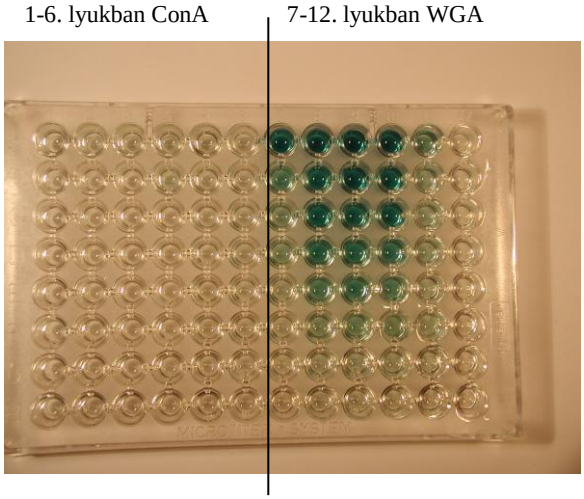
11. táblázat A CF ambulancián gondozott betegek légútjait kolonizáló/fertőző baktériumok megoszlása a vizsgált években

A vizsgált időszakban a CF-es betegek légútjaiban legnagyobb arányban *P. aeruginosa* tenyészett ki egyedül vagy más patogénnel (1999-ben a betegek 38%-ánál, 2000-ben 33%-ánál, 2001-ben 36%-ánál), ami a folyamatos kolonizációt, infekciós tünetek esetén a legvalószínűbb kórokozót jelentette. A törzsek túlnyomórészt mucoid telepeket képeztek, amelyet azonban csak 48-72 órai inkubálás után lehetett jól detektálni. Azért, hogy kellő időt biztosítsunk a mucoid jelleg kifejlődésére, a betegektől származó minták primokultúráit 48 óráig tenyésztettük.

(4. közlemény)

A 8. ábrán a *P. aeruginosa* törzsek biofilm termelésének mérésére alkalmas szignálrendszer beállítására végzett kísérletet mutatjuk be. Az alkalmazott ELLA módszerrel igen egyszerű módon mérhető a bakteriális biofilm termelés. Ez a technika könnyen reprodukálható, nem igényeli a baktériumok felszínről történő leválasztását és

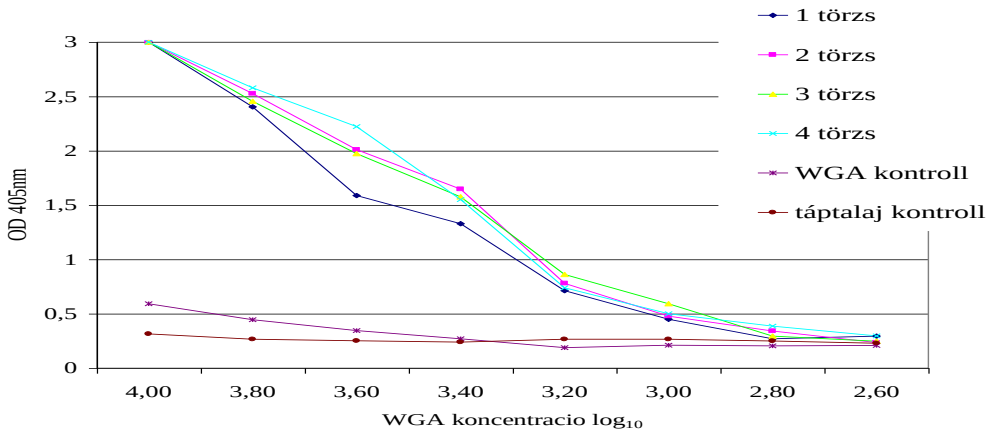
az extracelluláris polimerek extrakcióját, szolubilizációját sem. A kísérletben négy mukoid *P. aeruginosa* törzset és egy kontroll törzset vizsgáltunk, a 6. ill. a 12. sor baktérium mentes tápfolyadékot tartalmazott. A létrejött zöld színreakcióból jól látható, hogy a mucoid *P. aeruginosa* törzsek biofilm termelésének detektálására csak a WGA alkalmas, ami azt igazolja, hogy a pseudomonasok által termelt biofilm jelentős mennyiségben tartalmaz N-acetyl-D-glükózamint, amelyhez a WGA specifikusan kötődik. A biofilm termelést a különböző inkubálási körülményeket vizsgálva a legnagyobb mértékűnek akkor találtuk, amikor a törzseket három napig szobahőmérsékleten inkubáltuk.



1-4. ill. 7-10. lyukakban CF-es mukoid *P. aeruginosa* izolátumok, 5. ill. 11. lyukban *P. aeruginosa* ATCC 27853, 6. ill. 12. lyuk baktériummentes tápfolyadék

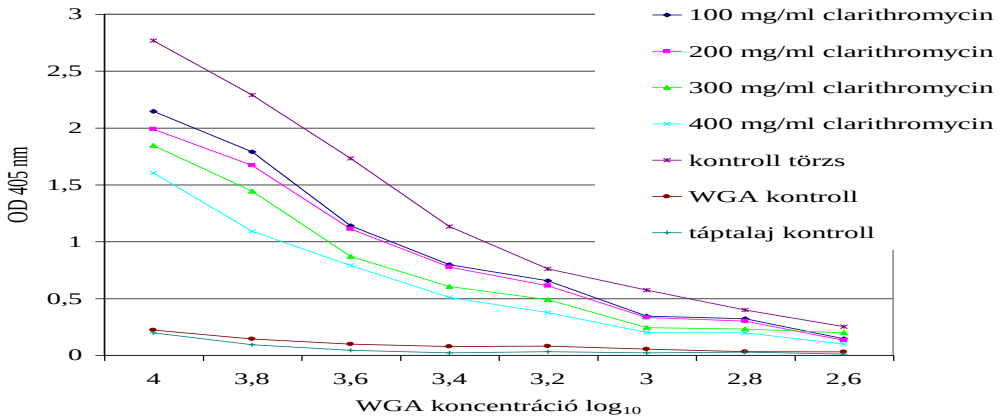
8. ábra Mikrotitráló lemezben végzett biofilm termelés detektálása ConA és WGA alkalmazásával.

A 9. ábrán a vizsgált négy mucoid *P. aeruginosa* törzs biofilm termelés mérésének grafikusan ábrázolt eredményét mutatjuk be. Az ELLA módszerrel végzett vizsgálat során a kromogén szubsztrát optikai denzitás (OD 405 nm) értékeit ábrázoltuk a WGA koncentráció 10-es alapú logaritmusának függvényében.



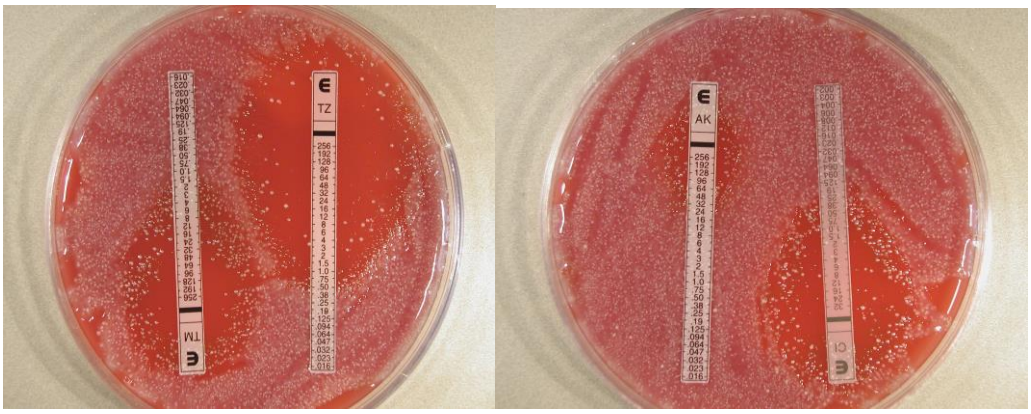
9.ábra Mukoid *P. aeruginosa* törzsek biofilm termelésének kimutatása ELLA módszerrel.

A fenti módon beállított mérési rendszerrel vizsgáltuk a makrolid antibiotikumok közül a clarithromycinnek a biofilm termelésre kifejtett hatását. A clarithromycint a biofilm termelés inkubációs ideje alatt minden nap friss oldat formájában adtuk különböző koncentrációban a tápfolyadékhoz. Az egyik vizsgált törzzsel kapott eredményeink a 10. ábrán láthatók. A méréseink azt igazolják, hogy az alkalmazott kísérleti rendszerrel jól detektálható a clarithromycin biofilm termelést gátló hatása a kontrollhoz viszonyítva.



10. ábra Mucoid *P. aeruginosa* törzs biofilm termelésének gátlása különböző koncentrációjú clarithromycinnel.

A CF-es betegek kezelésének megválasztásában a biofilm ellenes kiegészítő kezelés mellett nagyon fontos, hogy a légutakban megtelepedő, különböző klónokba tartozó, ezért esetleg különböző antibiotikum rezisztenciával rendelkező *P. aeruginosa* törzsek kimutatásra kerüljenek. Egy új tenyésztési és antibiotikum rezisztencia vizsgálati módszert vezettünk be az akut tünetekkel, romló légzési paraméterekkel, esetleg lázzal járó eseteknél a köpet bakteriológiai vizsgálatában. A mucolitikus kezelése után a köpet mintát közvetlenül plétoltuk véres agarra, erre antipseudomonas aktivitású antibiotikumot tartalmazó E-teszteket helyeztünk.



TM: tobramycin TZ: ceftazidim AK: amikacin CI: ciprofloxacin

11. ábra CF-es beteg köpetének direkt vizsgálata E-teszttel

A vizsgálat illusztrálására mutatjuk be a 11. ábrát. A bal oldali képen tobramycin és ceftazidim E-teszt, a jobb oldalon amikacin és ciprofloxacin E-teszt vizsgálat látható közvetlenül a köpet primokultúrán. A tobramycin E-teszt körül két különböző MIC értékű *P. aeruginosa*, egy rezisztensebb baktérium más telepmorfológiával, és néhány alfán hemolizáló streptococcus tenyészett. Más telepmorfológia látható a ceftazidim és a ciprofloxacin E-teszt mellett, amely telep az azonosítás során *S. maltophilia*-nak bizonyult. A hagyományos köpettenyésztés alkalmával a *P. aeruginosa* telepek túlnőtték a *S. maltophilia* telepeket, így azok jelenléte nem volt észrevehető. A két különböző

rezisztenciájú pseudomonas sem volt detektálható a hagyományos tenyésztési eljárás során, mert telepmorfológiájuk nem különbözött.

A kezdetben kísérletes céllal végzett, nem hagyományos bakteriológiai vizsgálat rutinszerűen bevezetésre került a laboratóriumunkban, mellyel segítjük a súlyos állapotú CF-es betegek hatékony antibiotikum kezelését.

3. Alsó légúti mintákból izolált ESBL termelő, *Enterobacteriaceae* családba tartozó Gram-negatív baktériumok előfordulása beteganyagunkban

Az SZTE ÁOK Belgyógyászati Intenzív Osztályán 1997. július és 1999. október között, a lélegeztetett betegek kórházi pneumóniáinak trachealeszívással és védett bronchoalveolaris lavage-al (védett BAL) vett mintáinak bakteriológiai tenyésztési eredményeit hasonlítottuk össze. A vizsgált időszakban 63 betegnél alakult ki kórházban szerzett pneumónia. A betegektől 95 védett BAL mintát vettek, 43 beteg 49 mintájából tenyésztettünk ki baktériumokat. 32 mintából egy, 17 mintából 2 különböző baktérium tenyészett ki, így a 43 kórházi pneumóniás beteg mintáiból összesen 66 kórokozót mutattunk ki. Az izolált baktériumok species szerinti megoszlását a 12. táblázat tartalmazza. Gram-negatív pálca a kitenyészett baktériumok 56%-a volt, ezen belül a Gram-negatív bélbaktériumok adták az esetek 65%-át. A vizsgált időszakban a kórházi pneumóniák kórokozói a *S. aureus* mellett legnagyobb arányban a Gram-negatív bélbaktériumok voltak.

Izolált törzsek	Esetszám
K. pneumoniae	11
E. coli	5
Enterobacter spp.	4
P. mirabilis	1
S. marcescens	1
Pseudomonas spp.	10
Egyéb nem fermentáló Gram-negatív pálca	2
H. influenzae, M. catarrhalis, S. pneumoniae	6
S. aureus	16
Egyéb streptococcusok	5
M. pneumoniae	1
Candida spp.	4
Összes izolált törzs	66

12. táblázat A kórházi pneumoniák kórokozói (1997. július-1999. október, SZTE ÁOK Bel ITO)

	Párhuzamosan vizsgált minták száma/beteg	Pozitív tenyésztési eredmények		
		VB$\geq 10^3$CFU/ml/ beteg	TR/ beteg	VB és TR azonos izolátum/beteg
Kórházi pneumonia	33/25	15/15	16/16	10/10

VB: védett BAL TR: tracheaváladék

13. táblázat Az SZTE ÁOK Belgyógyászati Intenzív Osztályán 1997. július 1999. október között kórházi pneumonia miatt kezelt betegek párhuzamosan vett alsó légúti mintáinak tenyésztési eredményei

	Párhuzamosan vizsgált minták száma/beteg	Pozitív tenyésztési eredmények		
		VB$\geq 10^3$CFU/ml/ beteg	HK/ beteg	VB és HK azonos izolátum/beteg
Kórházi pneumonia	40/28	16/15	7/7	4/4

VB: védett BAL HK: hemokultúra

14. táblázat Az SZTE ÁOK Belgyógyászati Intenzív Osztályán 1997. július 1999. október között kórházi pneumonia miatt kezelt betegek párhuzamosan vett védett BAL és hemokultúra mintáinak tenyésztési eredményei

Megvizsgáltuk, hogy a párhuzamosan vett védett BAL és trachea leszívással nyert minták, valamint a védett BAL és a párhuzamosan vett hemokultúra tenyésztések során izolált baktérium speciesek mennyiben voltak azonosak. 25 betegnél 33 esetben párhuzamosan vizsgáltunk tracheaváladékot és védett BAL mintát. A tracheaváladék és a védett BAL tenyésztések során kapott eredmények 66%-ban estek egybe (13. táblázat).

28 betegnél 40 esetben a védett BAL mintavétellel párhuzamosan hemokultúra vizsgálatokat is végeztünk. 7 beteg hemokultúrája volt pozitív, de csak 4 esetben egyezett meg a hemokultúrából és a védett BAL mintákból kitenyészett baktérium species és annak rezisztenciája. (14. táblázat).

(5. közlemény)

Az intézetünkben alsó légúti mintákból (köpet, trachea váladék, védett BAL) izolált Gram-negatív bélbaktériumok közül vizsgáltuk 2002-től 2005-ig az ESBL termelő törzsek előfordulását. A 15. táblázatban foglaltuk össze adatainkat.

Baktérium species	2002	2003	2004	2005
	Összes eset/ESBL+	Összes eset/ESBL+	Összes eset/ESBL+	Összes eset/ESBL+
K. pneumoniae	38/2	41/11	57/7	56/7
E. aerogenes	18/2	8/0	10/2	11/2
E. cloacae	15/4	21/5	22/4	19/7
S. marcescens	24/9	10/0	10/1	17/3
E. coli	26/0	42/2	41/0	41/0
Összes eset/ESBL+	121/17	123/18	140/17	144/19

15. táblázat Alsó légúti mintákból izolált Gram-negatív baktériumok és ESBL termelő baktériumok előfordulása a KMDI adatai között (2002-2005)

A vizsgált években nem változott jelentősen az ESBL termelő baktériumok előfordulási száma, de igen eltérő volt a speciesek megoszlása. 2002-ben *S. marcescens* okozta járványt detektáltunk az egyik gyermekosztályon, ahol 8 esetben alsó légúti

mintából tenyészett ki a baktérium. 2003-ban az ESBL termelő *K. pneumoniae* törzsek okozta infekciózus esetek száma volt a domináló. Négy esetben időben igen közel tenyészett ki az egyik sebészeti betegeket ellátó intenzív osztályon, míg 5 betegnél időben távoli esetekben izoláltuk a baktériumokat a belgyógyászati intenzív osztályon. 2004-ben 5 esetben volt kimutatható az ESBL termelő *K. pneumoniae* ugyanazon az osztályon, az esetek azonban időben távoliak voltak. 2005-ben sem térben sem időben összefüggést nem lehetett felfedezni az izolált ESBL termelő alsó légúti infekciót okozó Gram-negatív baktériumok között.

4. Az antibiotikum szinergizmus vizsgálataink eredményei Gram-negatív, légúti mintákból izolált törzsek esetén

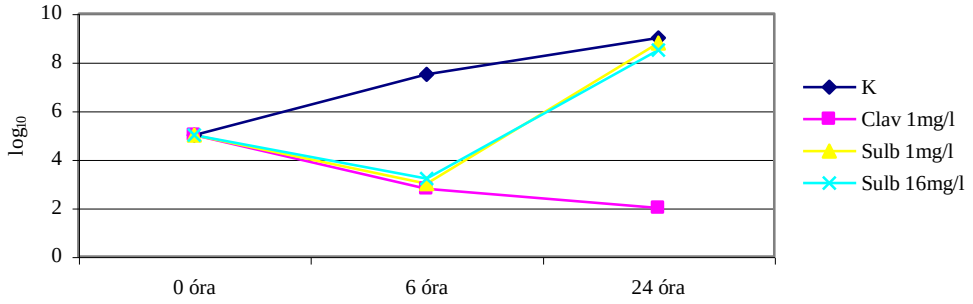
Munkánk során arra kerestük a választ, hogy az ismert, fix béta-laktám/béta-laktamáz gátló kombinációt tartalmazó antibiotikumok mellett az egyéb béta-laktám/béta-laktamáz gátlók szabad kombinálása milyen hatékonysággal alkalmazhatók a béta-laktamázt termelő Gram-negatív baktériumok esetében.

A rutin bakteriológiai vizsgálataink során - elsősorban légúti mintákból - 7 *E. coli* és 9 *K. pneumoniae* törzset izoláltunk, amelyeknél korongdiffúziós antibiotikum rezisztencia vizsgálattal szinergén hatást tapasztaltunk a cefoperazon és az amoxicillin/klavulánsav között. Mind a 16 törzs béta-laktamáz enzim termelőnek bizonyult. Az enzimek szubsztrát profilja meglehetősen hasonló volt, mindegyik enzim bontotta az ampicillint, cefalotint és a carbenicillint, 9 törzsből az izolált enzim bontotta a cefoperazont, 6 pedig a cefamandolt. Meghatároztuk a törzsek által termelt béta-laktamáz enzimek izoelektromos pontját. Az *E. coli* törzsekből izolált béta-laktamáz enzim izoelektromos pontja minden esetben pH:5,4, míg a *K. pneumoniae*-ból izolált

béta-laktamáz enzim izoelektromos pontja minden esetben pH:7,6 volt, ami azt igazolja, hogy a két species egymástól eltérő ESBL enzimet termelt.

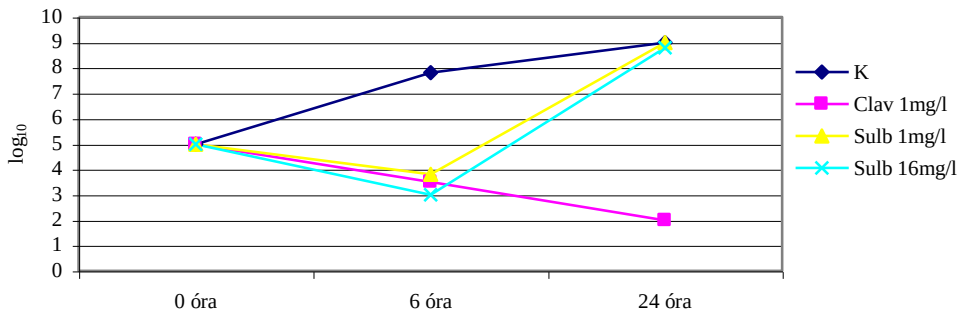
Vizsgálatunk célja az volt, hogy összehasonlítsuk a külön szubsztanciában rendelkezésünkre álló béta-laktamáz gátlók (szulbaktám és klavulánsav) cefoperazonnal való kombinációjának a hatását a fenti törzsekre. Kombinációs vizsgálatainkat chequerboard titrálással és killing-curve mószerrel végeztük. Mikroleves hígításos módszerrel meghatároztuk az egyes törzsek MIC értékeit cefoperazonra, szulbaktámra és klavulánsavra.

A killing curve kombinációs vizsgálatok során a cefoperazon 1xMIC és 2xMIC értékeinek megfelelő koncentrációkat, szulbaktámból 1 mg/l és 16 mg/l, klavulánsavból 1 mg/l koncentrációjú oldatokat készítettünk Mueller-Hinton levesben. 6 és 24 óra múlva csíraszámolást végeztünk minden tenyészetből, amelynek értékeit log_{10}-ben ábrázoltuk. Az eredmények demostrálására két törzzsel végzett vizsgálat eredményét mutatjuk be a 12. és 13. ábrán.



K: antibiotikum mentes növekedési kontroll
Clav 1 mg/l: cefoperazon 2xMIC + 1 mg/l klavulánsav
Sulb 1 mg/l: cefoperazon 2xMIC + 1 mg/l szulbaktám
Sulb 16 mg/l: cefoperazon 2xMIC + 16 mg/l szulbaktám

12.ábra A 212-es jelű *E. coli* törzzsel végzett killing curve kombinációs vizsgálat eredménye



K: antibiotikum mentes növekedési kontroll

Clav 1 mg/l: cefoperazon 2xMIC + 1 mg/l klavulánsav

Sulb 1 mg/l: cefoperazon 2xMIC + 1 mg/l szulbaktám

Sulb 16 mg/l: cefoperazon 2xMIC + 16 mg/l szulbaktám

13. ábra Az 587-es jelű *K. pneumoniae* törzzsel végzett killing curve kombinációs vizsgálat eredménye

A vizsgált 16 törzs esetében nem volt szignifikáns eltérés, ha a cefoperazon 1xMIC vagy 2xMIC koncentrációjával végeztük a killing-curve vizsgálatokat. Minden egyes vizsgált törzs esetében a 12. és 13. ábrának megfelelő eredményt kaptuk a cefoperazon és a két különböző béta-laktamáz gátlóval való kombináció alkalmazásával. Minden esetben a cefoperazon + 1 mg/l klavulánsav kombináció esetén a 24 órás tenyészet igen alacsony baktérium csíraszámot mutatott, ellentétben a szulbaktám 1, vagy 16 mg/l koncentráció alkalmazásával, ahol 24 óra után a tenyészetek feldúsultak az antibiotikummal nem kezelt kontroll tenyészet sűrűségére. Tehát a szulbaktámmal végzett kombináció csak átmeneti csíraszám csökkenést eredményezett.

A chequerboard titrálással végzett kombinációs vizsgálatok során kapott MIC értékekből kiszámoltuk a FIC értékeket. A 16. táblázatban mutatjuk be a kapott eredményeinket.

	Cefoperazon +	FIC index ≤0,5 szinergén	FIC 0,5< ≤1 additív	FIC 1< ≤2 indifferens	FIC >2 antagonista
E. coli	Klavulánsav	7	0	0	0
(7 törzs)	Szulbaktám	5	0	2	0
K. pneumoniae	Klavulánsav	9	0	0	0
(9 törzs)	Szulbaktám	4	5	0	0

16. táblázat A vizsgált 16 törzs esetén a különböző kombinációkkal kapott eredmények értékelése

Bár nem nagyszámú törzzsel végeztünk vizsgálatokat, mégis megállapíthatjuk, hogy a cefoperazon klavulánsavval kombinálva mindkét vizsgálati módszer esetén 24 óráig hatékonyan gátolta a törzs béta-laktamáz enzimének termelését, míg a szulbaktám kisebb, vagy nagyobb koncentrációban is csak átmenetileg potencírozta a cefoperazon hatását.

(6. közlemény)

A következőkben 110 intenzív osztályon lélegeztetett beteg alsó légúti mintáiból izolált *Pseudomonas* spp-t vontunk be a vizsgálatainkba, és arra kívántunk adatokat gyűjteni, hogy az alsó légúti infekciókban egyébként jól alkalmazható antibiotikumokra rezisztens *Pseudomonas* spp.-nél hatékony antibiotikum kombinációkat tudunk-e meghatározni. A törzseknél E teszttel állapítottuk meg a ciprofloxacin, piperacillin, imipenem, ceftazidim, amikacin és a tobramycin MIC értékeket. Ugyancsak E-teszttel végeztük el az antibiotikum kombinációs vizsgálatokat. Eredményeinket a 17. táblázatban foglaltuk össze.

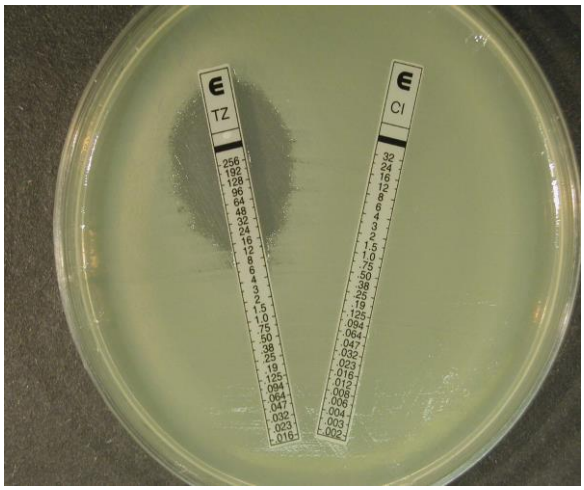
Antibiotikum kombinációk	Izolátumok száma (%)			
	FIC index ≤0,5 szinergén	FIC >0,5≤1 additív	FIC >1≤2 indifferens	FIC >2 antagonista
Piperacillin/ciprofloxacin	10 (9,1)	26 (23,6)	74 (67,3)	0
Imipenem/ciprofloxacin	9 (8,2)	14 (13,7)	87 (76,4)	0
Ceftazidim/ciprofloxacin	15 (13,6)	26 (23,6)	69 (62,7)	0
Piperacillin/amikacin	25 (22,7)	45 (40,9)	40 (35,4)	0
Ceftazidim/amikacin	20 (18,0)	53 (48,2)	37 (33,6)	0
Imipenem/tobramycin	7 (6,4)	19 (17,3)	84 (76,4)	0
Összes vizsgálat (660)	86 (13)	183 (27,7)	391 (59,2)	0

17. táblázat 110 *Pseudomonas* spp. klinikai izolátumon végzett különböző antibiotikum kombinációk vizsgálatának eredménye E teszttel

A vizsgált törzsek esetében 40,7%-ban találtunk szinergén vagy additív hatást, melyek elsősorban az ismert szinergista antibiotikum kombinációkban (béta-laktám + aminoglikozid) voltak detektálhatók, de nem volt elhanyagolható a ciprofloxacin + béta laktám kombinációk együttes potencírozó hatása sem (8,2-23,6%). A vizsgált kombinációkban antagonista hatást nem detektáltunk.

A ciprofloxacinnal szembeni érzékenység különösen a pseudomonasok okozta nozokomiális alsó légúti infekciókban igen nagy jelentőségű, mivel a ciprofloxacin igen jó farmakológiai tulajdonságokkal rendelkezik a tüdőben létrejött infekciók kezelésben. A vizsgált 110 törzs között 30 ciprofloxacin rezisztens, ebből 26 multirezisztens (legalább 3 antipseudomonas antibiotikum csoportra rezisztens) *Pseudomonas* törzset találtunk. Ezen törzsek közül 10 esetben találtuk a ceftazidim/ciprofloxacin és a piperacillin/amikacin kombinációt szinergénnek, másik 7 törzs esetében a piperacillin/ciprofloxacin kombináció volt szinergista hatású a FIC index meghatározása alapján. További törzseknél imipenem/ciprofloxacin (5 törzs), ceftazidim/amikacin (5 törzs) és imipenem/tobramycin (2 törzs) szinergizmust találtunk. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a ciprofloxacin rezisztens törzseknél sokkal gyakrabban találtunk

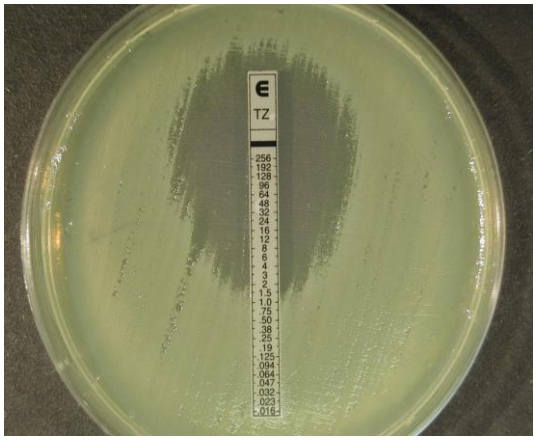
piperacillin/ciprofloxacin (23,3%), imipenem/ciprofloxacin (16,6%) és ceftazidim/ciprofloxacin (33%) szinergizmust, mint a ciprofloxacinra mérsékelten érzékeny, vagy az érzékeny törzsek között (piperacillin/ciprofloxacin 3,7% , imipenem/ciprofloxacin 5%, ceftazidim/ciprofloxacin 6,5%).

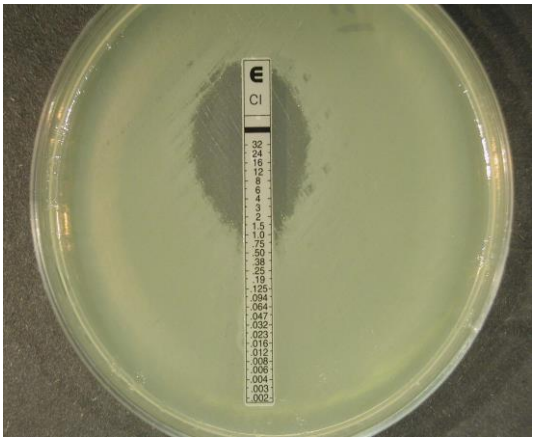


TZ: ceftazidim CI: ciprofloxacin

MIC A: ceftazidime 8 mg/l, MIC B: ciprofloxacin >32 mg/l

14. ábra E-teszttel vizsgált ceftazidim és ciprofloxacin MIC érték *P. aeruginosa* törzs esetén





TZ: ceftazidim CI: ciprofloxacin

a. MIC A (B): ceftazidim 1 mg/l b. MIC B (A): ciprofloxacin 1 mg/l

15. ábra Szinergén antibiotikum kombinációs vizsgálat E-teszttel *P.aeruginosa* törzs esetén

a. ciprofloxacin + ceftazidim b. ceftazidim + ciprofloxacin

A 15. ábrán a vizsgált *P. aeruginosa* törzs ceftazidim és ciprofloxacin E-teszttel végzett MIC érték meghatározását mutatjuk be. A 16. ábrán az E-teszttel végzett antibiotikum kombinációs vizsgálat eredménye látható. A bal oldali képen a vizsgálat első lépéseként a ciprofloxacin E-tesztet helyeztük fel, majd 30 perc után eltávolítottuk és ugyanarra a helyre a ceftazidimet raktuk. A jobb oldali ábrán a vizsgálat első lépéseként a ceftazidimet helyeztük fel, majd fél óra elteltével ciprofloxacinra cseréltük. Ezután a lemezeket 37°C-on inkubáltuk. A kapott MIC értékekből kiszámítottuk a FIC indexet. **(7. közlemény)**

5. A Gram-negatív bélbaktériumok béta-laktám típusú rezisztencia mechanizmusainak vizsgálatával kapott eredményeink

170 *K. pneumoniae,* 82 *E. cloacae* és 15 *S. marcescens* tözzsel végeztük a vizsgálatainkat. A 17. ábrán illusztráljuk az indukálható béta-laktamáz termelés, a 18. ábrán az ESBL termelés vizsgálatát korongdiffúziós módszerrel.

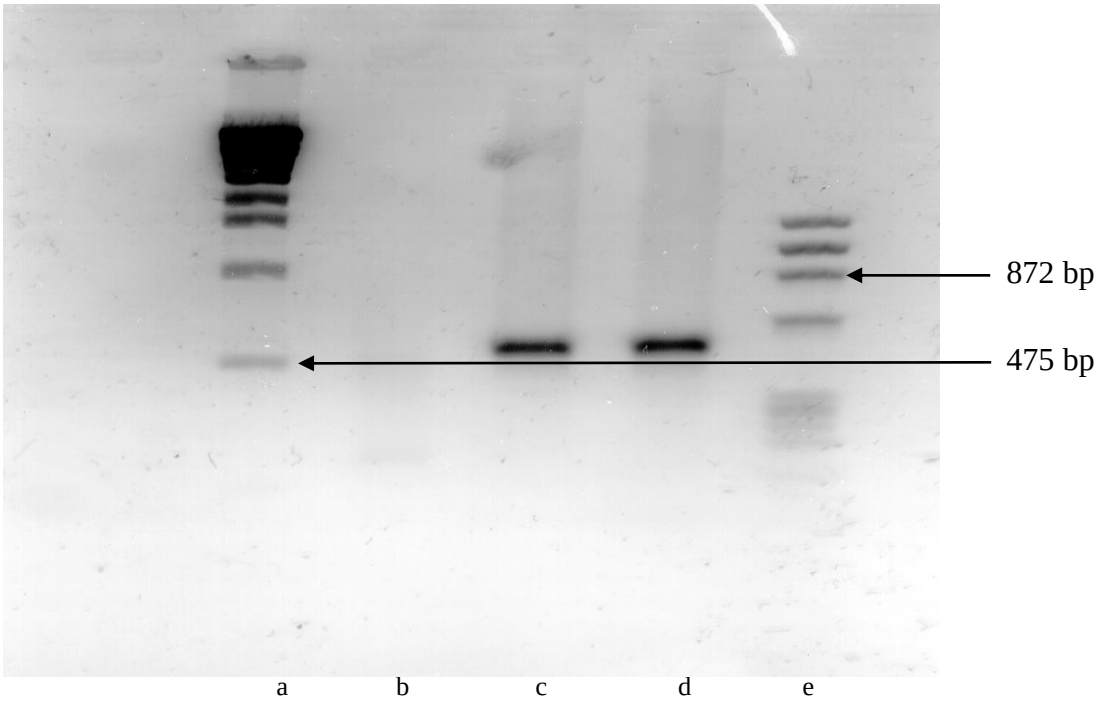
AMC: amoxicillin/klavulánsav – indukáló antibiotikum

CAZ: ceftazidim – indikátor antibiotikum

16. ábra Indukálható béta-laktamáz kimutatása korongdiffúziós módszerrel

17. ábra ESBL kimutatás 5 korong korongdiffúziós módszerrel

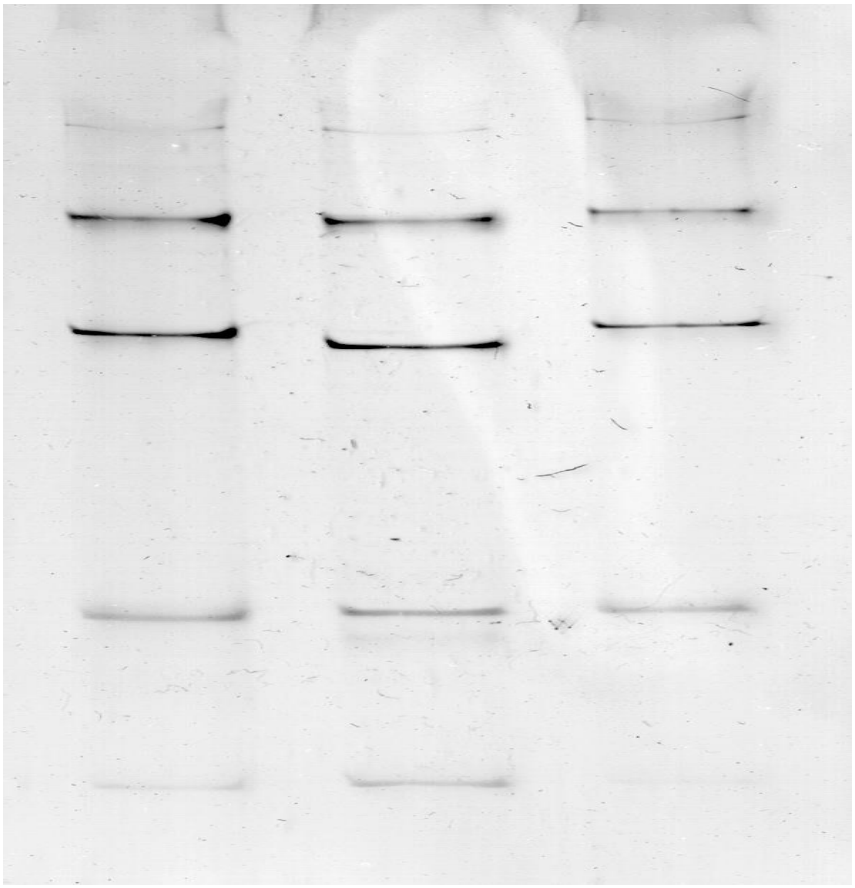
A 18. ábrán a 46-os számú *K. pneumoniae* törzs rezisztencia génjének SHV-specifikus PCR amplifikáció utáni agaróz gélelektoforézissel nyert képét mutatjuk be.



a. λ Sty I molekulasúly marker
b. TEM kontroll
c. SHV kontroll
d. *K. pneumoniae* 46
e. ϕX 174 Hae III molekulasúly marker

18. ábra. A *K. pneumoniae* 46 törzs rezisztencia génjének SHV-specifikus PCR termék agaróz gél elektroforézises képe

A törzsekből izolált DNS megfelelő szakaszát TEM és SHV specifikus primerrel amplifikáltuk, majd single-stranded conformational polymorfism (SSCP) analízissel határoztuk meg az SHV gének pontos típusát (SHV-2) *Pst* I enzimmel való hasítás után. A kapott termékeket polyacrylamid gélen különítettük el, melyet a 19. ábrán mutatunk be.



a. b. c.

a. SHV-2 kontroll
b. SHV-5 kontroll
c. *S. marcescens* 2. számú törzs

19. ábra. *S. marcescens* 2. számú törzs SHV gén analízise PCR-SSCP módszerrel

A vizsgált törzsekben detektált béta-laktamáz enzimek előfordulását a 18. táblázatban mutatjuk be.

Vizsgált törzsek (izolátumok száma összesen)	Kromoszómális béta-laktamáz		Plazmidon kódolt ESBL	
	Stabilan derepresszált	Indukálható	SHV-2	SHV-5
E. cloacae (82)	63	16	0	0
K. pneumoniae (170)	0	0	12	3
S. marcescens (15)	0	15	14	0

18. táblázat Különböző típusú béta-laktamáz enzimek előfordulása a vizsgált Gram-negatív törzseknél

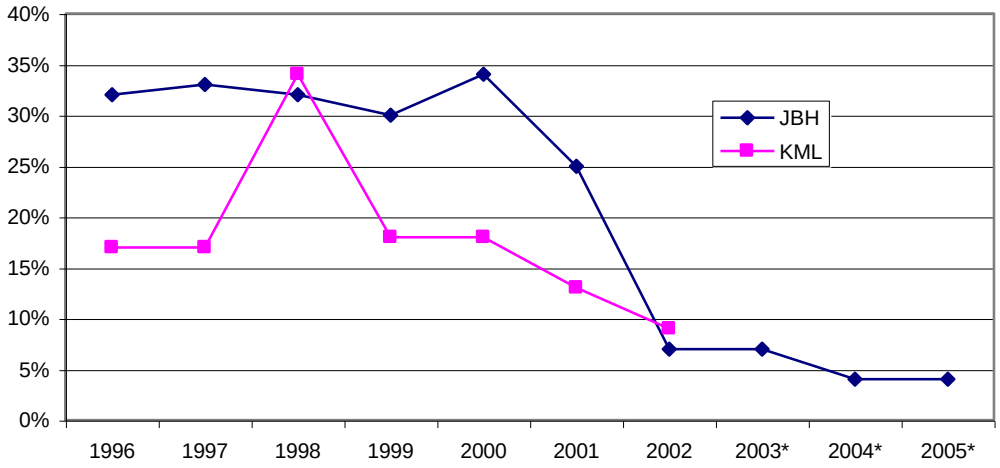
A vizsgált 267 klinikai izolátum közül 109 törzs (41%) hordozott valamilyen béta-laktamáz enzim gént. A nozokómiális járványból izolált 15 *S. marcescens* törzs (12 klinikai minta, 3 környezeti minta volt) közül 14 törzs kétféle rezisztencia génnel - kromoszómális indukálható béta laktamáz gén és SHV-2 ESBL gén - rendelkezett.

(8. közlemény)

Megbeszélés

1. *Streptococcus pneumoniae* törzsek vizsgálata

A mikrobiológiai vizsgálatok országos eredményeit összefoglaló, az Országos Közegészségtani Intézet, majd új nevén az Országos Epidemiológiai Központ (OEK) által kiadott „Fehér könyvek”-ben megjelenő (63), illetve a 1990-es években vizsgált, szűk betegcsoport adatait feldolgozó cikkek alapján (64, 65, 66) Magyarországról az a kép alakult ki, hogy igen magas a *S. pneumoniae* törzsek penicillin rezisztenciája.



20. ábra Az Országos Epidemiológiai Központ által a „Fehér könyvek”-ben közzéadott, a Járványügyi Bakteriológiai Hálózat (JBH) és a Kórházi-Egyetemi Mikrobiológiai Laboratóriumok (KML) éves adataiban a penicillin rezisztens *S. pneumoniae* törzsek %-os aránya. A *-al jelölt években az adatok már csak a monitor rendszerben jelentést beküldő laboratóriumok adatai szerepelnek.

A 20. ábrán mutatjuk be a „Fehér könyvek” által közölt adatokat, amelyek 2002-ig külön összegezték az ÁNTSZ és külön a kórházi laboratóriumok adatait. 1998 kivételével a kórházi laboratóriumokban jelentősen alacsonyabb volt a pneumococcusok penicillin rezisztencia aránya, amely nem függött össze az ellátási területtel, hiszen nagyon sok ÁNTSZ laboratórium kórházaknak is végzett mikrobiológiai vizsgálatot. Erről a nagyarányú különbségről első alkalommal 2001-ben „A leggyakoribb légúti patogén baktériumok előfordulása és rezisztencia változása beteganyagunkban (1995-

2000)” címmel számoltunk be Hajdúszoboszlón a VII. Antibiotikum Kongresszuson. A rezisztencia arányban való jelentős különbségek okát elsősorban a rezisztencia vizsgálat során alkalmazott metodika különbözőségében látjuk. Intézetünkben 1997 óta az invazív és nem invazív mintából izolált minden *S. pneumoniae* törzs antibiotikum rezisztencia vizsgálatát a nemzetközi ajánlásnak megfelelő módon végezzük. Abban az esetben, ha az 1 μg-os oxacillin korong körüli gátlási zóna nem éri el a 20 mm-t, minden esetben penicillin, amoxicillin és ceftriaxon MIC értéket határozunk meg E-teszttel. Így adataink a valós rezisztencia viszonyokat mutatják. Ismereteink szerint ezt a metodikát az országban nem mindenhol követték az E-teszt magas ára miatt, és csak a súlyos infekciókból származó törzseknél végeztek az ajánlás szerint MIC érték meghatározást. A rutin diagnosztikai munka során előfordult, hogy az oxacillinre rezisztens törzs (gátlási zóna $\leq$ 19 mm) penicillinre érzékenynek mutatkozott E-teszt vizsgálattal, ami felhívta a figyelmet az oxacillin korong hatóanyagának könnyen bomló voltára. Ezen tapasztalataink után az oxacillin korong tárolási körülményeire még gondosabban ügyelve (4°C, aktív nedvszívó közeg). 2002-től az OEK szakmai kampányának következtében az előző években tapasztalt közel 30%-os penicillin rezisztencia 10% alá csökkent (19. ábra).

Munkánk egyik célja az volt, hogy képet alkossunk az igen nagy számú mintát feldolgozó Intézetünkben izolált *S. pneumoniae* törzsek rezisztencia viszonyairól. Munkánk eredményeként megállapítottuk, hogy az SZTE ÁOK KMDI-ben izolált *S. pneumoniae* törzsek között a penicillin rezisztencia aránya jóval alacsonyabb a 2002 előtti országos adatoknál, gyermekek és felnőttek mintáiból izolált törzsek esetében, a járó- és a fekvő betegeknél egyaránt (63).

Az adatokat 1998-2005 között két időperiódusra bontottuk. 1998-2001-ig (I. periódus) laboratóriumukban csak az egyetem klinikáinak fekvő és járóbeteg ellátó egységeiből

érkezett mintákat vizsgáltuk, míg a 2002-2005-ig tartó időszakban (II. periódus) jelentősen emelkedett az alapellátásból érkezett vizsgálati anyagok száma, és az eddig önálló, városi alapellátást végző gyermekkórházat is az egyetem klinikájához csatolták. A háziorvosok mintabeküldési szokásait javítja, hogy intézetünk korszerű mintavevővel látja el őket, amelyek alkalmazásával a gyógyításban jól használható eredményeket tudunk számukra szolgáltatni. A II. periódusban jóval alacsonyabb volt a *S. pneumoniae* törzsek penicillin rezisztencia aránya, s ezzel választ kaptunk arra, hogy a vizsgálatot beküldők ellátási szintjének változása befolyásolta a pneumococcusok antibiotikum rezisztenciájának előfordulási arányát. Bishai tanulmányában hangsúlyozza, hogy a penicillin rezisztens pneumococcusok előfordulása sokkal nagyobb arányú az orvosegyetemi központok laboratóriumaiban, mint az alapellátásban kezelt betegek mintáit vizsgáló laboratóriumokban (szélsőséges életkorok, nagyobb arányú antibiotikum alkalmazás, krónikus betegellátás) (67). A mi elemzésünkben is azt találtuk, hogy amíg csak az egyetemi intézményekből származó minták *S. pneumoniae* izolátumainak a rezisztencia arányát vizsgáltuk, addig a penicillin rezisztencia arány magasabb volt, mint amikor a minták egyre növekvő száma az alapellátásból, vagy ahhoz közeli ellátási szintről érkeztek.

A penicillin rezisztens *S. pneumoniae* törzsek előfordulása jelentősen különbözik az egyes európai országokban. Egyre emelkedő tendenciát mutat Franciaországban, Spanyolországban, Portugáliában, a Közép-Európai országokban, így a Szlovák Köztársaságban, Romániában, Bulgáriában, viszont továbbra is alacsony a rezisztencia Ausztriában, Németországban, Lengyelországban és a Cseh Köztársaságban (68, 69, 70, 71). Ez az antibiotikum alkalmazásában, az antibiotikum politikában való különbségekkel magyarázható (70, 72, 73, 74).

A KMDI-ben izolált pneumococcus törzsek penicillin rezisztenciájának mértéke jelentősen nem tér el az olaszországi, az ausztriai, a belga, a portugál, a németországi és a svájci adatoktól, viszont jóval alacsonyabb, mint Franciaországban, Spanyolországban, az USA-ban és Latin-Amerika országaiban (1, 17, 21, 75, 76,77). A laboratóriumunkban izolált pneumococcusok rezisztencia adataival megegyezik az European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) által közölt 2004-es adat is, amely a Magyarországon invazív infekciókból izolált 143 *S. pneumoniae* törzs között a penicillin rezisztenciát 1% alattinak, a penicillinre mérsékelten érzékeny arányt pedig 15%-nak találta (78).

A spanyol Oteo és mtsa. a 14 év alatti gyermekek invazív mintáiból izolált penicillinre nem érzékeny *S. pneumoniae* törzsek arányának csökkenéséről számol be. Adataik alapján 2001 és 2003 között a fenti korcsoportban a penicillinre nem érzékeny (rezisztens és mérsékelten érzékeny) törzsek aránya 69.4%-ról 41.2%-ra csökkent, melyet a csökkenő antibiotikum fogyasztással magyaráznak (79). Demachy és mtsa. hasonló rezisztencia arány csökkenést írnak le a penicillin rezisztens *S. pneumoniae* törzsek esetében Franciaországban, melynek okát nem elemzik (79). A mi esetünkben a penicillin rezisztens *S. pneumoniae* törzsek arányának csökkenése különösen kimagasló a 0-2 éves korcsoportban, mind a fekvő-, mind a járóbetegek esetében, és kisebb mértékben jelentkezik a 3-14 éves korcsoportban. Ez a két korcsoport reprezentálja leginkább azt a változást, amely a mintát beküldők betegellátási területében következett be.

A vizsgálati minták megoszlása, amelyekből a *S. pneumoniae* törzseket izoláltuk, azt mutatja, hogy a felnőttek esetében többnyire klinikailag releváns helyről tenyésztek ki a pneumococcus törzsek, míg a gyermekek esetében, bár infekciós tüneteket mutattak,

mégsem lehet egyértelműen kizárni, hogy az izolált törzsek csak kolonizáló flóraként voltak jelen a felső légutakban.

Adataink alapján az antibiotikum fogyás a vizsgált 8 év alatt hasonló volt Csongrád megyében és országosan a vizsgált béta-laktám és makrolid antibiotikum csoportok esetében. 1999-ben mind az országosan mind a megyei antibiotikum fogyás kiemelkedő volt, amelyet az akkor zajló influenzajárvánnyal magyarázunk (81). Összefüggés az antibiotikum fogyás és a *S. pneumoniae* törzsek penicillin és erythromycin/clindamycin rezisztenciájának előfordulási aránya között nem mutatható ki.

A KMDI-ben izolált törzsek jóval nagyobb aránya származott gyermekektől, ami a *S. pneumoniae* okozta infekciók gyermekkorban való előfordulásának nagyobb gyakoriságát mutatja. Ez egyezik a Nagai és mtsa. által közöltekkel (69). A gyermekek mintáiból izolált törzsek kevésbé voltak penicillinre érzékenyek, mint a felnőttek mintáiból kitenyészettek, amely egybeesik az USA-ban végzett két éves, igen nagy esetszámot feldolgozó PROTECT US study adataival, amelyben a 0-2 éveseknél 48,3%-a, a 3-14 éves korcsoportban 60,8%-a, míg a 15 évnél idősebbeknél közel 70%-a volt az izolált törzseknek penicillin érzékeny (77). A saját adataink szerint 1999-től a 14 év alattiak mintáiból izolált pneumococcusok penicillin érzékenysége 50% körüli, jelentős változást nem mutat az egyes években, míg a felnőttek mintáiból izolált törzseknél ez az arány 90-60% között mozog az évenkénti vizsgálatok során.

Az 1990-es években közölt magyarországi adatok speciális betegpopulációban előforduló *S. pneumoniae* törzsek rezisztencia adatait ismertetik, amelyekben jóval magasabb a penicillin rezisztencia előfordulása, mint a saját vizsgálatainkban (22, 63, 65, 66). Az újabb közlemények nagyobb esetszámot elemeznek, a vizsgált törzsek

Magyarország több földrajzi területét reprezentálják, amelyekben a mi adatainkhoz hasonlóan igen alacsony a penicillin rezisztens törzsek aránya (82, 24).

A KMDI-ben izolált és szerotipizált 57 törzs közül mindössze két törzs (3,5%) volt penicillinre rezisztens, egy a 6-os, egy a 19-es szerocsoportba tartozott. A 21, 2 éves, vagy annál fiatalabb gyermekek mintáiból izolált pneumococcus törzs szerotipizálása során a törzsek szerotípusa 95%-ban megegyezett a vakcinában lévő 7 pneumococcus szerotípusával (7PCV). Egy Izraelben 2001-ben végzett felmérés szerint az 5 év alatti gyermekeknél nazalis kolonizációt okozó *S. pneumoniae* törzsek 53,1%-a egyezett a konjugált vaccina által védettséget eredményező törzsekkel, míg egy belga tanulmányban ez az arány 73,7% (83, 84). Egy 2003-ban Skóciában végzett felmérésben az 5 évnél fiatalabb gyermekek invazív pneumococcus fertőzését okozó törzsek 73%-a felelt meg a 7 valens konjugált pneumococcus vakcina törzseinek.(85). A CDC 2005-ben megjelent adatai szerint az USA-ban 69%-ban előzhető meg az invazív pneumococcus infekció a 7PCV-vel (86). A KMDI-ben izolált, két évnél idősebbek mintáiból származó pneumococcusok szerotípusa 97%-ban egyezett meg a 23 pneumococcus tokantigénjét tartalmazó poliszacharid vakcinában található törzsek szerotípusával. Pásztor által közölt hazai felmérésben a vizsgált 44 invazív törzs 82%-a tartozott a 23 valens vakcina törzsei közé (23). Egy kuwaiti tanulmányban, ahol 122 penicillin rezisztens pneumococcus izolátumot vizsgáltak, ez az arány 63% volt (87). Az általunk vizsgált törzsek száma alacsony, de random módon válogatott volt, ezért a védőoltás szerotípusaival való nagyfokú egyezés mindenképpen a várható magas hatékonyságra enged következtetni.

A szegedi óvodások körében végzett felmérésünk eredményét összehasonlítottuk egy izraeli és egy belga felméréssel. Mindkét tanulmány közösségbe járó gyermekek nazalis kolonizációját vizsgálta. A vizsgált 195 szegedi gyermek *S. pneumoniae*

hordozásával szemben, amely 33%-os volt, az izraeli tanulmány 404 gyermeket vizsgáló felmérésében a hordozás 53%, míg a belga tanulmány 467 vizsgált gyermeknél 21%-os hordozást talált (78, 84). Eredményeink így átlagosnak mondhatók.

A tünetmentesen hordozott *S. pneumoniae* törzsek között 3% (1 eset) volt rezisztens penicillinre, amoxicillinre és mérsékelten érzékeny ceftriaxonra, 9% (3 eset) nem volt érzékeny amoxicillinre (rezisztens és mérsékelten érzékeny együtt), de az esetek kis száma miatt a %-os értékelés nem alkalmazható. Az orosz Stratchounski és mtsa. nagy esetszámot vizsgálva (4153 gyermek 2056 izolált törzs) 2,5%-ban találta a hordozott pneumococcusokat penicillinre rezisztensnek, 16,8%-ban mérsékelten érzékenynek (88), míg Mühlemann és mtsa. (Svájc) 2838 5 év alatti gyermek nasopharyngeális mintájából izolált 1477 pneumococcus törzs esetén 20,1% penicillinre nem érzékeny törzset (rezisztens és mérsékelten érzékeny együtt) talált (89). Figyelemre méltó, hogy a saját vizsgálatainkban a belvárosi óvodába járó, feltehetően jobb szociális hátterű gyermekek kisebb arányban hordoztak *S. pneumoniae*-t, mint a külvárosi óvodások (11% ill. 29%), de a kevésbé érzékeny törzsek aránya jóval magasabb volt a belvárosi óvodába járó gyermekek esetében.

A penicillinre mérsékelten érzékeny törzsek esetében az antibiotikum kezelés egyik jól alkalmazható formája a 3. generációs per os adható cefalosporinok családja. Vizsgálataink szerint a penicillinre rezisztens *S. pneumoniae* törzsek cefditoren MIC értéke igen alacsony volt, így eredménnyel lenne alkalmazható felső és alsó légúti infekciókban olyan esetekben, amikor a beteg állapota lehetővé teszi a per os kezelést (90, 91).

2. A cysticus fibrosisos betegek mintáiból izolált *Pseudomonas aeruginosa* törzsek vizsgálata

A Szegedi Gyermekkórház Cysticus Fibrosis Ambulanciáján gondozásban lévő betegek légútjainak potenciálisan patogén baktériumokkal való kolonizációját vizsgáltuk három éven keresztül (1999-2001) 24 beteg esetében. A *P. aeruginosa*-val kolonizált, vagy a baktérium okozta infekció a betegek kevesebb, mint 40%-nál volt kimutatható. A vizsgált időszakban két beteget veszítettünk el (8%). A *P. aeruginosa*-al való kolonizáció arány elmarad a Quintas és mtsa. által közölt adatoktól, akik 1995-1999 között 78 CF-es beteget követtek. Az ő adataik szerint a betegek 44-59%-ban voltak kolonizálva *P. aeruginosa*-val (92). Hudson és munkatársai hasonló esetszámú (81) CF-es beteg kezdeti oropharyngealis kolonizációját vizsgálták, majd elemezték a betegek 10 éves túlélését. A betegek 16%-ának légútjai voltak kolonizálva a gondozásba vételkor, akiknek a 10 éves túlélése jelentősen elmaradt a nem kolonizáltakétól (57 ill. 100%) (93). A saját vizsgálataink eredményeként elmondhatjuk, hogy az általunk követett CF-es betegek pseudomonasokkal való kolonizáltsági aránya a fenti tanulmányokkal összevetve közepes mértékűnek mondható.

Az alginát képzés miatt mucoid telepeket alkotó *P. aeruginosa* okozta infekció kezelése gyakran jár terápiás kudarccal, mert annak ellenére, hogy a baktérium planktonikus állapotban mért antibiotikum érzékenysége alapján választják a hatékonynak ítélt antibiotikumot, az mégis hatástalan lehet a nyálkaburokba ágyazott baktériummal szemben. A kezelés hatékonyságának egyik feltétele az alginát képzés visszaszorítása. Kísérletekkel igazolták, hogy egyes makrolid antibiotikumok hatékonyan csökkentik a mucoid törzsek alginát képzését, így anélkül segítik a baktérium elpusztítását, hogy közvetlenül bakteriosztatikus, vagy baktericid hatást fejtenének ki (38, 94).

Kísérleteinkben CF-es betegek légúti mintáiból izolált, vizuálisan biofilm termelő *P. aeruginosa* törzsek biofilm termelését mértük Leriche módszerével, amelyet *P. aeruginosa* által termelt biofilm kimutatására optimalizáltunk (60). A módszert a továbbiakban a biofilm termelés gátlásának kimutatására alkalmaztuk. A rendszerhez különböző koncentrációban clarithromycint adtunk, majd mértük a képződött biofilm mennyiségét. A 405 nm-en mért optikai denzitás (OD), amely a biofilm mennyiségével arányos, a kontroll törzs biofilm termelésének mérésekor kapott 3 OD-ről lecsökkent 2,2-re 100 mg/ml clarithromycin, valamint 1,6 OD-re 400 mg/ml clarithromycin tartalmú oldattal való inkubálás esetén. Yanagihara és mtsa. egér modellen vizsgálták a clarithromycin hatását úgy, hogy baktérium biofilmet képeztek műanyag csőre, amelyet behelyeztek az egerek főhörgőibe. Ezután clarithromycin kezelésben részesítették az állatokat, majd vizsgálták scanning elektronmikroszkóppal a biofilm vastagságát és a biofilmbe ágyazott baktériumok mennyiségét a kezeletlen egerekből eltávolított műanyag csövekhez képest. A csövek felszínén található baktérium mennyisége nagyságrenddel alacsonyabb volt a clarithromycinnel kezelt esetekben, mint a kezeletlenekben, amellyel, bár más módszerrel, de ugyanúgy igazolták a clarithromycin biofilm termelést gátló hatását (95). A CF-es és a diffúz panbronchiolotises betegekben, amely felnőtteknél jelentkező, klinikailag nagymértékben hasonló kórkép, mint a cysticus fibrosis, a hosszan tartó makrolid adás nem csak a biofilm termelést csökkenti, hanem igazolták immunmoduláló hatását, a *P. aeruginosa* baktériumoknak az epitheliális sejtekhez való kötődésének és a pilusokkal történő mozgás gátlását is, amelyek hatására csökken a baktérium virulenciája (30, 38, 67,96, 97, 98, 99, 100).

A CF-es betegek életminőségét és életkilátásait nagyban meghatározza a légútjainak baktériumokkal való kolonizáltsági állapota. A pseudomonasok, staphylococcusok és más, antibiotikumokra rezisztens baktérium törzsek megjelenése

romló fizikai állapottal társulva a betegség gyors progresszióját vonja maga után. Fontos emiatt ezeknek a betegeknek a folyamatos monitorozása a baktérium-hordozás detektálása miatt. A légzésfunkció romlása időszakonként ismételt antibiotikum kúrával késleltethető, amelyet olyan antibiotikummal célszerű végezni, amely a kolonizáló flóra ellen hatékony, de nem öli ki a védő normál baktériumflóra tagjait. A légúti mintában jelen lévő összes baktérium együttes antibiotikum érzékenységi vizsgálata E-teszttel a legoptimálisabb antibiotikum kiválasztásában nyújt segítséget. A vizsgálat kivitelezése egyszerű, gyors, az eredmény jól értékelhető.

3. Alsó légúti mintákból izolált ESBL termelő Gram-negatív baktériumok előfordulása beteganyagunkban

A kórházi eredetű pneumónia kórokozójának a meghatározásához olyan mintavételi eljárást kell alkalmazni, amely biztosítja, hogy a minta valóban az alsó légutakból származott. Erre kiválóan alkalmas a kettős falú katéter, amely segítségével a felső légutak kontamináló hatását kikerülve lehet mintát venni. Az így nyert minta Gram-festett kenetében a granulocyták jelenléte még inkább igazolja azt, hogy a minta a gyulladásos területről származik. A csíraszámolással végzett mintafeldolgozás segíti a kitenyészett baktérium kórokozó szerepének a megítélését. Elfogadható eredményt ad a tracheaváladék tenyésztése abban az esetben, ha a Gram-festett kenetben sok granulocyta látható, és a kvantitatív mintafeldolgozás során a kitenyészett baktériumok $\geq 10^5$ CFU/ml számban vannak jelen. A nozokómiális pneumónia, különösen a lélegeztetett betegben fellépő pneumónia kórokozójának megállapítására nem rendelkezünk ún. „gold standard” mintavételi technikával, ezzel magyarázható a különböző mintavételi módszerekkel vett minták eredményeinek értékeléséről megjelent cikkek sokasága. Számos szerző az invazív módon vett és quantitativ mikrobiológiai

feldolgozás során kapott eredmények jó használhatóságát hangsúlyozza, különösen a multirezisztens baktériumok által okozott kórházi pneumóniák valódi kórokozójának meghatározásában. Ebben a kórképben a hemokultúra vizsgálatok kevésbé segítik a nozokómiális patogén azonosítását, mert gyakori a nem légúti eredetű bakteriaemia párhuzamos fennállása is (101, 102, 103, 104).

A kórházban szerzett pneumóniák kórokozói gyakran multirezisztens baktériumok. Ezek nem csak azért veszélyesek, mert könnyen átkerülhetnek egyik betegről a másikra, hanem a plazmidon hordozott rezisztencia gént a betegben jelen lévő egyéb baktériumoknak is átadhatják. Ezért fontos a betegek mintáiból izolált baktériumokban jelen lévő rezisztencia mechanizmusokat vizsgálni. Intézetünkben az alsó légúti mintákból izolált ESBL termelő Gram-negatív pálcák előfordulását elemeztük. Megállapítottuk, hogy az esetek száma a vizsgált négy évben nem változott jelentősen, de évenként változtak az ESBL-t termelő baktérium speciesek. Az amerikai National Nosocomial Infections Surveillance System (NNIS) 1986-2003-ig gyűjtött és elemzett adatai szerint a kórházi pneumóniák kórokozói 28-35%-ban az *Enterobacteriaceae* családba tartozó Gram-negatív baktériumok. Míg 1989-ig csak néhány % volt az ESBL termelő törzsek aránya, addig 1990-től hirtelen növekedés volt észlelhető, és az arány azóta 20-25% között mozog (105). Saját adatainkban az esetszámok nem túl nagyok, de az ESBL termelés előfordulási aránya nem éri el az amerikai adatokat; 12-15% között változik a különböző években.

4. Az antibiotikum szinergizmus vizsgálataink Gram-negatív, légúti mintákból izolált törzsek eseteiben

Az antibiotikum kombináció alkalmazásának indikációja a vegyes aerob/anaerob fertőzés fennállása és a súlyos, életet veszélyeztető infekciók empírikus, vagy célzott

kezelése. Kombinált antibiotikumok alkalmazhatók egyrészt, mint fix, már a gyógyszergyárban előállított antibiotikumok, mint pl. az amoxicillin/klavulánsav, ampicillin/szulbaktám, piperacillin/tazobactam, amely kombinációk egyik komponense a baktériumok által termelt béta-laktamáz enzimeket gátolják, míg a másik komponens egy béta-laktám antibiotikum, mely sejtfal szintézis gátlás révén hatékony a baktériumok ellen. Másik típusú fix kombináció a trimethoprim/sulphamethoxazin, amelyben két kemoterápiás szer fokozza egymás hatását. Másrészt kombinálhatunk egyéb antibiotikumokat, amelyeknél az együttes adástól a különböző támadásponton való hatás összeadódását várjuk. Ilyen pl. a *Streptococcus pyogenes* okozta toxikus shock syndroma esetén alkalmazott penicillin és clindamycin adása, amikor a clindamycin a fehérje szintézis gátlása révén csökkenti a szuperantigén szintézist, míg a penicillin a baktérium sejtfalának felépülését gátolva pusztítja el a baktériumot.

Munkánk során abból a megfigyelésből indultunk ki, hogy a klinikai izolátumoknál a cefaperazon mellé rakott amoxicillin/klavulánsav korongnál a cefoperazon hatásának a fokozódását észleltük. Killing-curve és chequerboard titrálással a klavulánsav cefoperazonnal együtt hosszabban tartó és nagyobb mértékű antibakteriális hatást mutatott, mint amikor a cefoperazont szulbaktámmal kombináltuk. A cefoperazon/klavulánsav kombináció gyógyszer formájában nem jelent meg a piacon, vizsgálataink mégis azt igazolták, hogy igen jó hatékonysággal lehetne alkalmazni a Gram-negatív laktózt bontó pálcák okozta infekciók kezelésében. Vizsgálati eredményeinkhez hasonlóan ugyanezzel a kombinációval magas szinergén hatást találtak Crusby és mtsa. *Bacteroides* spp-en (106).

Míg a chequerboard titrálás és a killing-curve vizsgálat csak kísérletes körülmények között alkalmazható, hiszen mindkét esetben igen összetett és sok munkát igénylő módszerről van szó, addig az E-teszttel a napi rutinban könnyen kivitelezhető,

jól standardizált antibiotikum rezisztencia és szinergizmus vizsgálatokat tudunk végezni. Különösen fontos ez olyan esetekben, amikor számos antibiotikumot, vagy antibiotikum kombinációt kell megvizsgálni ahhoz, hogy hatékony antibiotikum terápiát találjunk az adott kórokozóval szemben. Ma már a speciális antibiotikum grádienst tartalmazó E-tesztek alkalmazásával lehetőség nyílik hatékony antibiotikum kombinációk keresésére *in vitro* körülmények között. A módszer egyszerűen kivitelezhető, 24 óra múlva eredményt ad. Az E-teszt ilyen módon való alkalmazását eddig nem közölték a szakirodalomban. Hasonló vizsgálatokat Bolstrom és munkatársai mutattak be a 16. International Congress and Chemotherapy-n (107).

5. A Gram-negatív baktériumok béta-laktamáz típusú rezisztencia mechanizmusainak vizsgálata

A bakteriális infekciók célzott antibiotikum kezelésének megválasztásakor ismernünk kell a kórokozók azon rezisztencia mechanizmusait, amelyek az egyes antibiotikumokkal szemben védik a baktériumokat. Gyakran az alkalmazott kezelés hatására indul meg, vagy fokozódik az antibiotikumot bontó enzimek termelése és válik eredménytelenné a terápia. A rutin mikrobiológiai laboratóriumban különböző, könnyen kivitelezhető technikák állnak rendelkezésre ezen rezisztenciák fenotípusos detektálására. A molekuláris biológiai módszerek a fenotípusos rezisztenciák genetikai hátterének a megismerését teszik lehetővé.

A Gram-negatív bélbaktériumok a béta-laktám antibiotikumokat kromoszómálisan vagy plazmidon kódolt béta-laktamáz enzimekkel képesek elbontani. Az indukálható és a stabilan derepresszált béta-laktamáz enzimet termelő törzsek esetében az enzim kromoszómán kódolt, klavulánsavval nem gátolható. Az *in vitro* vizsgálatok során az indukálható béta-laktamázt termelő törzs érzékenynek mutatkozik a 3. generációs

cefalosporinokra, de ha a beteget széles spektrumú cefalosporinnal kezelik, a béta-laktamáz enzim termelésének gátlása megszűnik és un. stabilan derepresszált, rezisztens mutánsok szaporodnak el, így a kezelés hatástalanná válik (108, 109). Az *E. cloacae* és a *P. aeruginosa* törzseknél kapcsolat van a kromoszómálisan kódolt Class C típusú indukálható és stabilan derepresszált béta-laktamáz enzim termelése között . A genetikai háttér az ampD gén mutációja, amelynek következtében fokozódik az ampC gén transcriptioja (110). A *Serratia* spp. és a *Morgalella* spp. törzsek szintén termelnek kromoszómálisan kódolt Class C típusú béta-laktamáz enzimeket, de ezeknél a törzseknél tízszer alacsonyabb a stabilan derepresszált mutánsok aránya, mint az előző törzsek esetében (111). A ceftazidim laboratóriumi vizsgálatok során jó indikátora a stabilan derepresszált mutánsok detektálásának. Vizsgálataink során a két centrumból származó *E. cloacae* törzsek 77%-a volt stabilan derepresszált béta-laktamáz termelő.

A 3. generációs cefalosporinokat az 1980-as években kezdték el nagyobb arányban alkalmazni a gyógyászatban. A plazmidon kódolt, ezáltal egyik baktériumról a másikra átvihető rezisztencia géneket a 80-as évek közepétől egyre nagyobb számban közöltek, amelyek elsősorban TEM és SHV csoportba tartoztak, hatásuk klavulánsavval gátolható. A 3. generációs cefalosporinokat is bontó enzimek a szélesspektrumú béta-laktamázok, amelyek elterjedtsége országonként, kórházanként és osztályonként is változó. Az USA NNIS adatai szerint 1986 és 2004 között az intenzív osztályokon kialakuló nozokómiális pneumóniák kórokozói közel 40%-ban az *Enterobacteriaceae* családba tartozó Gram-negatív baktériumok voltak. Az izolált *K. pneumoniae* törzsek között 1989-től ugrásszerűen megnőtt a 3. generációs cefalosporinokkal szembeni rezisztencia; 3-4%-ról 20-25%-ra (105, 112). Annak ellenére, hogy az ESBL enzimek nagy száma ismert, mégis csak néhány típusuk terjedt el nagyobb mértékben a világon. Az általunk vizsgált *K. pneumoniae* törzsek között az SHV-2 nagyobb arányban volt detektálható, mint az

egyébként a világon jobban elterjedt SHV-5 enzim. Sem az SHV-2, sem az SHV-5 enzim nem gátolható szulbaktámmal. Az általunk vizsgált 15 ESBL termelő törzs közül 12 volt érzékeny amoxicillin/klavulánsavra, míg csak 6 törzs piperacillin/tazobactamra. A vizsgálatainkba vont *S. marcescens* törzsek ismert nozokómiális patogének, amelyek között egyre elterjedtebbek a rezisztens klónok. A *S. marcescens* törzsekből ritkán lehet SHV típusú ESBL enzimet izolálni. A vizsgált 15 törzs (12 klinikai izolátum, 3 környezeti minta ugyanarról az osztályról) közül egy törzs mutatott eltérő tulajdonságot, a többi 14 törzs azonosnak mutatkozott. A 14 törzsben olyan SHV-2 ESBL enzim volt kimutatható, amely enzimet ugyanazon osztályról korábban izolált *K. pneumoniae* törzsből szintén izolálni lehetett. Nagy valószínűséggel a *S. marcescens* a vele együtt jelen lévő *K. pneumoniae* törzsből akvirálta az ESBL termelését meghatározó gént.

A rutin bakteriológiai vizsgálatok során nagy felelőssége van a laboratóriumnak a kórokozókban jelen lévő rezisztencia gének detektálásában, hiszen ezek meghatározzák a választott antibiotikum terápiás hatásosságát vagy hatástalanságát. Sok esetben egyetlen módszerrel nem lehet minden kétséget kizáróan detektálni a jelen lévő enzimet, vagy enzimeket. Ezért nagyon fontos különböző vizsgáló módszerek együttes alkalmazása. A rezisztencia meghatározáson túl, az epidemiológiai vizsgálatok elvégzéséhez, az egyes nozokómiális törzsek azonosságának megállapításához és a törzs terjedésének a feltérképezéséhez elengedhetetlenek a baktériumok genetikai tulajdonságainak különböző módszerekkel történő vizsgálata (107, 108, 109, 110, 111, 113, 114, 115).

Összefoglalás

1. Munkánk során elemeztük az Intézetünkben 1997-2005 között izolált *S. pneumoniae* törzsek rezisztencia adatait korcsoportonként, mintánként, járó- és fekvőbetegek szerint. A törzsek antibiotikum érzékenységét minden esetben a nemzetközi ajánlásoknak megfelelően határoztuk meg (NCCLS/CLSI). Megállapítottuk, hogy az izolált törzsek száma jelentősen emelkedett az évek során, s ezt elsősorban a gyermekektől származó törzsek számának emelkedése okozta. Az 1998-2005 között izolált 2670 *S. pneumoniae* törzs közül mindössze 5,58% volt penicillinre rezisztens (ez az arány sokkal alacsonyabb, mint az 1991 és 2001 között megjelent irodalmi adatok), míg az amoxicillin, ceftriaxon és erythromycin rezisztencia aránya 2,62, 1,12 és 42,06%. A penicillinre mérsékelten érzékeny törzsek aránya nőtt, a penicillinre rezisztens törzseké jelentősen csökkent az évek során, és ez 2002-ig messze alatta maradt az országos adatoknak. A gyermekek esetében a minták elsősorban a felső légutakból származtak, ami sokkal inkább a baktériumhordozást mutatja, míg a felnőttektől érkezett minták nagyobb arányban származtak az infekció valódi helyéről. A gyermekektől vett mintákból izolált pneumococcusok számának emelkedését, valamint a penicillin rezisztens törzsek arányának csökkenését az okozta, hogy a laboratóriumunkba mintát küldők ellátási területe egyre nagyobb arányban az alapellátást reprezentálta. A rezisztenciaváltozást a területi antibiotikum fogyás változása nem magyarázza. Az invazív mintákból izolált 155 *S. pneumoniae* törzs közül penicillinre csak 6 törzs (3,8%) volt rezisztens.

Meghatároztuk 57 random módon kiválasztott *S. pneumoniae* törzs szerotípusát. Vizsgálataink alapján a két éves kor alatt immunogén konjugált pneumococcus elleni vakcina szerotípusai kimagasló arányban (95%) egyeztek meg a két évnél fiatalabb

gyermekek mintáiból izolált törzsek (21 törzs) szerotípusával. Ugyanilyen kiváló hatékonyság várható a két évnél idősebb betegek esetében is (97%-os egyezőség a poliszacharid pneumococcus elleni vakcina törzseivel).

Megvizsgáltuk 195 tünetmentes óvodás baktérium hordozását az orrban. Megállapítottuk, hogy 33%-ban hordoztak *S. pneumoniae* törzseket. A 35 törzs közül csak egy törzs penicillin MIC értéke volt 4 mg/l és amoxicillin MIC értéke 1 mg/l. További 13 törzs penicillin MIC értéke 0,125 és 1 mg/l közé esett, amely alapján ezek a törzsek penicillinre mérsékelten érzékenyek. Ceftriaxonra rezisztens törzset nem izoláltunk. 14 törzs rezisztens volt erythromycinre és clindamycinre egyaránt.

Vizsgáltuk továbbá a cefditoren-pivoxil, egy új per os alkalmazható 3. generációs cefalosporin MIC értékét 35 pneumoniás felnőttől és 93 előzetesen gyűjtött, felső légúti infekcióban szenvedő gyermekek mintáiból izolált, 54%-ban penicillinre rezisztens *S. pneumoniae* törzseken. Eredményeink azt mutatták, hogy a penicillinre rezisztens törzseknél a cefditoren-pivoxil esetében mért alacsony MIC érték miatt ez az antibiotikum várhatóan jó hatékonysággal alkalmazható a penicillin rezisztens pneumococcusok okozta fertőzésekben.

2. Vizsgáltuk és követtük három éven keresztül a Szegedi Gyermekkórház CF Ambulanciáján gondozott betegek légútjaiban a *P. aeruginosa* előfordulását, amely 33-36%-os volt. A betegek mintáiból izolált mucoid törzsek biofilm képzésének mérésére könnyen kivitelezhető módszert állítottunk be, amellyel a clarithromycin különböző koncentrációinak biofilm képzést csökkentő hatását mértük. Megállapítottuk, hogy a rendszer jól alkalmazható in vitro biofilm képzés, biofilm képzés gátlás mérésére. Az infekciós tüneteket mutató CF-es betegek alsó légúti mintáiból közvetlenül készítettünk antibiotikum rezisztencia vizsgálatot E-teszttel, amely vizsgálat

eredményeképpen a normál garatflórát kímélő antibiotikum választáshoz kaptunk adatokat, valamint a különböző antibiotikum rezisztenciával rendelkező baktériumok különválasztása vált lehetővé.

3. Klinikai vizsgálatok eredményeinek összehasonlítása során igazoltuk, hogy az alsó légúti infekciók valódi kórokozójának kimutatására a védett bronchoalveolaris lavage módszerével nyert minták alkalmasabbak, mint az egyszerű trachealeszívás. Meghatároztuk 2002-2005 között a Gram-negatív bélbaktériumok előfordulását az intézetünkben vizsgált nozokómiális alsó légúti infekciókból származó mintákban, valamint ugyanezen esetekben a szélesspektrumú béta-laktamáz termelés előfordulási arányát. Megállapítottuk, hogy az ESBL termelő Gram-negatív bélbaktériumok száma nem változott az évek folyamán, valamint, hogy azok minden évben más-más speciesbe tartoztak. Ezzel kimondhattuk, hogy az SZTE ÁOK klinikáin a nozokómiális alsó légúti infekciókban a vizsgált időszakban nem játszottak döntő szerepet az ESBL termelő Gram-negatív bélbaktériumok.

4. A Gram-negatív légúti patogén baktériumok multirezisztens törzseivel szemben potenciálisan hatékony, szinergista antibiotikum kombinációkat vizsgáltunk kísérletes és napi rutinban is alkalmazható módszerekkel. Megállapítottuk, hogy kísérletes módszerrel a cefoperazon/klavulánsav kombináció tartós hatást fejtett ki a vizsgált béta-laktamázt termelő *E. coli* és *K. pneumoniae* törzsekre, bár ezt az antibiotikum kombinációt a gyógyszergyárak nem hozták forgalomba. Vizsgáltunk továbbá a napi rutinban is könnyen kivitelezhető E-teszt módszerrel *Pseudomonas* spp. törzseken különböző antibiotikum kombinációkat. Megállapítottuk, hogy az alsó légúti infekcióban egyébként jó hatással alkalmazható ciprofloxacinra rezisztens törzseknél sokkal

gyakrabban volt kimutatható a ciprofloxacin és béta-laktám antibiotikum kombinációban szinergizmus, mint a ciprofloxacinra mérsékelten érzékeny és érzékeny pseudomonasoknál. Az E-teszt ilyen vizsgálatokban való alkalmazását eddig nem közölték a szakirodalomban.

5. A potenciálisan légúti patogén Gram-negatív baktériumok béta-laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mechanizmusait tanulmányoztuk hagyományos és molekuláris módszerekkel. Adatink azt mutatták, hogy a vizsgált *K. pneumoniae, E. cloacae* és *S. marcescens* törzsekben egyszerre különböző típusú béta-laktamáz enzimet lehetett detektálni. A baktériumtörzsek kórházi környezetben való terjedése során béta-laktamáz enzim gén speciesek közötti terjedését tudtuk kimutatni.

Summary

1. Resistance patterns of *S. pneumoniae* isolates were evaluated between 1997-2005. The strains were obtained from clinical specimens of in- and out-patients belonging to different age groups. The resistance to penicillin, amoxicillin, ceftriaxone and erythromycin of the strains were rigorously determined by internationally accepted methods (NCCLS/CLSI). The number of strains tested increased during this 8-year period due to the increased number of patients belonging in the age group <14 years which influenced the prevalence of resistance to penicillin. Of the 2670 *S. pneumoniae* isolates only 5.58% was found to exhibit high-level resistance to penicillin (which was much lower than published data in the literature between1991 and 2001), while resistance to amoxicillin, ceftriaxone and erythromycin was 2.62%, 1.12% and 42.06%, respectively. The number of penicillin intermediate-resistant strains slightly increased, while the penicillin-highly-resistant strains decreased during this period. The increase of the number of strains originating from upper respiratory tract specimens of children (carriers) and the decrease in the number of penicillin-highly-resistant strains was due to the changes in the hospital wards and outpatient clinics from which samples were obtained. In every year the prevalence of amoxicillin and ceftriaxone resistance was very low and the erythromycin as well as clindamycin resistance was similarly high as among isolates obtained from hole Hungary. The changes in the resistance to penicillin could not be explained by the antibiotic consumption evaluated during this period for Csongrad County. Only 6 (3.8%) of 155 *S. pneumoniae* strains isolated from invasive samples displayed a high-level of resistance to penicillin.

Sero-types of 57 randomly selected *S. pneumoniae* isolates obtained from samples of <2-years old children was determined. In 95% the sero-types of these strains were identical with those present in the conjugated pneumococcus vaccine used for the immunisation of young children (<2 years) and in 97% with those present in the polysaccharide vaccine used for immunisation of children >2 years.

We also collected nasopharyngeal samples from 195 healthy children. They were *S. pneumoniae* carrier in 33%. Of the 35 strains, only one had an MIC of 4 mg/L for penicillin and of 1 mg/l for amoxicillin. An additional 13 strains had an MIC for penicillin between 0.125 and 1 mg/L, showing low-level penicillin resistance. No *S. pneumoniae* strains were resistant to ceftriaxone. Fourteen strains were resistant to erythromycin and clindamycin too.

We also investigated the in vitro activity of cafditoren-pivoxil, a new 3rd generation cephalosporine against 35 isolates obtained from adult patients suffering from pneumonia and against 93 earlier isolates *S. pneumoniae* strains obtained from children with upper respiratory tract infection. The MIC values of cefditore-pivoxile was much lower than the serum levels obtained with the regular doses even in the case of penicillin resistant strains. According to these cephditoren-pivoxil could be a useful alternative for treatment of infections caused by penicillin-highly-resistant or penicillin-intermediate-resistant strain.

2. During a three-year period the presence of *P. aerugiosa* was followed in the respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients treated in the out-patients clinic of the Pediatrics Hospital in Szeged. An in vitro model was developed to follow the biofilm formation of *P. aeruginosa* isolates. In this model it was possible to measure and quantify the biofilm inhibition effect of clarithromycin. A direct antibiotic resistance determination method was developed using the Etest methodology for the lower respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients with symptoms to determine the most suitable antibiotic treatment to kill mucoid *P. aeroginosa*, but save the normal respiratory tract flora of the patients. This method was also suitable to differentiate in a direct test colonising bacteria with different antibiotic resistance.

3. Evaluating the clinical relevance of culture results of lower respiratory tract specimens obtained by different methods, such as protected bronchoalveolar lavage or tracheal aspirate, we confirmed the advantages of the previous one. Between 2002 and

2005 the resistance patterns of Gram-negative pathogens isolated from bronchoalveolar lavage specimens from patients sufferenig from nosocomial pneumonia were evaluated with special emphasis on resistance to beta-lactam antibiotics. The prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing strains were tested by different detection methods. The percentage of the ESBL producing Gram-negative strains did not defer significantly during the study period, but more and more different species were isolated which produced ESBL.

4. Different methods were evaluated such as microtiter chequer-board titration, Etest killing curve to select the suitable one for routine testing of antibiotic synergism in vitro for multi-resistant Gram-negative respiratory tract pathogens. Chequer-board titration was used to test the effect of cefoperazone and clavulanic acid combination against beta-lactamase producing *E. coli* and *K. pneumoniae* compared to the single use of cefoparazone. Compared to the chequer-board titration the Etest methodology provided a more suitable method to test the synergistic effect of different antibiotic combinations during the same time period as the routine antibiotic resistance testing. Our results showed that the ciprofloxacin – beta-lactam combinations had an expressed synergistic effect against ciprofloxacin resistant *P. aeruginosa* isolates, however this synergism was difficult to detect in the case of fully susceptible strains. We found the Etest methodology, not widely published till now, a very useful approach to provide in vitro data for the clinicians to select combination therapy.

5. Gram-negative bacteria often involved as nosocomial pathogens in respiratory tract infections show frequently resistance to beta-lactam antibiotics. The resistance is due to the production of different beta-lactamases which was investigated by conventional and by molecular genetic methods. Our data shows that different types of beta-lactamases could be detected in clinical isolates of *K. pneumoniae*, *E. cloaceae* and *S. marcescens*. In some cases the acquisition of a new beta-lactamase gene could be confirmed during the spread of the strains in the hospital environment.

Irodalmi hivatkozások

1. Jacobs MR. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and patterns of resistance. *American Journal of Medicine* **117** (3A): 3-15 (2004)
2. Morbidity and Mortality Weekly Report Centers for Disease Control and Prevention Oktober 06, 2000/49 (RR09; 1-38)
3. File TM. *Streptococcus pneumoniae* and Community-Acquired Pneumonia:A cause for concern. *American Journal of Medicine* **117**(3A): 40S-50S (2004)
4. Luna CM, Aruj P, Niederman MS, Garzon J, Violi D, Prignoni A, Rios F, Baquero S, Gando S. Appropriateness and delay to initiate therapy in ventilator-associated pneumonia. *European Respiratory Journal* **27**: 158-164 (2006)
5. A practical approach to infectious diseases Edited by RE Reese, RF Betts Fifth edition Little, Brown and Company (1996)
6. Czirók Éva: Klinikai és járványügyi bakteriológia Melánia kiadó (1999)
7. Dixon JMS. Pneumococcus with increased resistance to penicillin. *Lancet* **2**: 474 (1974)
8. Dixon JMS, Lipinski AE, Graham MEP. Detection and prevalence of pneumococci with increased resistance to penicillin. *Canadien Medical Association Journal* **117**: 1159-61.(1977)
9. Murray RP (szerk) Manual of Clinical Microbiology ASM Press, Washington DC six edition (1995)
10. Watt JP, O'Brien KL, Katz S, Bronsdon MA, Elliott J, Dallas J, Perilla MJ, Reid R, Murrow L, Facklam R, Santosham M, Whitney CG. Nasopharyngeal versus oropharyngeal sampling for detection of pneumococcal carriage in adults. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 4974-4976 (2004)
11. Yochay GR, Raz M, DaganR, Porat N, Shainberg B, Pinco E, Keller N, Rubinstein E. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family. *Clinical Infectious Diseases* **38**: 632-639 (2004)
12. Hussain M, Melegaro A, Pebody RG, George R, Edmunds WJ, Talukdar R, Martin SA, Efstratiou A, Miller E. A longitudinal household study of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in a UK. setting *Epidemiology and Infection* **133**: 891-898 (2005)
13. Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokolja: A *Streptococcus pneumoniae* specifikus prevenciója (Ajánlás háziorvosoknak és házi gyermekorvosoknak) Készítette: Az Infektológiai Szakmai Kollégium. *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia* **XIII**:97-100 (2006)

14.Wuorimaa TK, Dagan R, Bailleux F, Haikala R, Ekstrom N, Eskola J, Yaich M, Kayhty H. Functional activity of antibodies after immunization of Finnish and Israeli infants with an 11-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Vaccine* **23**: 5328-5332 (2005)

15.Madhi SA, Kohler M, Kuwanda L, Cutland C, Klugman KP Usefulness of C-reactive protein to define pneumococcal conjugate vaccine efficacy in the prevention of pneumonia. *Pediatric Infection Diseases Journal* **25**: 30-36 (2006)

16.Dagan R, Givon-Lavi N, Fraser D, Lipsitch M, Siber GR, Kohberger R. Serum serotype-specific pneumococcal anticapsular immunoglobulin g concentrations after immunization with a 9-valent conjugate pneumococcal vaccine correlate with nasopharyngeal acquisition of pneumococcus. *The Journal of Infectious Diseases* **192**: 367-376 (2005)

17.Lexau CA, Lynfield R, Danila R, Pilishvili T, Facklam R, Farley MM, Harrison LH, Schaffner W, Reingold A, Bennett NM, Hadler J, Cieslak PR, Whitney CG. Active Bacterial Core Surveillance Team. Changing epidemiology of invasive pneumococcal disease among older adults in the era of pediatric pneumococcal conjugate vaccine. *The Journal of the American Medical Association* **294:** 2043-2051. (2005)

18.Reinert RR, Reinert S, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Appelbaum P. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49**: 2903-2913 (2005)

19.Moreno J, Hernandez E, Sanabria O, Castaneda E. Detection and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from nasopharyngeal samples by PCR-based multiplex assay. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 6152-6154 (2005)

20.Bayraktar MR, Durmaz B, Kalcioglu MT, Durmaz R, Cizmeci Z, Aktas E. Nasopharyngeal carriage, antimicrobial susceptibility, serotype distribution and clonal relatedness of *Streptococcus pneumoniae* isolates in healthy children in Malatya, Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**: 241-246 (2005)

21.Marchese A, Gualco L, Cochetti I, Montanari MP, Speciale AM, Musumeci SR, Varaldo PE, Nicoletti G, Schito GC. Antibiotic susceptibility and serotype distribution in *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy: results of the SEMPRE surveillance study (2000-2002). *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**: 138-45 (2005)

22.Marton A. Epidemiology of resistant pneumococci in Hungary. *Microbial Drug Resistance* **1:** 127-130 (1995)

23.Dr. Pásztor Mónika. Invazív *Streptococcus pneumoniae* infekciókból izolált törzsek szerotípusának és antibiotikum-érzékenységének meghatározása. *Lege Artis Medicinae* **15:** 927-931 (2005)

24.Dobay O, Rozgonyi F, Hajdú E, Nagy E, Knausz M, Amyes SGB. Antimicrobial susceptibility and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates from Hungary. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 887-893 (2003)

25.Pebody RG, Leino T, Nohynek H, Hellenbrand W, Salmaso S, Ruutu P. Pneumococcal vaccination policy in Europe. *European Surveillance* **10**: 174-178 (2005)

26.Van Delben C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infections Diseases* **4**: 551-560 (1998)

27.Yanagihara K, Tomono K, Imamura Y, Kaneko Y, Kuroki M, Sawai T, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mukae H, Kadota JI, Kohno S. Effect of clarithromycin on chronic respiratory infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* with biofilm formation in an experimental murine model. *Journal of Antimocrobial Chemotherapy* **49**: 867-870 (2002)

28.Kaneko Y, Yanagihara K, Seki M, Kuroki M, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mukae H, Tomono K, Kadota JI, Kohno S. Clarithromycin inhibits overproduction of muc5ac core protein in murine model of diffuse panbronchiolitis. *Amarican Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology* **285**: 847-853 (2003)

29.Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M, Izumi T, Ando M. Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **157**: 1829–1832 (1998)

30.Jaffe A, Francis J, Rosenthal M, Bush A. Long-term azithromycin may improve lung function in children with cystic fibrosis. *Lancet* **351**: 420. (1998)

31.Yanagihara K, Tomono K, Sawai T, Hirakata Y, Kadota J, Koga, H. Effect of clarithromycin on lymphocytes in chronic respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **155**: 337–342. (1997)

32.Fujii T, Kadota J, Morikawa T, Matsubara Y, Kawakami K, Iida, K. Inhibitory effect of erythromycin on interleukin-8 production by 1, 25-dihydroxyvitamin D3-stimulated THP-1 cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**: 1548–1551 (1996).

33.Yanagihara K, Tomono K, Sawai T, Kuroki M, Kaneko Y, Ohno H. Combination therapy for chronic *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection associated with biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**: 69–72 (2000)

34.Kobayashi H. Airway biofilm disease: clinical manifestation and therapeutic possibilities using macrolides. *Journal of Infection and Chemotherapy* **1**: 1–15. (1995)

35.Landry RM, An D, Hupp JT, Singh PK, Parsek MR. Mucin-*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Molecular Microbiology* **59:** 142-51.2006

36.Hill D, Rose B, Pajkos A, Robinson M, Bye P, Bell S, Elkins M, Thompson B, Macleod C, Aaron SD, Harbour C. Antibiotic susceptabilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 5085-5090 (2005)

37.Kobayashi H. Airway biofilms: implications for pathogenesis and therapy of respiratory tract infections. *Treatements in Respiratory Medicine* **4**: 241-253 (2005)

38.Ramsey DM, Wozniak DJ. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Molecular Microbiology* **56**: 309-22 (2005)

39.Eberl L, Tummler B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *International Journal of Medical Microbiology* **294**: 123-131 (2004)

40.Clinical Microbiology Procedures Handbook 1992. (Szerk. Isenberg H.D.) 1.4. fejezet

41.Giamarellou H. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs). *Clinical Microbiology and Infection* **11** Suppl 4:1-16 (2005)

42.Du B, Long Y, Liu H, Chen D, Liu D, Xu Y, Xie X. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. *Intensive Care Medicine* **28**: 1718-23 (2002)

43.Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin [letter]. *Nature* **146**: 837. (1940)

44.Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature* **208**: 239-244 (1965)

45.Szabó Dóra. Kiterjedt-spektrumú β-lactamase termelés jelentősége (Detektálási lehetőségek és epidemiológia). *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia* **X**: 94-99 (2003)

46.Lányi Éva. Antibiotikum rezisztenci mechanizmusok a β-lactam antibiotikumokkal szemben: néhány rezisztencia mechanizmus rutin laboratóriumi kimutatásának aktuális kérdései. *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia* **XI**: 39-46 (2004)

47.Nagy Erzsébet. β-lactamase-ok és azok hatása a β-lactam antibiotikumok klinikai alkalmazására. *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia* **VII**: 1-9 (2000)

48.Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole, and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* **11**: 315-317 (1983)

49.Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **28:** 302–307 (1985)

50.Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-spectrum β-lactamases. *Journal of Antimocrobial Chemotherapy* **33**; 1131-1136 (1989)

51.Philip J. Turner Extended-Spectrum β-Lactamases *Clinical Infectious Diseases* **41:** S273-S275 (2005)

52.Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum ß-Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 1-14 (2004)

53.NCCLS Performans standards for antimicrobial susceptibility testing West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA

54.Lorian, V. Antibiotics in Laboratory Medicine , 2nd edn. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. (1986).

55.Escamilla J. Susceptibility of Haemophilus influenzae to ampicillin as determined by use of modified, one minute beta-lactamase test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **9**; 196-198 (1976)

56.Thore M, Jalakas K, Eriksson I, Dombusch K. Evaluation of a disk approximation test of inducible béta-lactamases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica* **97**: 317 (1989)

57.Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon. A Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Reviews of Infectious Diseases* **10**; 867-78. (1988)

58.Cormican MG, Marschall SA, Jones RN. Detection of extended-spectrum beta-lactamasa (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *Journal of Clinical Microbiology* **34**; 1880-1884 (1996)

59.Moody JA.. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods, 5.18.1-5.18.28 (1992);. In H. D. Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

60.Leriche V, Sibile P, Carpentier B. Use of an Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilm. *Applied and Enviromental Microbiology* **55:** 1851-1856 (2000)

61.ATC/DDD index 2005. Oslo, Norway: WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, 2005. Available at: http://www.whocc.no/atcddd/indexdatabase/

62.Official homepage of the Hungarian Central Statistical Office Available at: http://portal.ksh.hu/portal/page?_pageid=37,112477&_dad=portal&_schema PORTAL

63.Országos Epidemiológiai Központ/Országos Közegészségügyi Intézet „Fehér könyvek”

64.Marton A, Gulyás M, Munoz R, Tomasz A. Extremly high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *Journal of Infectious Diseases* **163**: 542-548 (1991)

65.Marton A. Pneumococcal antimicrobial resistance: the problem in Hungary. *Clinical Infectious Diseases* **15**: 106-111 (1992)

66.Marton A. Mészner Zs. Epidemiological studies on drug resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Hungary: an update for the 1990s. *Microbial Drug Resistance* **5**: 201-205 (1999)

67.Bishal W. The *in vitro – in vivo* paradox in pneumococcal respiratory tract infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**: 433-436. 2002

68.Pérez-Trallero E, Fernández-Mazarrasa C. García-Rey C, Bouza E, Aguilar R, Garcia-De-Lomas J, Baquero F. Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial susceptibilities of 1,684 *Streptococcus pneumoniae* and 2,039 *Streptococcus pyogenes* isolates and their ecological relationships: results of a 1-year (1998-1999) multicenter surveillance study in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 3334-3340 (2001)

69.Nagai K, Appelbaum PC, Davies TA, Kelly LM, Hoellmann DB, Andresevic AT, Drukalska L, Hrynewicz W, Jacobs MR, Kolman J, Micilueviciene J, Pana M, Setchanova L, Thege MK, Hupkova H, Trupl J, Urbaskova P. Susceptibilities to telithromycin and six other agents and prevalence of macrolide resistance due to L4 ribosomal protein mutation among 992 Pneumococci from 10 central and Eastern European countries. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002 **46**: 371-377 (2002)

70.Tomasz A. A multinational workshop on drug-resistant pathogens of the respiratory tract: prevalence, risk factors and intervention strategies. *Clinical Microbiology and Infection* **5**: Suppl 4. S1-2 (1999)

71.Overweg K, Hermans PWM, Trczinski K, Sluijter M, de Groot R, Hryniewicz W. Multidrug resistant *Streptococcus pneumoniae* in Poland: identification of emerging clones. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 1739-1745 (1999)

72.Marton A. A *Streptococcus pneumoniae* antibiotikum rezisztenciája *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia* **1**: 23-28 (1997)

73.Predier C, Dunais B, Carsenti-Etesse H, Dellamonica P. Pneumococcal resistance patterns in Europe. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection* **16**: 644-647 (1997)

74.Felmingham D, Feldman C, Hrynewicz W, Klugman K, Kohno S, Low DE, Mendes C, Rodloff AC. Surveillance of resistance in bacteria causing community-acquired respiratory tract infections. *Clinical Microbiology and Infection* **8**: Suppl 2. S12-42 (2002)

75.Brown SD, Rybak MJ. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae* collected from patients across the USA, in 2001-2002, as part of the PROTECT US study. *Journal of Antimocrobial Chemotherapy* **S1**: 7-15 (2004)

76.Castanheira M, Gales AC, Mendes RE, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in Latin America: results from five years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Clinical Microbiology and Infection* **10**: 645-651 (2004)

77.Brown SD, Farrell DJ. Antibacterial susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolated from paediatric and adult patients as part of the PROTECT US study in 2001-2002. *Journal of Antimocrobial Chemotherapy* **S1**: 23-29 (2004)

78.European Antimicrobial Resistance Surveillance System EARSS Annual Report (2004)

79.Oteo J, Lázaro E, de Abajo FJ, Baquero F, Campos J. and Spanosh Members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Trends in antimicrobial resistance in 1,968 invasive *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Spanish hospitals (2001 to 2003): decresing penicillin resistance in children's isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **42:** 5571-5577. (2004)

80.Demachy MC, Vernet-Garnier V, Cottin J. Antimicrobial resistance data on 16,756 *Streptococcus pneumoniae* isolates in 1999: a Pan-Regional Multicenter Surveillance Study in France. *Microbial Drug Resistance* **11:**323-329. (2005)

81.EPINFO 1999,6,9. szám

82.Glatz K, Szabó D, Szabó Gy, Boriszova D, Rozgonyi F. Emergence of extremly high penicillin and cefotaxime resistance and high-level levofloxacin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**: 731-734 (2001)

83.Regev-Yochay G, Raz M, Dagan R, Porat N, Shainberg B, Pinco E, Keller N, Rubinstein E. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* by adults and children in community and family setting. *Clinical Infectious Diseases* **38**: 632-639 (2004)

84.Malfroot A, Verhaegen J, Dubru JM, Van Kreschaver E, Leyman S. A cross-sectional survey of the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in Belgian infants attending day care centres. *Clinical Microbiology and Infection* **10**: 797-803 (2004)

85.McChlery SM, Scott KJ, Clarke SC. Clonal analysis of invasive pneumococcal isolates in Scotland and caverige of srotypes by the licensed conjugate poliszacharide pneumococcal vaccine: possible implications for UK vaccine policy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases* **24**: 262-267 (2005)

86.Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Direct and indirect effects of routine vaccination of children with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on incidence of invasive pneumococcal disease-United States, 1998-2003. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. **54**: 893-897 (2005)

87.Ahmed K, Martinez G, Wilson S, Yoshida R, Dhar R, Mokaddas E, Kohno S, Rotimi VO, Nagatake T. The prevalence and clonal diversity of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Kuwait. *Epidemiology and Infection* **125**: 573-581 (2000)

88.Stratchounski LS, Kozlov RS, Appelbaum PC, Kretchikova OI, Kosowska-Shick K. Antimicrobial resistance of nasopharyngeal pneumococci from children from day-care centres and orphanages in Russia: results of a unique prospective multicenter study. *Clinical Microbiology and Infection* **12:** 853-866. (2006)

89.Mühlemann K, Uehlinger DE, Büchi W, Gorgirvski M, Aebi C. The prevalence of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae* among children aged <5 years correlated with the biannual epidemic activity of respiratory syncytial virus. *Clinical Microbiology and Infection* **12**: 873-879. (2006)

90.Wellington K, Curran MP. Spotlight on cefditoren pivoxil in bacterial infections. *Treatements in Respiratory Medicine* **4**: 149-152 (2005)

91.Soriano F, Granizo JJ, Fenoll A, Gracia M, Fernandez_Robles R, Esteban J, Gadea I, Coronel P, Gimeno M, Rodenas E, Santos F. Antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* isolated in four southern European countries (ARISE project) from adult patients: results from the cefditoren surveillance program. *Journal of Chemotherapy* **15**: 107-112 (2003)

92.Quintas S, Pereira L, Lito L, Barreto C. Epidemiological survey of bacteria isolated from the respiratory tract of cysic fibrosis patients. *Revista Portuguesa de Pneumologia* **IX**(5 Suppl. 1): 35-36 (2003)

93.Hudson VL, Wielinski CL, Regelmann WE. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cysic fibrosis diagnosed before the age of two years. *The Journal of Pedeatrics* **122**: 854-860 (1993)

94.Schultz MJ. Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis . *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**: 21-28 (2004)

95.Szabó Ákos V. éves biológus hallgató: A *Pseudomonas aeruginosa* által termelt biofilm mérése és gátlása antibiotikumokkal. Szakdolgozat. Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet (2004)

96.Wozniak DJ, Keyser R, Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa. Chest* **125**: 62S-69S. (2004)

97.Cantón R, Cobos N, de Gracia J, Baquero F, Honorato J, Gaertner S, Alvarez A, Salcedo A, Oliver A, Garcia-Quetglas E. on behalf of the Spanish Consensus Group for Antimicrobial Therapy in the Cystoc Fibrosis Patent. Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Infection* **11**: 690-703 (2005)

98. Yasuda H, Ajiki Y, Koga T, Kawada H, Yokota T. Interaction between biofilms formed by *Pseudomonas aeruginosa* and clarithromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37:** 1749–55 (1993)

99. Fujii T, Kadota J, Iida KK., Shirai R, Kaseda M. Long-term effect of erythromycin therapy in patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Thorax* **50**: 1246–52. (1995)

100. Yunhua C, Saiman L. Synergistic activities of macrolide antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* and Alcaligenes xylosoxydans isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 1105-1107 (2002)

101. Johanson WG, Dever LL. Nosocomial pneumonia. *Intensive Care Medicine* **29**: 23-29 (2003)

102. Koller MH. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clinical Infectious Disease* **31**:Suppl 14: S131-138 (2000)

103. Ruiz M, Arosio C, Salmon P, Bauer TT, Torres A**.** Diagnosis of pneumonia and monitoring of infection eradication. *Drug* **60**: 1289-1302 (2000)

104. Bauer TT, Valencia M, badia JR, Ewig S, Gonzalez J, Ferrer M, Torres A. Respiratory microbiology patterns within the first 24 h of ARDS diagnosis: influence on outcome. *Chest* **128**: 273-279 (2005)

105. Gaynes R, Edwards JR and the National Nosocomial Infections Surveillance System Overview of Nosocomial Infections Caused by Gram-Negative Bacilli. *Clinical Infectious Diseases* **41**: 848-854 (2005)

106. Crosby MA, Gump DW. Activity of cefoperazon and two beta-lactamase inhibitors, szulbaktám and clavulanic acid against *Bacteroides* spp. correlated with beta-lactamase production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **22**: 398-405 (1982)

107. Bolstrom A, Ardvison S, Ericson M. et al. New in vitro models for studying antibiotic combination using predefined antibiotics gradient. Program and abstract of the 16th International Congress of Chemotherapy Abstract No 011 (1989)

108. Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, Ramphel R, Wagener MM, MiyashiroDK, Yu VL. *Enterobacter* bacteremia clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Annals of Internal Medicine* **115**: 585-590 (1991)

109. Sanders CC, Sanders WE Jr. Beta-lactam resistance in Gram-negative bacteria: global ternds and clinical impact. *Clinical Infectious Disease* **15**: 824-839 (1992)

110. Kaneko K, Okamato R, Nakano R, Kawakami S, Inoue M. Gene mutations responsible for overexpression of AmpV beta-lactamase in some clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 2955-2958 (2005)

111. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **8**: 557-584 (1995)

112. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *American Journal of Infection Control* **32**: 470-485 (2004).

113. Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. Origin and impact of plasmid-mediated extended spectrum beta-lactamases. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases* **13:** (Suppl 1): 17 (1994)

114. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clinical Infectious Disease* **24:** (Suppl 1) S19 (1997)

115. Sirot DL, Goldstein FW, Soussy CJ, Courtieu AL, Husson MO, Lemozy J, Meyran M, Morel C, Perez R, Quentin-Noury C. Resistance to cefotaxime and seven other beta-lactams in members of the family *Enterobacteriaceae*: a 3-year survey in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**: 1677-1681.(1992)

Köszönetnyilvánítás

Először is hálás köszönetemet fejezem ki témavezetőmnek és egyben munkahelyi vezetőmnek Prof. Dr. Nagy Erzsébetnek, valamint másik témavezetőmnek Dr. Vágvölgyi Csabának felbecsülhetetlen szakmai és emberi segítségükért, támogatásukért, biztatásukért, bizalmukért.

Köszönöm a publikációkban szerzőtárs kollégáknak, Benkő Riának, Dr. Blazsovszky Matildnak, Dr. Dobay Orsolyának, Dr. Fodor Eleonórának, Dr. Fogas Jánosnak, Dr. Jeszenszky Máriának, Dr. Kóczián Zsófiának, Matuz Máriának, Mayer Ilonának, Ordas Anitának, Dr. Prágai Zoltánnak, Dr. Rudas Lászlónak, Dr. Soós Gyöngyvérnek, Dr. Szabó Ágnesnek, Szabó Ákosnak, Dr. Szurdi Máriának a nagyszerű közös munkát.

Hálásan köszönöm munkatársaimnak – Dr. Urbán Edit, Dr. Terhes Gabriella, Rátkai Csilla, Pappné Ábrók Marianna, Bjelik Annamária – a rutin laboratóriumi munka átvállalását, Dr. Lázár Andreának az adatgyűjtésben és a törzsek gyűjtésében nyújtott segítséget, Bönde Anita, Deák Tünde, Gáborné Hevesi Márta, Marincusné Karasz Erika, Müller Ferencné, Nagyné Dósa Éva, Redetzky Andrea, Révészné Tóth Zsuzsanna, Szappanos Edina asszisztensnőknek a mindig pontos, precíz laboratóriumi munkát.

Külön köszönöm Dr. Hulesch Helgának az irodalmazáshoz nyújtott segítségét, és dolgozatomhoz fűzött kritikai észrevételeit.

Köszönöm Édesanyámnak, testvéreimnek, hogy most is, mint életem eddigi útján mindig biztattak, támogattak. Nagyon köszönöm családomnak (férjemnek, Horváth Zoltánnak, fiaimnak, Csabának és Attilának, kislányomnak, Andreának), hogy buzdítottak és türelemmel, megértéssel viselték, amíg sokszor dolgozatom megírásával voltam elfoglalva.