



SZENT ISTVÁN EGYETEM

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

UBIKVITER BAKTÉRIUMOK KÖRNYEZETBIZTONSÁGI VIZSGÁLATA

RADÓ JÚLIA

Gödöllő

2019

A doktori iskola

Megnevezése: Környezettudományi Doktori Iskola

Tudományága: Környezettudomány

Vezetője: Csákiné Dr. Michéli Erika
egyetemi tanár, tanszékvezető
Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Környezettudományi Intézet
Talajtani és Agrokémiai Tanszék

Témavezető: Dr. Szoboszlai Sándor
egyetemi docens, tanszékvezető
Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék

Témavezető: Dr. Kaszab Edit
egyetemi adjunktus
Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék

.....
Az iskolavezető
jóváhagyása

.....
A témavezető
jóváhagyása

.....
A témavezető
jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITÚZÓTT CÉLOK	4
2. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	6
2.1 MINTAVÉTELEZÉS	6
2.2 A KÖRNYEZETI EREDETŰ <i>ACINETOBACTER</i> ÉS <i>P. AERUGINOSA</i> FAJOK IZOLÁLÁSA ÉS AZONOSÍTÁSA.....	6
2.3 ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIA VIZSGÁLAT	6
2.4 HEMOLITIKUS AKTIVITÁS VIZSGÁLATA.....	7
2.5 BIOFILM KÉPZŐ KÉPESSÉG VIZSGÁLATA	7
2.6 <i>P. AERUGINOSA</i> TÖRZSEKKEL VÉGZETT KOMPLEX VIZSGÁLATI KÖR	8
3. AZ EREDMÉNYEK.....	10
3.1 AZ <i>ACINETOBACTER</i> TÖRZSEK IZOLÁLÁSÁNAK ÉS AZONOSÍTÁSÁNAK EREDMÉNYEI.....	10
3.2 AZ <i>ACINETOBACTER</i> TÖRZSEK ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIÁJÁNAK EREDMÉNYEI.....	11
3.3 AZ <i>ACINETOBACTER</i> TÖRZSEK HEMOLITIKUS AKTIVITÁS VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI..	12
3.4 AZ <i>ACINETOBACTER</i> TÖRZSEK BIOFILM KÉPZŐ KÉPESSÉG VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI	13
3.5 AZ <i>ACINETOBACTER</i> TÖRZSEK MLST VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI	13
3.6 A <i>P. AERUGINOSA</i> TÖRZSEK IZOLÁLÁSÁNAK ÉS AZONOSÍTÁSÁNAK EREDMÉNYEI	14
3.7 A <i>P. AERUGINOSA</i> TÖRZSEK ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIÁJÁNAK EREDMÉNYEI	14
3.8 A <i>P. AERUGINOSA</i> HEMOLITIKUS AKTIVITÁS VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI	14
3.9 A <i>P. AERUGINOSA</i> TÖRZSEK BIOFILM KÉPZŐ KÉPESSÉG VIZSGÁLATÁNAK EREDMÉNYEI	15
3.10 A <i>P. AERUGINOSA</i> TÖRZSEKKEL VÉGZETT KOMPLEX VIZSGÁLATI KÖR EREDMÉNYEI.....	15
3.11 A <i>P. AERUGINOSA</i> TÖRZSEK EREDMÉNYEINEK ÖSSZEHAJONLÍTÓ ÉRTÉKELÉSE	20
4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	26
5. IRODALOMJEGYZÉK	30
6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK.....	32

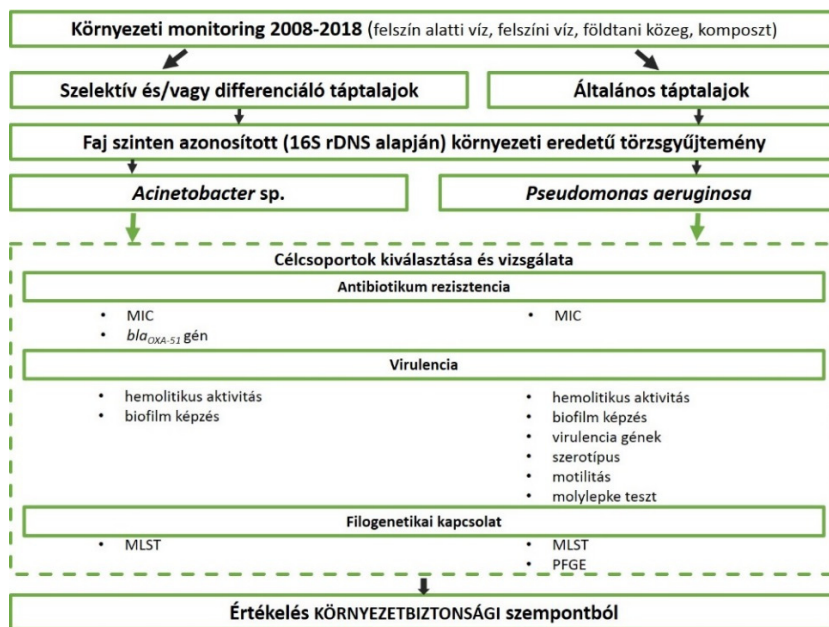
1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

A környezetbiztonság témakörének biológiai oldalról való megközelítése során első lépésben kerülnek megemlítésre azok a mikrobák, melyek a kockázatkezelés szempontjából kiemelt jelentőségűek. Számos, opportunistá patogén baktérium – gyengültségi kórokozó – része a természetes környezetnek, közreműködője az anyagkörforgalmi folyamatoknak, jelentős részük kiváló metabolikus képességekkel rendelkezik. Meghatározó részük elsősorban kórházi környezetben okoz gondot nozokomiális fertőzések kialakításával és antibiotikum rezisztenciájával. Általános feltevés, hogy a környezeti – jó biodegradációs képességekkel rendelkező – törzsek kevéssé, vagy egyáltalán nem tartják veszélyesnek kockázatkezelés szempontjából, míg azonos baktériumfaj kórházi képviselőjét igen magas egészségkockázati tényezőként jegyzik. A baktériumok lehetséges biológiai veszélyeit számos faktor befolyásolja. Különböző tényezők játszanak szerepet a kolonizáció, infekció létrejöttében, a kórokozói viselkedés megnyilvánulásában vagy a bekövetkezett fertőzés kimenetelében.

Doktori munkám során (1. sz. ábra) olyan opportunistá patogén baktériumok, mint az *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó fajok és a *Pseudomonas aeruginosa* faj vizsgálatát tűztem ki célul, melyek ubikviter szervezetekként a környezetben (is) általánosan elterjedtek, azonban jelentős problémát okoznak kórházi körülmények közt betegségkialakító képességükkel és antibiotikum rezisztenciájukkal:

- Az *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó fajok, illetve a *Pseudomonas aeruginosa* faj környezeti képviselőinek izolálása és azonosítása, fenntartása törzsgyűjteményben.
- Az antibiotikum rezisztencia kvantitatív megállapítására alkalmas fenotípusos teszt (MIC teszt), esetenként rezisztencia gén vizsgálata polimeráz láncreakció segítségével.
- A virulencia megnyilvánulása/virulencia faktorok vizsgálata különböző módszerekkel:

- hemolitikus aktivitás (véragar lemezen)
- biofilm képző képesség (mikrotiter lemez módszer, konfokális lézer pásztázó mikroszkóp)
- virulencia gének vizsgálata (polimeráz lánreakció)
- szerológiai vizsgálatok (polivalens és monovalens antiszérum savókészlet)
- motilitás vizsgálata („swimming, swarming, twitching”)
- virulencia vizsgálat nagy viaszmosoly (*Galleria mellonella*) modellen.
- Rokonsági kapcsolatok meghatározása a környezeti törzsek között molekuláris biológiai vizsgálatokkal, illetve adott módszerhez köthető adatbázisokban található információk elemzése, kapcsolatok keresése a környezeti és a klinikai izolátumok között:
 - MLST (Multilocus Sequence Typing/Multilokus Szekvencia Tipizálás)
 - PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis/Pulzáló Erőterű Gélelektroforézis).



1.sz. ábra: Doktori munkám során végrehajtott vizsgálatok folyamatábrája

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 Mintavételezés

2008-2018 között *Acinetobacter* (405 minta) és *P. aeruginosa* (~300 minta) törzsek izolálása céljából [a vonatkozó Magyar Szabványoknak megfelelően (MSZ 21464: 1998.; MSZ 5667-4:1995.; MSZ 21470-1:1998.)] környezeti mintákat vételeztem felszíni- és felszín alatti vizekből, földtani közegből, illetve egyéb, mezőgazdasági termeléshez köthető forrásokból (komposzt, zöldségek, halhús).

2.2 A környezeti eredetű *Acinetobacter* és *P. aeruginosa* fajok izolálása és azonosítása

A környezeti minták tízszeres hígításával dolgoztam, melyből az acinetobacterek esetében *Acinetobacter* dúsító tápoldat, majd Leeds *Acinetobacter* Medium segítségével lemezeket öntöttem és a típusos (mályva színű) telepeket szélesztéssel tisztítottam. A *P. aeruginosa* esetében az MSZ 21470-77:1988 számú, Magyar Szabvány szerint jártam el. Az individuális tenyészetek faj szintű identifikációját 16S rDNS alapon végeztem. Az *Acinetobacter* törzss jelöltek DNS-ét a 27f és 1492r (LANE, 1991) univerzális primerek segítségével PCR során felszaporítottam, majd kapilláris gélelektroforézissel megállapítottam a bázissorendet és a MEGA7 program (TAMURA ET AL., 2013) segítségével értékeltem a szekvenciákat. Az eredményt az EzTaxon adatbázissal (YOON ET AL., 2017) hasonlítottam össze. A *P. aeruginosa* törzsek azonosítása érdekében PA-SS PCR reakciót hajtottam végre a PA-SSf és PA-SSr primerek (SPILKER ET AL., 2004) segítségével, mely során a 16S rDNS V2 és V8 fajspecifikus alegységeit mutattam ki.

2.3 Antibiotikum rezisztencia vizsgálat

A törzsek antibiotikum rezisztenciájának vizsgálatát fenotípusos módszerrel, ún. MIC teszt®-tel (Liofilchem, Olaszország) hajtottam végre, mely az antibiotikum rezisztencia számszerű (kvantitatív) értékelését teszi lehetővé. A vizsgálatokat a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) által meghatározott módszer

szerint végeztem (CLSI, 2017) nemzetközi ajánlások szerint választott antibiotikum hatóanyagokkal.

Az *Acinetobacter baumannii* törzsek esetében a *bla_{OXA-51}*, kromoszómáisan kódolt, antibiotikum rezisztenciával összefüggésben levő gén jelenlétét PCR segítségével vizsgáltam (MERKIER&CENTRON, 2006).

2.4 Hemolitikus aktivitás vizsgálata

A virulencia megnyilvánulásaként számon tartott hemolízis vizsgálata során defibrinált birkavérrel kiegészített Columbia véragar lemezekre oltottam a vizsgált törzseket. A 22 órás leolvasást követően a hemolízis intenzitásának jellemzésére ötfokozatú skálát alkalmaztam: - nincs hemolízis, +/- kétséges hemolízis, + gyenge hemolízis, ++ hemolízis, +++ intenzív hemolízis.

2.5 Biofilm képző képesség vizsgálata

A biofilm képző képességet 96 lyukú, mikrotiter lemezes módszerrel vizsgáltam (STEPANOVIC ET AL., 2000; KUMARI ET AL., 2013). A foszfát pufferrel átmosott lemezen metanollal fixáltam a sejteket, majd kristályibolya festékkel megfestettem őket, végül 33%-os jégcettel visszaoldottam és optikai denzitást (OD) mértem 550 nm-en. A kontrollhoz viszonyítva 4 osztályba soroltam a biofilm képző képességet: $OD \leq OD_c^1$ - nincs (0); $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ - gyenge (+); $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ - közepes (++); $4 \times OD_c < OD$ - erős (+++).

A *P. aeruginosa* törzsek egy csoportjának biofilm képző képességét a németországi TWINCORE Kutatóintézzettel együttműködve SP8 system Leica típusú konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (CLSM²) segítségével is vizsgáltam, ahol a 48 órás, statikus mikroplate-en nőtt biofilmeket van Duuren és munkatársai által leírt (2017) módszerrel vizualizáltam, mely alapján elkülöníthettem az élő és élettelen sejteket, valamint a strukturált biofilmeket a planktonikus sejtek halmozódásától.

¹ OD_c érték: a negatív kontrol szórásának háromszorosa plusz a negatív kontrol átlag OD értéke.

² Confocal Laser Scanning Microscopy

2.6 *P. aeruginosa* törzsekkel végzett komplex vizsgálati kör

Virulencia gének vizsgálata: Szakirodalmi ajánlások alapján az alábbi kiválasztott virulencia géneket vizsgáltam *P. aeruginosa* törzseknél: alginát (*algD*), elasztáz (*lasB*), hemolitikus foszfolipáz (*plcH*), alkalikus proteáz (*aprA*), exoenzimek/exotoxinok (*exoS* és *exoU*). A géneket PCR segítségével mutattam ki (AJAYI ET AL., 2003., LANOTTE ET AL., 2004; BADAMCHI ET AL., 2017).

Szerológiai vizsgálatok: A *P. aeruginosa* izolátumok szerológiai vizsgálatát a Nemzeti Népegészségügyi Központ - Fágtipizálási és Molekuláris Epidemiológiai Osztálya végezte, a Bio-Rad Magyarország Kft. által forgalmazott, polivalens és monovalens antiszérum savókészlettel, a gyártó útmutatásai szerint.

Motilitás vizsgálatok: A *P. aeruginosa* törzsek motilitás vizsgálatára a németországi TWINCORE Kutatóintézetben került sor. A vizsgálatok a swimming, swarming és twitching mozgásformákra terjedtek ki, melyekhez pozitív kontroll a *P. aeruginosa* PA14 törzs volt. A motilitás teszthez OD₆₀₀ 1,5-2,5 sűrűségű baktériumszuszpenziót használtam, melyet 15 órás inkubáció után értékeltem a motilitási zóna mérésével az ImageJ képalkotó program segítségével. A motilitás eredményeit három kategóriába soroltam: nem motilis, motilis, hipermotilis.

Virulencia vizsgálat nagy viaszmony (*Galleria mellonella*) modellen: A virulencia tesztek szintén a németországi TWINCORE laboratóriumaiban zajlottak. A *P. aeruginosa* törzsek „overnight” folyékony tenyészetéből (OD₆₀₀: 0,5; 10⁵ hígítás) 300 µl-t a nagy viaszmony (*Galleria mellonella*) lárvájának fertőzéséhez használtam fel (10 hernyó/baktériumtörzs). Egy negatív kontrollt kezelés mentesen és egyet baktériummentes foszfátoldattal, a pozitív kontrollt a PA14 referencia törzs tenyészetével kezelve állítottam be. A lárvák életképességét 24 és 48 óra elteltével ellenőriztem, a túlélési ráta szerint négy kategóriába soroltam a törzseket: avirulens (100-75%), közepesen avirulens (74-50%), közepesen virulens (49-25%), virulens (24-0%).

Filogenetikai vizsgálatok: A Multilokusz Szekvencia Tipizáló módszerrel (MLST) háztartási gének kerültek szekvenálásra forward és reverz primerek segítségével az *A. baumannii* (BARTUAL ET AL., 2005) és egyes *P. aeruginosa* (CURRAN ET AL., 2004)

törzsek esetében. A fragmentek szekvenciáit nemzetközi adatbázissal (www.pubmlst.org) összevettem és megállapítottam az adott lokuszon³ található allél⁴ számát (nukleotid különbségekhez lokuszonként egy, a korábbiaktól eltérő allélszám). A hét génszakasz esetében meghatározott allélok kombinációja alapján megállapítható az adott törzs szekvencia típuszáma (ST), mely alapján (az adatbázisból) meghatározható a különböző helyekről izolált törzsek közti filogenetikai kapcsolatrendszer.

A pulzáló erőterű gélelektroforézissel (PFGE) *P. aeruginosa* törzsek közti filogenetikai kapcsolatot vizsgáltam az Nemzeti Népegészségügyi Központ munkatársainak segítségével. A DNS-restrikciós minták alapján kategorizáltam a törzseket: 95% homológia felett azonos típus, 85-95% között szoros kapcsolat, 85% felett, ahol a Tenover kritériumok (TENOVER ET AL., 1995) nem teljesülnek, lehetséges kapcsolat az izolátumok között, és 85% alatt nincs kapcsolat. A 95% felett azonos törzseket egy klónba sorolják, míg a 85% alattiakat „egyedi” vagy sporadikus törzseknek nevezik.

³ Lokusz: másnéven génhely. Adott gén, vagy szekvencia kromoszómán, vagy genetikai térképen elfoglalt helye.

⁴ Allél: másnéven génváltozat. Adott lokuszon elhelyezkedő gén variációja.

3. AZ EREDMÉNYEK

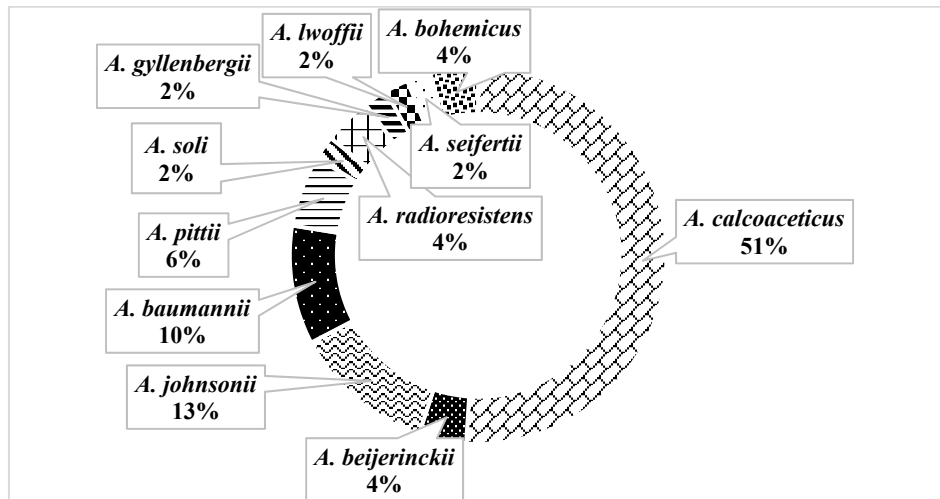
3.1 Az *Acinetobacter* törzsek izolálásának és azonosításának eredményei

A 2008 és 2018 közötti időszakban feldolgozott 403 magyarországi mintából az acinetobacterek kimutatott gyakorisága 12,2% volt, az unikális helyről (Tanzánia) származó, két talajmintából egy-egy *Acinetobacter* fajt sikerült azonosítanom (1. sz. táblázat). Vizsgálataim során összesen 51 *Acinetobacter* törzset azonosítottam.

1. sz. táblázat: Az *Acinetobacter* fajok kimutatási gyakorisága

	Vizsgált magyarországi minták száma	Minták száma, melyekből kimutattam <i>Acinetobacter</i> törzset	Izolált <i>Acinetobacter</i> törzsek száma	Kimutatási gyakoriság (%)
felszín alatti víz	341	27	31	9,1
felszíni víz	28	8	11	39,3
földtani közeg	15	3	3	20
egyéb	19	3	4	21
Összesen	403	41	49	12,2

A Magyarországról kimutatott izolátumok faj szerinti megoszlása a 2. sz ábrán látható. A klinikai jelentőséggel bíró *A. baumannii* fajhoz tartozó törzset a minták ~1%-ában detektáltam.



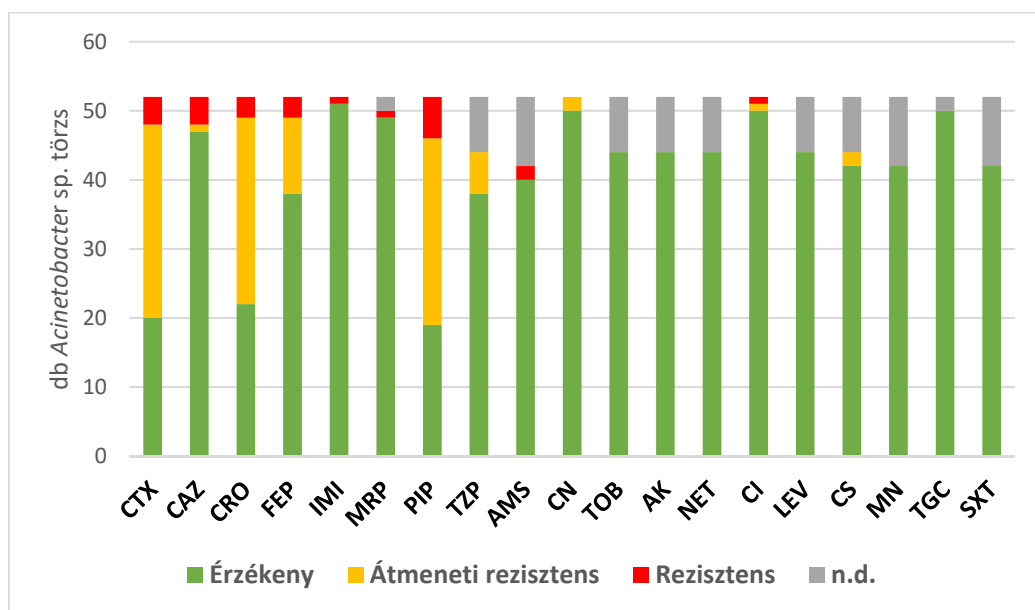
2.sz. ábra: A magyarországi környezeti mintákból izolált és azonosított *Acinetobacter* törzsek százalékos megoszlása fajok szerint (n=49)

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (3.1 fejezet eredményei alapján):

I. tézis: Az *Acinetobacter* fajok magyarországi, környezeti kimutatási gyakorisága 403 minta vizsgálata alapján 12,2% volt. Az *Acinetobacter* nemzetség képviselői elsősorban felszíni és felszín alatti víz környezeti mintákban voltak kimutathatók, a leggyakrabban azonosított faj az *A. calcoaceticus* volt. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtam közre (RADÓ ET AL., 2019).

3.2 Az *Acinetobacter* törzsek antibiotikum rezisztenciájának eredményei

Összesen 52 (51 környezeti-, ATCC 19606 típusú törzs), *Acinetobacter* törzset vontam vizsgálatba az antibiotikum rezisztencia fenotípusos meghatározása céljából. A nemzetközi ajánlások szerint 19 hatóanyagot teszteltem (3. sz. ábra).



3. sz. ábra: A vizsgált hatóanyagokkal szemben rezisztens, átmeneti rezisztens és érzékeny *Acinetobacter* törzsek száma (n=52); CTX- cefotaxim, CAZ-ceftazidim, CRO-ceftriaxon, FEP-cefepim, IMI-imipenem, MRP-meropenem, PIP-piperacillin, TZP-piperacillin/tazobaktám, AMS-ampicillin/szulbaktám, CN-gentamicin, TOB-tobramicin, AK-amikacin, NET-netilmicin, CI-ciprofloxacín, LEV-levofloxacín, CS-kolisztin, MN-minociklin, TGC-tigeciklin, SXT-trimethoprim/szulfamethoxazol; n.d.-nincs adat

Kiemelendők a T3N6 *A. beijerinckii*, a 6/1 és J6 *A. johnsonii*, környezeti törzsek, melyek több, a klinikai terápiában első választásba eső (Karbapenem), vagy alternatív kezelésre javasolt (Penicillin, Fluorokinolon, Cefalosporin, Polimixin)

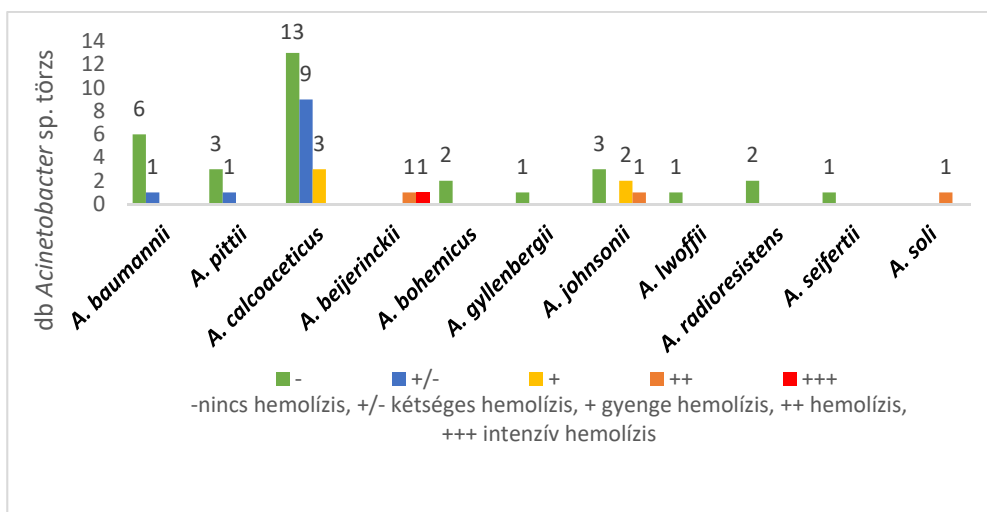
készítménnyel szemben rezisztensek/átmeneti rezisztensek voltak (4. sz. ábra), így megfelelnek a multirezisztencia (MAGIORAKOS ET AL., 2011) kritériumának.

Törzs jele	Minimális gátló koncentráció (µg/ml)																			
	Cefalosporin				Karbapenem		Penicillin			Aminoglikozid				Fluorokinolon		Po- limi- xin	Tetraciklin		Egyéb	
	CTX	CAZ	CRO	FEP	IMI	MRP	PIP	TZP	AMS	CN	TOB	AK	NET	CI	LEV	CS	MN	TGC	SXT	
T3N6	>256	>256	>256	48	>32	>32	24	64	32	0.38	1	3	0.5	0.75	0.25	3	0.032	0.023	0.064	
J6	>256	>256	128	>256	0.5	0.19	6	8	>256	0.19	0.5	0.064	0.032	2	0.75	1	0.19	0.094	0.032	
6/1	>256	>256	>256	24	0.5	0.38	>256	3	6	0.75	0.125	0.19	0.064	6	0.032	1,5	<0.016	0.023	0.064	
	rezisztens				átmeneti rezisztens					érzékeny										

4. sz. ábra: A T3N6, J6 és 6/1 *Acinetobacter* törzsek részletes antibiotikum rezisztencia eredményei; CTX-cefotaxim, CAZ-ceftazidim, CRO-ceftriaxon, FEP-cefepim, IMI-imipenem, MRP-meropenem, PIP-piperacillin, TZP-piperacillin/tazobaktám, AMS-ampicillin/szulbaktám, CN-gentamicin, TOB-tobramicin, AK-amikacin, NET-netilmicin, CI-ciprofloxacín, LEV-levofloxacín, CS-kolisztin, MN-minociklin, TGC-tigeciklin, SXT-trimethoprim/sulfamethoxazol;

A Karbapenem hidrolizáló enzim(ek) termeléséért felelős *bla_{OXA-51}* génszakasz jelenlétét mind a 7 *A. baumannii* törzs esetében kimutattam.

3.3 Az *Acinetobacter* törzsek hemolitikus aktivitás vizsgálatának eredményei



5. sz. ábra: A hemolitikus aktivitás vizsgálat eredményei a kísérletbe vont *Acinetobacter* izolátumokra faj szinten és darabszámra vonatkoztatva (n=52)

A hemolitikus aktivitás vizsgálata során 52 izolátumból 48 törzs mutatott növekedést a véragaron, azonban különböző mértékű béta hemolízist csak 9 esetben (T3N6, Z4N3 - *A. beijerinckii*; Z4SZ2, MT-6, FK-3/1 - *A. johnsonii*; PT2/2, 22, FK-3/0 - *A. calcoaceticus*; II H-4/2 - *A. soli*) figyelhettem meg (5. sz. ábra). További 11

törzsnél a 22 órás leolvasás után kétséges volt a hemolízis a mértéke. A törzsek 61,5%-a tehát nem mutatott hemolízisre utaló jelet.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (3.2 és 3.3 fejezet eredményei alapján):

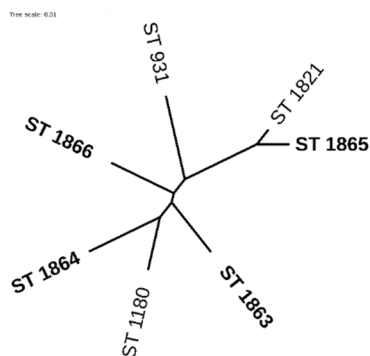
II. tézis: Elsőként mutattam ki az *Acinetobacter beijerinckii* fajhoz tartozó, környezeti eredetű multirezisztens törzset (T3N6), mely egyben intenzív béta-hemolízisre is képes, továbbá elsőként igazoltam az *Acinetobacter soli* faj esetében hemolitikus aktivitást. Az eredményeket nemzetközi publikációban adtam közre (RADÓ ET AL., 2019).

3.4 Az *Acinetobacter* törzsek biofilm képző képesség vizsgálatának eredményei

48 h mérés során 52/3 *Acinetobacter* törzs rendelkezett erős biofilm képző képességgel, melyek közül a TZCO3 *A. pittii* és TZSO1 *A. baumannii* izolátum a 24, 72, 96 h mérési időpontban is erős biofilm képzést mutatott. A J4 *A. calcoaceticus* a 24 és 48 h mérés során erős, a 72 és 96 h időpontban gyenge és közepes biofilm termelést produkált. Az összes vizsgált faj közül az *A. baumannii* és *A. pittii* fajok voltak a legaktívabbak a biofilm képzés tekintetében.

3.5 Az *Acinetobacter* törzsek MLST vizsgálatának eredményei

A Multilokusz Szekvencia Tipizáló Módszerrel hat környezeti eredetű *A. baumannii* izolátumot és a faj típus-törzsét vizsgáltam. Három törzshöz (Sk-V/3, II HT-3/1, ATCC 19606) a pubmlst.org adatbázisban már létező szekvencia típusszámot (ST) rendeltek. További négy esetben (HT-4/1, HT-4/3, JBBV, TZSO1) újonnan generált ST számot kaptak törzseim (6. sz. ábra), azaz a vonatkozó szekvencia típust (allélszámok kombinációját) előttem még nem írták le.



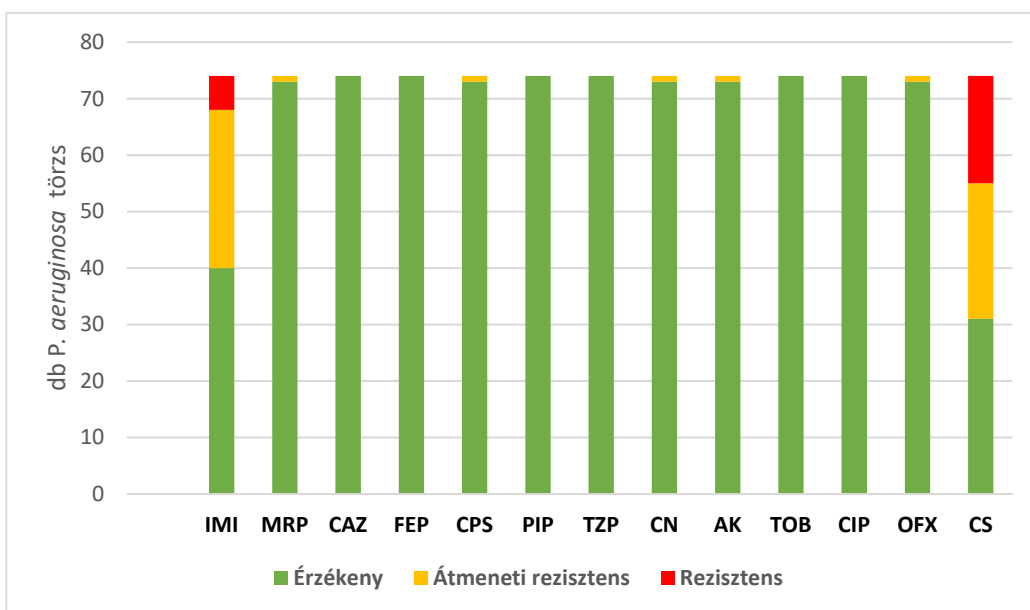
6. sz. ábra: A vizsgálatba vont *A. baumannii* törzsek rokonsági kapcsolata alapján generált dendrogram (iTOL v3.6, unrooted display mode); félkövér betűtípus: új ST számok

3.6 A *P. aeruginosa* törzsek izolálásának és azonosításának eredményei

A 2008-2018 időszakban 73 *P. aeruginosa* törzset izoláltam és identifikáltam, melyekből 64 törzs felszín alatti víz, földtani közeg vagy komposzt és 9 izolátum felszíni víz mintából származott. A felszíni vízminták esetében (92 számú minta) a *P. aeruginosa* csupán a minták 5,4%-ában volt kimutatható.

3.7 A *P. aeruginosa* törzsek antibiotikum rezisztenciájának eredményei

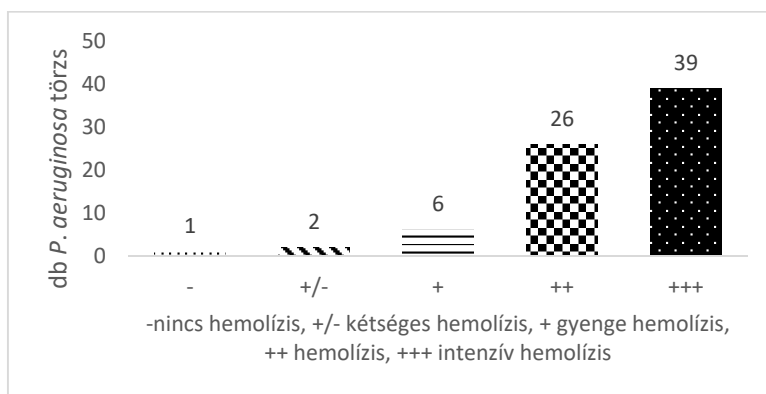
74 *P. aeruginosa* törzs (73 környezeti, KPS-3 klinikai) esetében végeztem antibiotikum rezisztencia megállapítására fenotípusos tesztet (6 hatóanyagcsoport 13 hatóanyag - 7. sz. ábra). A vizsgált szerek közül kiemelendő az imipenem, mellyel szemben 6 törzs (8,3%) rezisztens, 28 törzs (38,6%) átmeneti rezisztens volt, illetve a kolisztin, ahol 24 törzs (31,5%) átmeneti rezisztenciát, 19 izolátum (25,6%) pedig rezisztenciát mutatott.



7. sz. ábra: A vizsgált hatóanyagokkal szemben rezisztens, átmeneti rezisztens és érzékeny *Pseudomonas aeruginosa* törzsek száma (n=74); CPS-cefoperazon/szulbaktám, CAZ-ceftazidim, FEP-cefepim, IMI-imipenem, MRP-meropenem, PIP-piperacillin, TZP-piperacillin/tazobaktám, CN-gentamicin, TOB-tobramicin, AK-amikacin, CIP-ciprofloxacín, OFX-ofloxacin, CS-kolisztin; n.d.-nincs adat

3.8 A *P. aeruginosa* hemolitikus aktivitás vizsgálatának eredményei

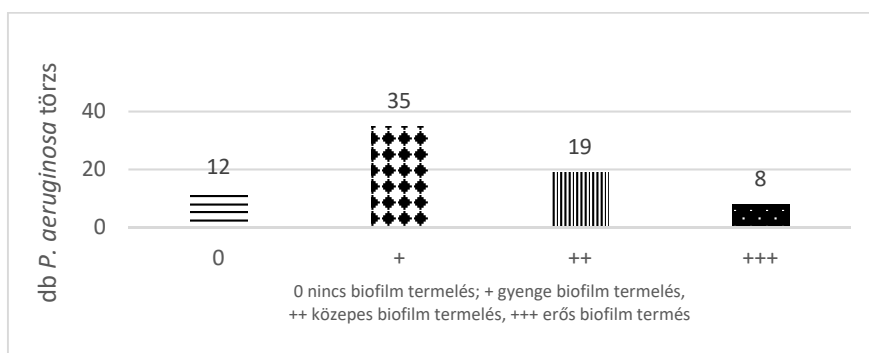
A 74 *P. aeruginosa* törzsnél, a P156-os izolátum kivételével, különböző mértékű béta hemolízist minden esetben megfigyeltem (8. sz. ábra).



8. sz. ábra: A hemolitikus aktivitás vizsgálat eredményei a 74 *P. aeruginosa* törzs esetében

3.9 A *P. aeruginosa* törzsek biofilm képző képesség vizsgálatának eredményei

74 *P. aeruginosa* törzs esetében, 48 h után a törzsek 10,8%-a (74/8) mutatott erős biofilm képzést mikrotiter lemezes módszerrel (9. sz. ábra).



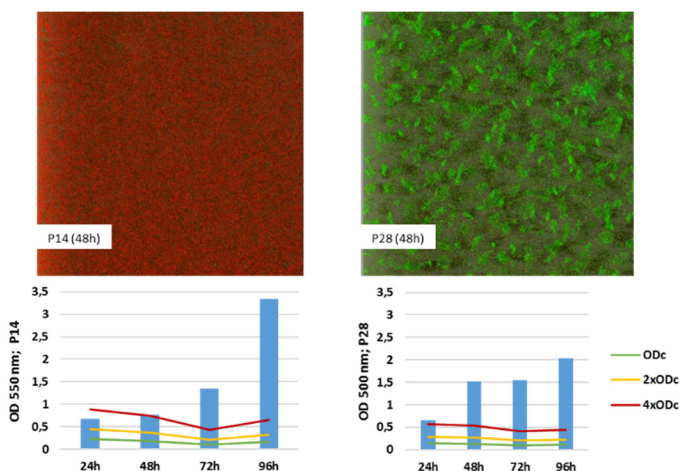
9. sz. ábra: A mikrotiter lemezes módszerrel mért biofilm képző képesség vizsgálatának 48 h után mért eredményei 74 *P. aeruginosa* törzs esetében

3.10 A *P. aeruginosa* törzsekkel végzett komplex vizsgálati kör eredményei

A továbbiakban bemutatott egyes vizsgálatokba 46 *P. aeruginosa* törzset (44 környezeti, 2 klinikai: ATCC 27853, KPS-3 kórházi izolátum) vontam be - a tanszéki, körülbelül 200 tagot számláló törzsgyűjteményből - különböző antibiotikum rezisztencia profiljuk, származási helyük és idejük alapján.

Biofilm képző képesség – mikrotiter lemezes módszer és konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (CLSM) összehasonlítása:

A mikrotiter lemezen az adhézióval feltapadt, majd visszaoldott sejtek denzitását mértem, míg a konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készült képek a törzsek vizuálisan detektálható élő/holt sejtjeit és a formálódó biofilm struktúráját ábrázolták. Az eredmények szerint, a mikrotiter lemezeken kialakuló és a festést követően visszamérhető sejt-tömeg nem minden esetben jelent biofilm képződést. Néhány esetben csak a holt planktonikus sejtek felhalmozódását detektáltam biofilm képződésként, mely jelenséget a 10. sz. ábrán a P14 és P28 törzsek példáján mutatom be. Mindkét esetben erős biofilm képződést jegyeztem a mikrotiter módszerrel, azonban a háromdimenziós felvétel alapján egyértelműen látszik, hogy a P14 esetében a holt (piros színnel festődő) planktonikus sejtek felhalmozódása, míg a P28 törzsnél strukturált, élő sejt (zöld színnel festődő) biofilm képződés figyelhető meg. Az eredményeket statisztikailag is összehasonlítottam egyszempontos varianciaanalízissel és szignifikáns korrelációt tapasztaltam a két módszer között. Részletes elemzés alapján a mikrotiter módszer fals negatív eredményt nem ad, pozitív irányban azonban több alkalommal tévedett (44/14 fals pozitív, azaz 31,8% fals eredmény). A téves detektálások 100%-ban holt planktonikus sejtek felhalmozódásából adódtak.



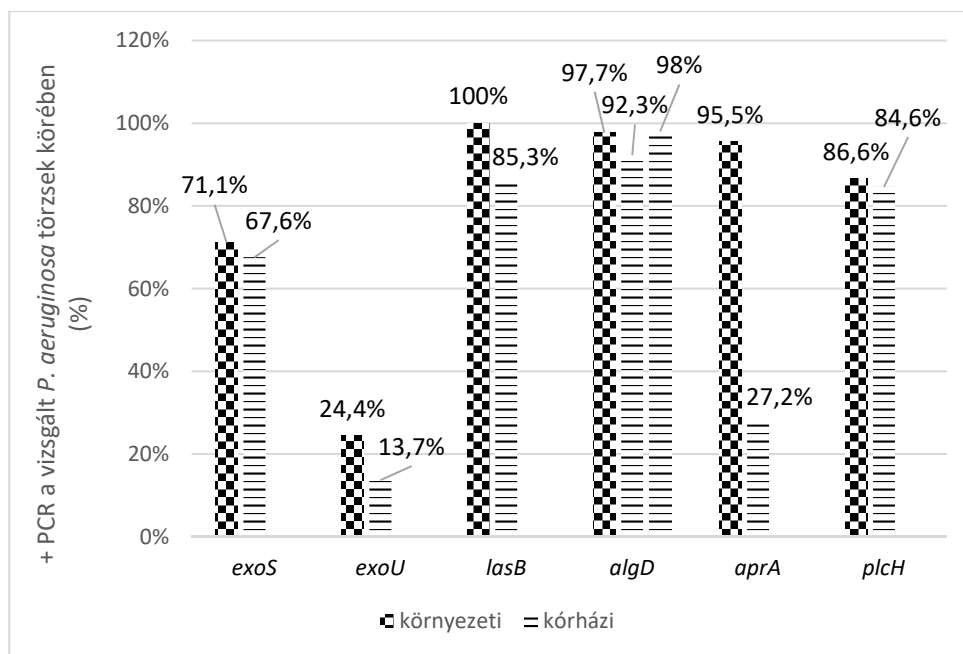
10. sz. ábra: A planktonikus sejtek felhalmozódása (P14) és a biofilm képző képesség (P28) környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek esetében konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal és mikroplate módszerrel vizsgálva. ODc: a kontroll átlaga plusz a kontroll szórásának háromszorosa.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (3.10 fejezet eredményei alapján):

III. tézis: A környezeti *P. aeruginosa* törzsek mikrotiter lemezes módszerrel mért biofilm képző képessége a konfokális lézer pásztázó mikroszkópos felvételek szerint nem minden esetben strukturált biofilm, az esetek 31,8%-ában csupán a holt planktonikus sejtek felhalmozódása.

A virulencia gének vizsgálatának eredményei:

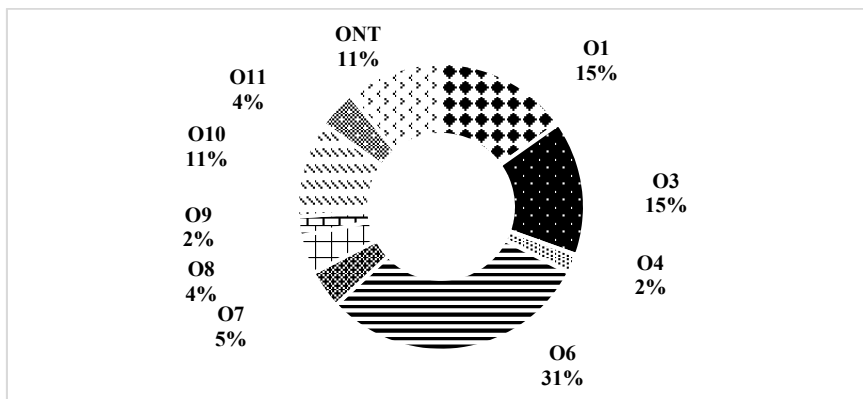
45 *P. aeruginosa* törzs esetében vizsgáltam az *exoS*, *exoU* exoenzimek, valamint a *lasB*, *algD*, *aprA* és *plcH* virulenciával összefüggésben lévő gének jelenlétét. A gének környezeti és szakirodalmi adatok alapján kórházi kimutathatóságának százalékos aránya a 11. sz ábrán látható.



11. sz. ábra: A vizsgált, környezeti *P. aeruginosa* törzsek körében kimutatott virulencia gének százalékos aránya (n=45) és a klinikai környezetben tapasztalt kimutatási arány (FAZELI&MOMTAZ, 2014; ROSHANI-ASL ET AL., 2018; GEORGESCU ET AL., 2016; TAE ET AL., 2014; HASSUNA, 2016)

A szerotipizálás eredményei:

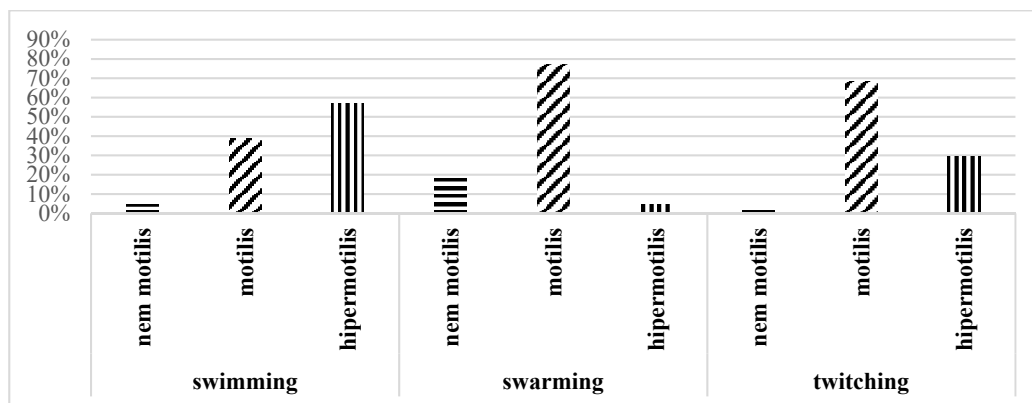
46 *P. aeruginosa* törzset szerotipizáltunk, melynek eredményeként 10 különböző szerocsoportba soroltuk vizsgált környezeti izolátumainkat (12. sz. ábra).



12. sz. ábra: A szerocsoportok előfordulásának százalékos megoszlása a vizsgált környezeti *P. aeruginosa* törzsek körében (n=46)

A motilitás vizsgálatának eredményei:

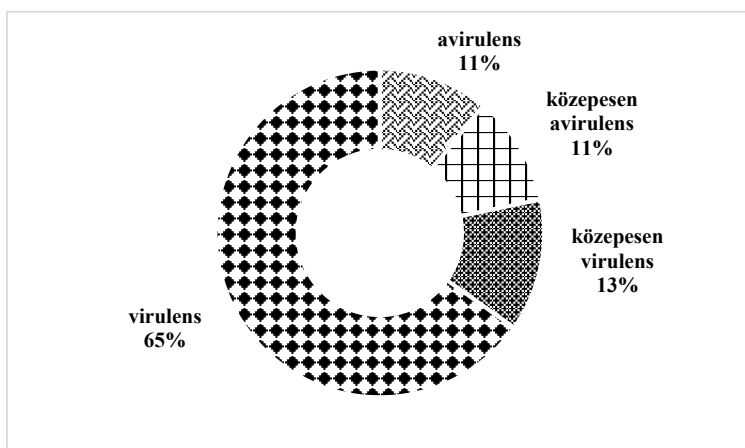
44 környezeti *P. aeruginosa* izolátum az alábbi arányban volt motilis a különböző (swimming, swarming, twitching) mozgásformákban (13. sz. ábra).



13. sz. ábra: A környezeti *P. aeruginosa* törzsek motilitás vizsgálatának eredményei százalékos eloszlásban (n=44)

A *Galleria mellonella* teszt eredményei:

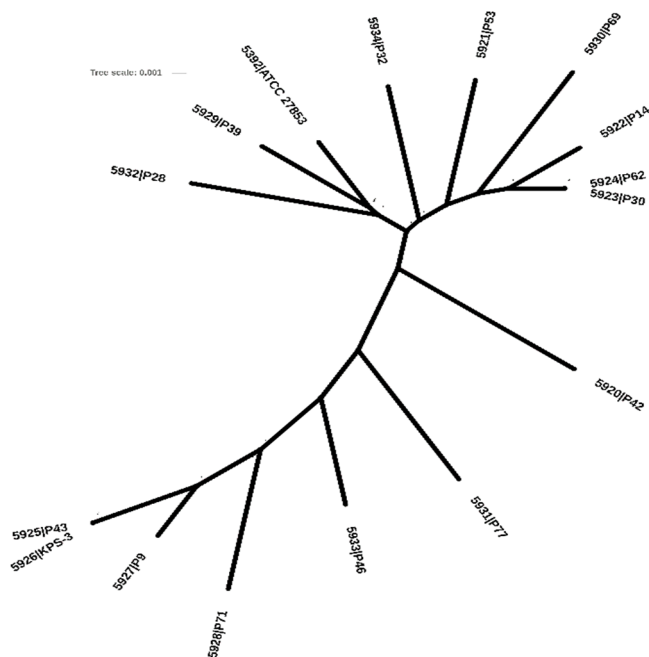
A törzsek 11%-a avirulens (0-25% mortalitás), 11%-a közepesen avirulens (25-50% mortalitás), 13%-a közepesen virulens (50-75% mortalitás) volt, míg 65% a virulens csoportba került az eredmények kiértékelése után, azaz esetükben a tesztorganizmusok 75-100%-a pusztult el 48 óra elteltével (14. sz. ábra).



14. sz. ábra: A *G. mellonella* modellszervezeten vizsgált virulencia eredmények megoszlása a *P. aeruginosa* törzsek körében (n=46)

Az MLST módszer eredményei:

A 16 (14 környezeti és 2 kórházi) vizsgálatba vont *P. aeruginosa* törzs közül 12 izolátumhoz korábban már adatbázisban szereplő, 4 törzshöz (P14, P32, P39, P46)



15. sz. ábra: A vizsgálatba vont *P. aeruginosa* törzsek rokonsági kapcsolata alapján generált dendrogram (iTOL v3.6, unrooted display mode)

pedig a pubmlst.org adatbázisban újonnan generált szekvencia típusszámot (ST) rendeltek az általam meghatározott allélikus profil alapján. A korábban, más izolátumokhoz rendelt ST számok adatai szerint a P28, P53, P69, P30, P62, P42, P77, P9, P43 és ATCC27853, valamint a KPS-3 jelölésű törzsek olyan izolátumokkal osztoztak ST számukon, melyeket cisztás fibrózisban

(CF) szenvedő betegekből azonosítottak földrajzilag igen különböző helyekről. A törzseket ábrázoló filogenetikai fa a 15. sz. ábrán látható.

A PFGE vizsgálat eredményei:

A 44 környezeti törzs PFGE tipizálásának eredményeképpen (16. sz. ábra) vizsgáltuk a törzsek egymáshoz viszonyított kapcsolatát (P66, P78, P77, P106 azonos PFGE típus, továbbá P79-P46, P42-P60, P113-P169, P14-P18, P62-P30, P119-P125 szintén azonos típus), illetve az Országos Epidemiológiai Központ adatbázisának összehasonlításával kapcsolatot találtunk hazai, klinikai izolátumokkal (P16, P80, P174 PFGE profilja 84-88% homológiát, míg a P59, P119, P124, P125 és P172 85-95% homológiát mutatott klinikai izolátumokkal, mely találkozott a Tenover kritériumokkal is, így a törzsek közös eredete feltételezhető). A környezeti törzsek PFGE típusa 40,9%-ban nem mutatott kapcsolatot sem egymással, sem az adatbázisban szereplő kórházi izolátumokkal.

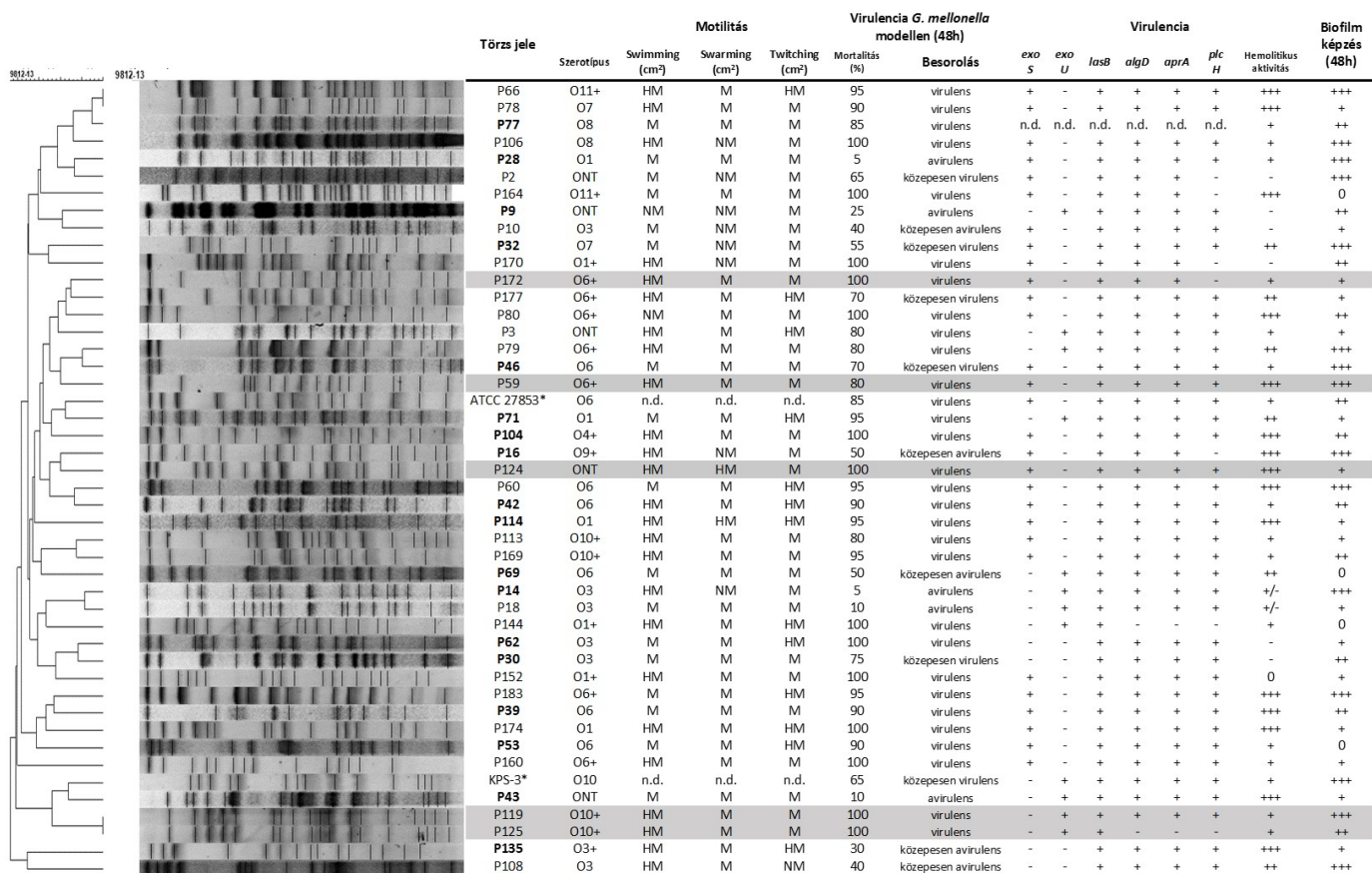
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (3.10 fejezet eredményei alapján):

IV. tézis: A környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek filogenetikai (MLST, PFGE) vizsgálata alapján először mutattam ki Magyarországról származó környezeti törzsek és a világ különböző pontjain regisztrált, cisztás fibrózishoz köthető, valamint hazai, nozokomiális fertőzésekből izolált törzsek között rokonsági kapcsolatot. Eredményeim nemzetközi folyóiratban publikáltam (RADÓ ET AL., 2017)

3.11 A *P. aeruginosa* törzsek eredményeinek összehasonlító értékelése

Az antibiotikum rezisztencia és a *Galleria mellonella* tesztben mutatott virulencia összefüggései (n=46):

Statisztikai értékelés alapján a környezeti törzsek öt antibiotikummal (gentamicin, imipenem, cefepim, ceftazidim, cefoperazon-szulbaktám) szemben detektált rezisztenciája mutatott szignifikáns, negatív előjelű (inverz) korrelációt a *G. mellonella* tesztben tapasztalt virulenciával. Tehát a magasabb minimális gátló koncentráció alacsonyabb letalitáshoz vezetett az *in vivo* kísérlet során.



sürke mező – klinikai izolátumokkal azonos PFGE profil; félkövér betűtípus – rezisztens törzsek; n.d. – no data/ nincs adat; *klinikai referencia törzsek; Motilitás: NM- nem motilis, M-motilis, HM- hipermotilis; Virulencia: + pozitív PCR, - negatív PCR; Hemolitikus aktivitás: - nincs hemolízis, + gyenge hemolízis, ++ hemolízis, +++ intenzív hemolízis; Biofilm képző képesség mikrotiter lemez módszer: - nincs biofilm termelés, + gyenge biofilm termelés, ++ közepes biofilm termelés, +++ erős biofilm termelés

16. sz. ábra: A PFGE vizsgálat alapján felállított filogenetikai fa, és a 46 *P. aeruginosa* törzs egyéb kísérletekben (szerotípus, motilitás, virulencia *Galleria mellonella* modellen, virulencia gének, hemolitikus aktivitás, biofilm képző képesség mikrotiter lemez módszerrel) mutatott eredményei

A motilitási formák és a *Galleria mellonella* tesztben mutatott virulencia összefüggései (n=46):

A twitching mozgás mutatott szignifikáns, pozitív korrelációt a *G. mellonella* modellben vizsgált virulenciával összefüggésben, azaz a twitching szempontjából hipermotilis törzsek virulenciája nagyobb volt. A vizsgált motilitási formák (swimming, swarming, twitching) bármelyikében mutatott mozgás képessége növelte a tesztstruktúra pusztulásának arányát, ami azt jelenti, hogy a twitching mozgásforma invázióban játszott szerepét részben akár helyettesítheti a swimming/swarming esetében jelentkező motilitás/ hipermotilitás. Ezt igazolja az is, hogy a hipermotilitás képessége egy esetet kivéve (P14) teljesen hiányzott az avirulens törzsekből.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (3.10.1 fejezet eredményei alapján):

V. tézis: A környezeti *P. aeruginosa* törzsek motilitása szerepet játszik a *G. mellonella* tesztstruktúrára gyakorolt fertőzés kimenetelében (letalitás). A hipermotilitás és a twitching típusú mozgásforma a fenotípusos virulencia teszt eredményeivel pozitív korrelációban van.

A szerotipizálás eredményei és a *Galleria mellonella* tesztben mutatott virulencia (n=46), illetve a szerotípusok és az MLST vizsgálat eredményeinek összefüggései (n=16):

A klinikumban releváns szerotípusokhoz (O1, O6, O10, O11) tartozó törzsek átlagosan magasabb pusztulási arányt okoztak, mint az egyéb szerotípusok (O3, O4, O7, O8, O9) vagy a nem szerotipizálható (ONT) izolátumok (17. sz ábra). Az igen nagy szórás értékek miatt azonban a különbség nem szignifikáns. Szakirodalmi források szerint az O1 szerotípushoz tartozó törzsek által okozott fertőzések súlyosabb kimenetelűek (LU ET AL., 2014), amit a *G. mellonella* teszt eredményei is igazoltak.

A virulencia gének jelenléte és a hemolitikus aktivitás, a *Galleria mellonella* teszt eredményei, illetve a szerotípusok összefüggéseinek elemzése (n=46):

46 törzsnél vizsgált virulencia gének (*lasB*, *algD*, *aprA*, *plcH*, *exoS*, *exoU*) és a hemolitikus aktivitás megjelenése a statisztikai elemzés alapján nem mutatott összefüggést a *G. mellonella* tesztben kapott mortalitási eredményekkel (kivéve *exoS* és *exoU* gén egyidejű hiánya - P108, P135). Sikerült azonosítanunk egy a tudomány számára új profillal rendelkező környezeti *P. aeruginosa* törzset is (P71): *exoU* gént hordozó, O1 szerotípusú izolátumról tudomásunk szerint eddig nem számoltak be. A *G. mellonella* teszt és a virulencia faktorok vizsgálata alapján az a feltevés, miszerint az egyes rezisztencia gének, mint virulencia faktorok jelenlétéből, vagy hiányából próbáljunk következtetni az adott törzs patogenitására, ahogyan azt számos esetben teszik a nemzetközi irodalom példái alapján (DIVYA ET AL., 2018; RADHAPRIYA ET AL., 2015), nem helytálló.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (3.10.1 fejezet eredményei alapján):

VI. tézis: Először mutattam ki klinikai és környezeti törzsek esetében az *exoU* gént O1 szerocsoportoz tartozó *P. aeruginosa* izolátumnál, mely Debrecenből, szénhidrogénnel szennyezett felszín alatti víz mintából származik. Eredményeimet nemzetközi publikációban adtam közre (RADÓ ET AL., 2017).

A környezeti *P. aeruginosa* törzsek jellemzése a PFGE alapján felállított filogenetikai fa és különböző vizsgálati irányok szerint (n=46):

A *G. mellonella* tesztben virulens és antibiotikum rezisztens törzsek véletlenszerűen helyezkedtek el a PFGE alapján felállított filogenetikai fán (16. sz. ábra). A virulencia gének birtoklása, továbbá a biofilm képző képesség és a motilitás alapján sem tudtam szignifikáns összefüggést találni a pulse-field típus alapján felvázolt filogenetikai kapcsolatokkal. Az PFGE alapján azonos klónba tartozó környezeti törzsek rendelkezhetnek különböző *exoS/exoU* profillal, biofilm képző képességgel, hemolitikus aktivitással vagy motilitási tulajdonságokkal, illetve tartozhatnak különböző szerotípusba.

A PFGE eredmények alapján rokon környezeti és kórházi *P. aeruginosa* törzsek jellemzése különböző vizsgálati irányok szerint (n=5):

A PFGE vizsgálatok alapján az NNK adatbázisában szereplő, klinikai izolátumokkal közeli rokonságot mutató törzsek eredményei szerint a klinikai izolátumokkal közeli/azonos PFGE típusba sorolt környezeti törzsek (P59, P119, P124, P125, P172) egyéb tulajdonságokban is hasonlítottak. Hipermotilitást/motilitást mutattak a swimming/swarming/twitching mozgásformákban. Földrajzi eredet alapján még az azonos PFGE típusba tartozó törzsek között sem volt összefüggés. A humán patogén, klinikai törzsekkel egyező környezeti izolátumoknál a virulencia genotípus és fenotípus alapján is igazolt. A virulencia gén profil, hemolitikus aktivitás, biofilm képző képesség eltért, bár mindegyikük birtokolta a *lasB*, vagy az *exoS/exoU* génszakaszok egyikét. Többségük az O6 és O10 szerocsoporthoz tartozott, melyek klinikai jelentőségét szakirodalmi források igazolják.

A PFGE és az MLST vizsgálatok összevetése (n=16):

14 környezeti és 2 klinikai törzs esetében mindkét vizsgálati módszert alkalmaztam, mely szerint az ST szám egyezés a PFGE típusok szoros kapcsolatát is jelzi, ám fordítva ez a megállapítás nem igaz. Mindezek alapján a környezeti törzsek genotipizálása esetében (szakirodalmi ajánlásokkal összhangban) földrajzilag eltérő származású törzsek klonális kapcsolatrendszerének feltárására az MLST, azonos területről származó izolátumok genetikai változásainak nyomon követésére pedig a diszkriminatívabb PFGE módszer javasolható.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY (3. fejezet eredményei alapján):

VII. tézis: A környezeti *P. aeruginosa* törzsek virulencia, antibiotikum rezisztencia, biofilm képző és filogenetikai tulajdonságainak komplex, statisztikai alapokon nyugvó elemzése alapján megállapítottam, hogy nincs olyan virulencia, rezisztencia, vagy biofilm képzéssel összefüggő faktor, melynek detektálásával egy adott törzs környezet- vagy humánegészségügyi

kockázata egyértelműen megítélhető lenne. Eredményeim alapján az általam áttekintett fenotípusos, vagy molekuláris genetikai módszerek között nem áll rendelkezésre olyan, mellyel egy adott *P. aeruginosa* törzs biológiai biztonsága garantálható lenne.

4. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Doktori munkám során megállapítottam, hogy több mint 400 környezeti minta vizsgálata alapján az *Acinetobacter baumannii* környezeti gyakorisága mindössze 1%, kimutatása pedig hazai éghajlati viszonyok között elsősorban felszíni vízhez kötődő minták esetében volt sikeres. Minden vizsgált törzsből jelent volt a *bla_{OXA-51}* karbapenem-hidrolizáló enzim termeléséért felelős gén, azonban a klinikai terápiában alkalmazott antibiotikum hatóanyagokkal szemben a faj képviselői egy esetben sem mutattak fenotípusosan megnyilvánuló rezisztenciát. A vizsgált *A. baumannii* törzsek gyenge vagy közepes biofilm képző képességgel rendelkeztek, hemolitikus aktivitást nem mutattak. A Multilokusz Szekvencia Tipizáló módszer eredményei szerint a nemzetközi adatbázisban fellelhető adatokkal két esetben találtam egyezést (ismeretlen eredetű orosz; amerikai, állati eredetű minta), mely nem nyújt elegendő információt az *A. baumannii* környezeti törzsek rokonsági kapcsolatainak feltárásához. Az *Acinetobacter* nemzetség egyéb fajait illetően, a 403 minta vizsgálata alapján, magyarországi viszonyok között 11 különböző speciést izoláltam, a leggyakrabban kimutatott faj az *A. calcoaceticus* volt. Az antibiotikum rezisztencia fenotípusos vizsgálata során két fajhoz (*A. beijerinckii*, *A. johnsonii*) tartozó, három környezeti törzs mutatott legalább három hatóanyagcsoporttal szemben antibiotikum rezisztenciát, teljesítve ezzel a multirezisztencia kritériumait (MAGIORAKOS ET AL., 2011). Az *A. beijerinckii* faj képviselői közül tudomásunk szerint először jelentettünk multirezisztens és egyben hemolitikus aktivitással bíró törzset, mely jelzi, hogy a növekvő jelentőségű, adott esetben többszörösen rezisztens patogén mikroorganizmusok rezervoárjai nem csupán a kórházak, hanem a külső környezet is lehet.

A *P. aeruginosa* esetében munkám eredményeként ismereteket szerezhettünk a faj eddig kevésbé vizsgált szerepéről felszíni vizekben, ahol kimutatási gyakorisága 5,4% volt. Felszín alatti, felszíni víz, földtani közeg és komposzt mintákból összesen 73 törzset izoláltam, valamint különböző vizsgálatokat végeztem a tanszéki törzsgyűjtemény 46 tagjával.

Összesen négy, a szakirodalom alapján klinikailag is jelentős szerotípust jegyeztem környezeti izolátumaim körében (O1-15%, O6-31%, O10-11%, O11-4%) és további 6, a rendelkezésre álló információk alapján klinikailag nem releváns szerotípusba (O3, O4, O7, O8, O9, ONT) soroltam törzseimet. Leggyakoribbnak az O6 szerotípus bizonyult. A környezeti antibiotikum rezisztencia a klinikai viszonyokhoz hasonlóan elsősorban az egyik vizsgált Karbapenem hatóanyag (imipenem), valamint a kolisztin esetében kiterjedt: a vizsgált törzsek 8,3% és 25,6%-a rezisztenciát, míg 38,88% és 32,4% átmeneti rezisztenciát mutatott. A *P. aeruginosa* biofilm képző képességének megállapítását célzó, mikrotiter lemez módszerrel végzett vizsgálatokat lehetőségem volt kiegészíteni konfokális lézer pásztázó mikroszkópos felvételekkel, melyek alapján felülvizsgáltam a mikrotiter lemezes módszer eredményeinek megbízhatóságát. A *lasB*, *algD* és *aprA* virulenciagének jelenléte a vizsgált környezeti *P. aeruginosa* törzsek vonatkozásában általánosnak tekinthető, detektálási arányuk pedig adott esetben meghaladhatja a klinikai körülmények között jellemző szintet. Az invazív jelleggel társított *exoS* gén 32 törzsnél (71,1%), míg a citotoxicitással összefüggésbe hozott *exoU* 11 izolátum (24,4%) esetében volt kimutatható. Ismertté vált *exoS/exoU* génszakaszokat egyaránt nélkülöző környezeti genotípus. Megállapítottam, hogy a *G. mellonella* vizsgálati rendszerben mutatott virulenciával az egyes virulencia gének jelenléte, vagy hiánya nincs statisztikailag szignifikáns összefüggésben; az egyetlen kivételt az *exoU* és *exoS* gének egyidejű hiánya jelentette, mely szignifikánsan kisebb letalitást eredményezett az alkalmazott tesztben. A *plcH*, mely a hemolitikus aktivitásban szerepet játszó foszfolipáz C kódolásáért felelős gén, a környezeti izolátumok több mint 13%-ánál hiányzott ám a génszakasz jelenléte, vagy hiánya nem volt összefüggésben a Columbia véragaron fenotípusosan tapasztalt béta-hemolízissel. Összefoglalva megállapítható, hogy az a feltevés, miszerint egyes virulencia gének, mint virulencia faktorok jelenlétéből, vagy hiányából próbáljunk következtetni az adott törzs patogenitására, ahogyan azt számos esetben teszik a nemzetközi irodalom példái alapján (DIVYA ET AL., 2018; RADHAPRIYA ET AL.,

2015), vizsgálataim szerint nem helytálló. A virulencia faktorok folyamatos vizsgálata kiemelt feladat a jövőben is, hiszen az éghajlati és környezeti változásokkal az egyes faktorok/gének megnyilvánulása, a génekészlet összetétele is új irányt vehet, aminek nyomon követése hiánypótló adatokkal szolgálhat. Filogenetikai vizsgálatokkal megállapítottam, hogy az általam vizsgált környezeti *P. aeruginosa* törzsek MLST profiljuk alapján cisztás fibrózisból származó izolátumokkal mutatnak rokonságot, míg a PFGE típusok alapján hazai, klinikai fertőzésekből származó mintákkal találtam 5 esetben közös eredetre utaló típusegyezést. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a klinikai és környezeti törzsek nem teljesen elkülönülő filogenetikai csoportokat alkotnak és több lehetséges útvonalon kapcsolódhatnak.

46 környezeti *P. aeruginosa* törzset részletes vizsgálatoknak vettem alá, melyek eredményeképpen megállapítottam, hogy a különböző tulajdonságok, mint antibiotikum rezisztencia, virulencia, biofilm képző képesség, szerotípus, motilitás – melyek mind közre játszanak vagy részt vesznek egy baktérium patogénként való megítélésében vagy egy fertőzés kimenetelében – nem mutat összefüggést sem az MLST, sem a PFGE módszerrel megállapított genetikai ujjlenyomattal. A vizsgált tulajdonságok sok esetben egymástól függetlenül jelennek meg, mely tovább hangsúlyozza a faj esetében ismert és elterjedt, mobilis genetikai elemek szerepét.

A fenotípusosan kifejeződő virulencia vizsgálatára alkalmazott *G. mellonella* teszt kapcsán munkám során megállapítottam, hogy a vizsgált környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek döntő hányada (78%) az alkalmazott tesztstruktúrára nézve közepesen virulens/virulens volt. Az O1 szerotípushoz tartozó törzsek, melyek a klinikai adatok alapján súlyosabb kimenetelű fertőzéseket okoznak a *G. mellonella* teszt eredményei alapján is kifejezett virulenciával jellemezhetők. Megállapítást nyert, hogy a környezeti törzsek esetében tapasztalt fenotípusos virulencia pozitív korrelációban van a twitching típusú mozgásforma esetében tapasztalt aktivitással, valamint a vizsgált három mozgásforma bármelyikének esetében tapasztalt hipermotilitással. Ez az információ is jelzi, hogy a motilitás nem csupán az

invázióban játszik szerepet, hanem az alkalmazott tesztstruktúra esetében kialakult fertőzés kimenetelében (letalitás) is jelentőséggel bír. Igazoltam, hogy az antibiotikum rezisztencia több, klinikailag releváns hatóanyag (gentamicin, imipenem, cefepim, ceftazidim, cefoperazon-szulbaktám) esetében is szignifikánsan csökkenti a *G. mellonella* tesztstruktúrára gyakorolt virulenciát.

Vizsgálati eredményeim megerősítik a hazai jogi szabályozásban fennálló szigorú megítélését a *P. aeruginosa* fajnak, javasolt lenne azonban a nemzetközi környezetvédelmi szabályozásban is hasonló követelmények állítása. Az *Acinetobacter* nemzetség esetében nem találtam semmilyen specifikus kitélt a magyar jogszabályokban, azonban ajánlott lenne a nemzetség, különös tekintettel az *A. baumannii* faj jogszabályba való beemelése, szigorúbb megítélése a jövőben, főképp az ivóvízminőség és a mikrobiális készítmények engedélyezésének tekintetében.

5. IRODALOMJEGYZÉK

- AJAYI, T., ALLMOND, L.R., SAWA, T., WIENER-KRONISH, J. P. (2003): Single-nucleotide-polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 3526–3531.
- BADAMCI, A., MASOUMI, H., JAVADINIA, S., ASGARIAN, R., TABATABAEE, A. (2017): Molecular detection of six virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in children with urinary tract infection. *Microbial Pathogenesis*, 107:44–47.
- BARTUAL, S.G., SEIFERT, H., HIPPLER, C., LUZON, M. A., WISPLINGHOFF, H., RODRIGUEZ-VALERA, F. (2005): Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (6): 2101.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (2017): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- CURRAN, B., JONAS, D., GRUNDMANN, H., PITT, T., DOWSON, C. G. (2004): Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12):5644–5649.
- DIVYA, J., MOHANDAS, A., SINGH, B. (2018): A non-pathogenic environmental isolate of *Pseudomonas aeruginosa* MCCB 123 with biotechnological potential. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, 7: 3060–3071.
- DUUREN, J., MÜSKEN, M., KARGE, B., TOMASCH, J., WITTMANN, C., HAUSSLER, S., BRÖNSTRUP (2017): Use of Single-Frequency Impedance Spectroscopy to Characterize the Growth Dynamics of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Scientific Reports*, 7: 5223.
- KUMARI, A. M. S., ROURAY, A., YADAV, D., MADHAVAN, R. (2013): Imipenem resistance and biofilm production in *Acinetobacter*. *Drug Invention Today*, 5: 256–258.
- LANE, D.J. (1991): 16S/23S rRNA sequencing. in *Nucleic Acid Techniques In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (eds.): Bacterial Systematics*. Wiley, New York, 115–175 p.
- LANOTTE, P., WATT, S., MEREGHETTI, L., DARTIGUELONGUE, N., RASTEGAR-LARI, A., GOUDEAU, A., QUENTIN, R. (2004): Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *Journal of Medical Microbiology*, 53:73–81.
- LU, Q., EGGIMANN, P., LUYT, C-E., WOLFF, M., TAMM, M., FRANCOIS, B., MERCIER, E., GARBINO, J., LATERRE, P-F., KOCH, H., GAFNER, V., RUDOLF, M. P., MUS, E., PEREZ, A., LAZAR, H., CHASTRE, J., ROUBY, J-J. (2014): *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. *Critical Care*, 18:R17.
- MAGIORAKOS, A. P., SRINIVASAN, A., CAREY, R. B., CARMELI, Y., FALAGAS, C.G. GISKE, S. HARBARTH, J.F. HINDLER, G. KAHLMETER, B. OLSSON-LILJEQUIST, D.L. PATERSON, L.B. RICE, J. STELLING, M.J. STRUELENS, A. VATOPOULOS, J.T. WEBER, D.L. MONNET (2011): Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3): 268–281.
- MERKIER, A., K., CENTRÓN, D. (2006): blaOXA-51-type beta-lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28: 110–113.
- RADHAPRIYA, P., RAMACHANDRAN, A., ANANDHAM, R., MAHALINGAM, S. (2015): *Pseudomonas aeruginosa* RRALC3 enhances the biomass, nutrient and carbon contents of *Pongamia pinnata* seedlings in degraded forest soil. *PLoS One*, 10(10): e0139881.

- SPIPKER, T., COENYE, T., VANDAMME, P., LIPUMA, J. J. (2004): PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (5) 2074–2079.
- STEPANOVIĆ, S., VUKOVIĆ, D., DAKIĆ, I., SAVIĆ, B., ČVABIĆ-VLAHOVIĆ M. (2000): A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40:175–179.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI A., KUMAR, S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6. *Molecular Biology and Evolution*, 30:2725–2729.
- TENOVER, F.C., ARBEIT, R.D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P.A., MURRAY, B.E., PERSING, D.H., SWAMINATHAN, B. (1995): Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2233–2239.
- YOON, S. H., HA, S. M., KWON, S., LIM, J., KIM, Y., SEO, H. AND CHUN, J. (2017): Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67:1613–1617.

6. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

Folyóiratcikk

Radó, J., Kaszab, E., Benedek, T., Kriszt, B., Szoboszlay, S. (2019): First isolation of carbapenem-resistant *Acinetobacter beijerinckii* from an environmental sample. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. doi.org/10.1556/030.66.2019.004
IF: 1,1; Q3.

Radó, J., Kaszab, E., Petrovics, T., Pászti, J., Kriszt, B., Szoboszlay, S. (2017): Characterization of environmental *Pseudomonas aeruginosa* using multilocus sequence typing scheme. *Journal of Medical Microbiology*. 66: 1457-1466.
IF: 2,159; Q1.

Kaszab, E., Szoboszlay, S., Dura, Gy., **Radó, J.**, Kovács, B., Kriszt, B. (2016): Pathogenic and phylogenetic features of 2 multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains originated from remediated sites. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 29(3):503-16. **IF: 0,695; Q3.**

Konferencia részvétel

Radó, J. (2016): Ubikviter baktériumok környezetegészségügyi kockázatai szennyezett területeken. „Korunk kihívásai a környezettudományok gyakorlati alkalmazásában” PhD Hallgatók 2. Környezettudományi Konferenciája. 2016. április 26., Budapest

Radó, J., Szoboszlay, S., Kaszab, E., Háhn, J., Tóth, G., Kriszt, B. (2015): The antibiotic resistance of opportunistic bacteria isolated from environmental samples. 3rd International Symposium on the Environmental Dimension of Antibiotic Resistance, Wernigerode, Germany, 17-21 May 2015.