

A fluorokinolon rezisztencia kialakulásával összefüggő életképesség csökkenés hatása a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* klonális dinamikájára és előfordulási arányára

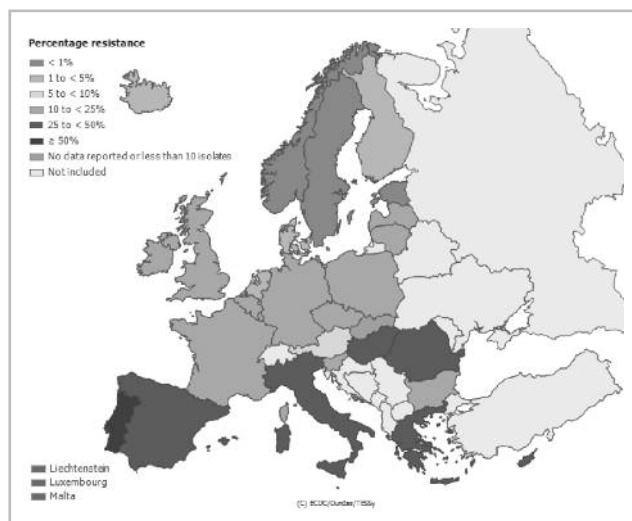
Füzi Miklós, Dobay Orsolya, Nagy Károly,
Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet

Számos fontos nosocomiális patogén elterjedése a klonalitáson, vagyis az egymással genetikailag közeli rokonságban álló törzsek disszeminációján alapszik. A nagy nemzetközi kórokozó klónok egymást gyakran kiszorítják, amit a patogén előfordulási arányának emelkedése kísér. Ugyanakkor, amennyiben egy bizonyos kórokozó klón adott földrajzi területen hosszabb ideig perzisztál, ez nem egyszer a patogén incidenciájának csökkenéséhez vezet. A szerzők a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*-szal (MRSA) végzett korábbi vizsgálataik alapján igazolva látják, hogy mindkét jelenségért nagymértékben a fluorokinolon rezisztencia kialakulásával összefüggő életképesség csökkenés felelős. A különböző kórokozó klónokba tartozó MRSA törzsek fluorokinolon rezisztenciával kapcsolatos életképesség csökkenése jelentősen eltér egymástól. A csekély életképesség csökkenést elszenvedő klónok a többieket kiszorítják, majd gyorsabb szaporodási ütemük révén a „meghódított” területen egy, a korábbinál magasabb előfordulási arányt érnek el. Másfelől, amennyiben hosszabb ideig ki vannak téve fluorokinolon hatásnak végül még a „leghatékonyabb klónok” életképessége is csökken, és incidenciájuk esni fog.

The dissemination of most relevant nosocomial pathogens is clonal: it is governed by the spread of genetically closely related isolates. The great international clones of pathogens will often replace each other and this process is associated with a rise in the agent's rate of prevalence. However, if a particular clone of pathogen persists for an extended time period in a particular geographic area its rate of prevalence will sometimes decrease. The investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) – performed earlier by authors – strongly suggest that both events are, to a large extent, governed by fitness cost associated with the development of resistance to fluoroquinolone type antibiotics. The fitness cost linked to fluoroquinolone resistance varies greatly across individual clones of MRSA. Clones suffering minor fitness cost will replace others and – as a consequence of a faster rate of propagation – will attain a higher incidence in the same area. Nevertheless, if exposed to fluoroquinolones for a longer time span even strains from the most „skilful” clones will finally suffer a significant fitness cost and their rate of prevalence will consequently decline.

BEVEZETÉS

Az MRSA jelenleg világszerte az egyik legfontosabb nosokomiális patogénnek számít. Az Európai Betegségmegelőző Központ (European Center for Disease Control; ECDC) felmérése szerint előfordulási aránya az invazív mintából (vér, liquor) izolált *Staphylococcus aureus*ok között a kontinens hét országában – köztük Magyarországon is – meghaladja a 25%-ot [1]. A részletes statisztikai adatokat az 1. ábrán mutatjuk be.



1. ábra
MRSA előfordulása invazív mintából izolált *Staphylococcus aureus* törzsek között Európában 2010-ben (%) (ECDC) (1)

Jól ismert, hogy az MRSA disszeminációja klonális, és az általa okozott nosokomiális fertőzések döntő többségéért világszerte néhány nagy nemzetközi klón törzsei felelősek [2-5]. Ugyanakkor az MRSA klonális elterjedése dinamikus változásokat mutat; több esetben leírták már, hogy egy-egy klón másokat kiszorított adott földrajzi területről [6-9]. Magyarországon az elmúlt 12 év folyamán két klónváltásnak is tanúi lehettünk: a 2000-es évek elején a korábban itthon prevalens Magyar/Brazil klón – szekvencia típus (ST) 239 – törzseket szorította ki a New York-Japán (ST5) és Dél-Német (ST228) klón [8], az elmúlt néhány évben pedig úgy tűnik, hogy ez utóbbi kettőt az EMRSA-15 (ST22) klón váltja fel fokozatosan [9]. A klónváltások okai eddig ismeretlenek voltak; ugyanakkor jelentőségük igen nagy, hiszen jelentős incidenciát emelkedést okozhatnak. Magyarországon az első, több mint 10 évvel ezelőtt lezajlott klónváltás az MRSA előfordulási arányát – invazív mintákban – 5% alatti

értékről, néhány év alatt, 25% fölötti arányig emelte és a jelenleg is tartó második klónváltás szintén incidenciája növekedéshez vezetett. A részletes hazai MRSA incidenciák adatait az elmúlt 10 évre vonatkozóan az 1. táblázatban [1] foglaltuk össze.

2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
4.7	9.0	14.9	16.7	19.9	25.1	23.6	23.0	28.6	30.1

1. táblázat
Az MRSA előfordulási aránya Magyarországon invazív mintából izolált *Staphylococcusok* között (%) [1]

Az MRSA klonális terjedésével kapcsolatban eddig ugyancsak nyílt kérdés volt, miként lehetséges, hogy az otthon („közösségben”) szerzett MRSA törzsek sokfélék, azaz közöttük számos klón megtalálható, míg a kórházi izolátumok csupán néhány klónhoz tartoznak [3, 4]. Ráadásul a kórházi klónok az esetek túlnyomó többségében a közösségi klónoktól eltérőek és nem jellemző, hogy a közösségi klón törzsek kórházban, vagy a kórházban a közösségben terjedjenek el [3, 4].

Mivel nyilvánvalónak tűnt, hogy az MRSA klónváltása, illetve klonális terjedése háttérben csak a különböző klónokba tartozó törzsek eltérő alkalmazkodási képessége állhat, feltételeztük, hogy a törzsek valamilyen hatásnak lehetnek kitéve, amelyhez egyes klónok törzsei másoknál jobban képesek alkalmazkodni. Ugyanakkor az a tény, hogy a közösségi MRSA törzsek általában nem képesek kórházi környezetben elterjedni, arra utalt, hogy olyan hatást kell keresnünk, amely a törzseket elsősorban kórházi környezetben éri. Ez természetesen leginkább valamilyen döntően fekvőbeteg intézményben alkalmazott antibiotikum lehetett. Ebből a szempontból elvileg három antibiotikum csoport jöhetett szóba: a fluorokinolonok, az aminoglikozidok és a glikopeptidok. Az utóbbi csoportot a glikopeptid rezisztencia ritka előfordulása [10] miatt ki lehetett zárni. A két előbbi csoport közül a fluorokinolonok tűntek valószínűbbnek két okból is: egyrészt a kórházi MRSA törzsek gyakorlatilag mind rezisztensek velük szemben, míg a közösségiek döntő hányada érzékeny marad, ami megfelelt a két csoport közt megfigyelt fent említett különbségnek. Másrészt a fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia kialakulása olyan fehérjékben (giráz, topoizomeráz IV) vezet mutációk létrejöttéhez [11], amelyek a sejtosztódást megelőzően a DNS molekula megkettőződésének előkészítését végzik, tehát esetlegesen megváltozott működésük bizonyosan a sejtosztódás, vagyis a szaporodás lelassulásához vezet, és ezáltal nyilvánvalóan lassítja a kórokozó terjedését.

Vizsgálatainkat ismert klónokba (szekvencia típusokba) tartozó MRSA törzsekkel végeztük. Három fluorokinolon érzékeny, Magyarországon, otthon szerzett infekciókból izolált törzsnél mesterségesen (in vitro) magas szintű ciprofloxacinnal rezisztenciát alakítottunk ki és a minimális gátló koncentráció fokozatos növekedése mellett folyamatosan vizsgáltuk az izolátumok szaporodási képességének változását, valamint a giráz és topoizomeráz IV génekben kialakuló mutáci-

ókat. Ezen kívül hazai invazív kórházi infekciókból tenyésztett fluorokinolon rezisztens Magyar/Brazil, New York-Japán, Dél-Német és EMRSA-15 törzsek szaporodási képességét is tanulmányoztuk egymáshoz és a rezisztenssé tett közösségi törzsekhez viszonyítva [12].

Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy bár a fluorokinolon rezisztencia kialakulása során mindhárom közösségi MRSA törzs életképessége csökkent, az életképesség csökkenés mértéke a különböző klónokba tartozó törzsek között igen eltérő volt. Előfordult olyan törzs, amelynek szaporodási üteme már 32 mg/L szintű ciprofloxacinnal rezisztencia mellett nagymértékben lassult, míg másoké csak jóval magasabb minimális gátló koncentrációnál esett vissza [12].

A kórházi MRSA törzsekkel végzett vizsgálataink különösen érdekes eredményt adtak: a Magyar/Brazil klónba tartozó törzsek szaporodási üteme messze elmaradt a három másik klónba tartozó izolátumok növekedésétől, ami tökéletesen megmagyarázza, miért tudta a New York-Japán és Dél-Német klón a 2000-es évek elején kiszorítani Magyarországról a Magyar/Brazil klónba tartozó törzseket. Ugyanakkor az EMRSA-15 izolátumok életképesség csökkenése szignifikánsan kisebbnek bizonyult, mint a New York-Japán és Dél-Német törzseké, ami felelős lehet ez utóbbiak jelenlegi kiszorulásáért Magyarországról [12].

A közösségi és kórházi MRSA törzsek viselkedését összehasonlítva elmondható, hogy előbbieket lassabban szaporodnak, mint a hozzájuk hasonló minimális gátló koncentrációt mutató kórházi törzsek, kivéve a Magyar/Brazil klónba tartozó izolátumokat, amelyek velük azonos mértékben (vagy még annál is nagyobb mértékben) lelassulnak [12]. Ez a megfigyelés tökéletesen megmagyarázza, hogy általában miért nem képesek a közösségi MRSA klónok kórházi környezetben megtelepedni, és széles körben elterjedni. A fekvőbeteg intézményekben ugyanis olyan törzsekkel kellene „versenyezniük”, amelyek fluorokinolon rezisztens variánsai az övéknél jóval életképesebbek. Ugyanakkor, mivel a területi ellátásban egyelőre nem gyakran alkalmazunk fluorokinolonokat a közösségi MRSA törzsek, amelyek fluorokinolon érzékenyek, az otthoni környezetben jelentős előnyt élveznek a fluorokinolon rezisztens kórházi MRSA törzsekkel szemben. Ez utóbbiak bármilyen jól bírják is a fluorokinolon rezisztenciát, lassabban szaporodnak, mint a fluorokinolon érzékeny közösségi MRSA izolátumok, és a kórházon kívüli környezetben fluorokinolon rezisztenciájuk – legalábbis egyelőre – propagációs előnyt nem biztosít számukra.

Szeretnénk megemlíteni, hogy eredményeink nem csupán a hazai klónváltásokat és a közösségi, valamint kórházi MRSA törzsek egymáshoz való viszonyát képesek megmagyarázni, hanem a nemzetközi szakirodalomban közölt hasonló esetekkel is összhangban vannak. Az általunk közösségi MRSA-ként vizsgált egyik törzs klónja (ST30) a nagy nemzetközi MRSA klónok megjelenése előtt kórházi környezetben is előfordult, ugyanakkor irodalmi adatok bizonyítják, hogy Japánból [6], valamint egy nagy mexikói fekvőbeteg intézményből [7] is a New York-Japán klón könnyen kiszorította. Ezek a megfigyelések tökéletesen egybevág-

nak vizsgálatainkkal, amelyek alapján az ST30-as törzs fluorokinolon rezisztens változata a New York-Japán MRSA törzseknél lényegesen nagyobb életképesség csökkenést szenved [12].

Felmerül ezek után a kérdés, hogy a fluorokinolon rezisztenciához társuló életképesség csökkenésben megfigyelt különbségek a klónváltások mellett befolyásolják-e az MRSA incidenciáját is. Eddigi eredményeink alapján a kérdésre valószínűleg igennel válaszolhatunk. Biztosan nem véletlen, hogy a Magyar/Brazil klón – amely a fluorokinolon rezisztencia kialakulása során jelentős életképesség csökkenést szenved el – sohasem volt képes Magyarországon invazív mintákban 5%-ot meghaladó incidenciát elérni [12], ugyanakkor a jóval gyorsabban szaporodó New-York-Japán és Dél-Német törzsek megjelenésével a hazai MRSA arány néhány év alatt 25%-földre emelkedett (1. táblázat). Hasonlóképpen, a 2000-es évek második felében a New York-Japán és Dél-Német törzseknél gyorsabban szaporodó EMRSA-15 izolátumok térhódításával a hazai MRSA incidencia tovább növekedett (1. táblázat).

A kórházi MRSA incidencia ugyanakkor nem csupán emelkedik, hanem csökken is. Az ECDC adatai szerint az elmúlt években Európa számos országában következett be visszaesés az MRSA előfordulási arányában [1]. Érdekes módon Magyarországon is megfigyelhető volt 2007-2008-ban egy átmeneti MRSA incidencia csökkenés (1. táblázat). Bár közvetlen bizonyítékkal még nem rendelkezünk, úgy véljük eredményeink e változásokra is magyarázatul szolgálhatnak. A hazai MRSA arány csökkenés egyértelműen akkor következett be, amikor a New York-Japán és Dél-Német törzsek már jó néhány éve Magyarországon perzisztáltak, ugyanakkor újabb külső MRSA klón tömeges megjelenéséről még nem beszélhettünk. Ez feltehetőleg nem véletlen. A fluorokinolon érzékeny közösségi MRSA törzseink ciprofloxacinnal történő szokatása során azt tapasztaltuk, hogy előbb vagy utóbb, de bizonyos minimális gátló koncentráció elérésekor minden MRSA törzs életképessége jelentős mértékben visszaesik [12]. Ennek alapján valószínű, hogy bármilyen hatékonyan is „igyekszik” egy sikeres nemzetközi MRSA klón életképességét a fluorokinolon rezisztencia mellett megtartani, egy bizonyos rezisztencia szint felett minden izolátum „összeomlik” és szaporodási képessége lelassul, ami elkerülhetetlenül előfordulási gyakoriságának csökkenéséhez vezet. A nagy kórházi MRSA klónokba tartozó törzseink izolálásukkor mind magas minimális gátlási koncentrációt mutattak ciprofloxacinnal szemben, de egyik sem érte el azt a szintet, amelyen szaporodási képessége jelentősen csökken. Mivel azonban ezen érték közelében álltak, biztosan állítható, hogy a valóságban eléri ezt a szintet, azonban ilyenkor olyan súlyos életképesség csökkenést szenvednek, hogy képtelenek továbbterjedni és kiszorulnak, aminek következtében rutin anyagunkban nem találjuk meg őket.

Valószínűnek tartjuk, hogy azokban az európai országokban, ahol MRSA incidencia visszaesést figyeltek meg – a hazai helyzethez hasonlóan – már hosszabb ideje nem következett be klónváltás és a rezidens izolátumok folyamatosan ki voltak téve „fluorokinolon presszióknak”. A kérdés egyértelmű tisztázására mindenképpen érdemes volna prospektív epidemiológiai vizsgálatok végzése hazai kórházi osztályokon.

Genetikai vizsgálataink számos mutáció előfordulására derítettek fényt a fluorokinolon rezisztens törzsek giráz és topoizomeráz IV génjeiben. Egyesekről már eddigi eredményeink alapján is megállapítható volt, hogy igen hátrányosan befolyásolják az MRSA törzsek szaporodási képességét, azonban az életképesség csökkenés genetikai hátterének alapos megismerése mindenképpen további vizsgálatok végzését tenné szükségessé [12].

Bár eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a fluorokinolon rezisztenciával összefüggő életképesség csökkenés fontos szerepet játszik az MRSA klonális dinamikájának és incidenciájának alakulásában, természetesen, semmiképpen sem akarjuk a higiénés rendszabályok betartásának jelentőségét kétségbe vonni. A megfelelő higiénés protokollok szigorú alkalmazása bármilyen MRSA klón által okozott infekció esetén alapvetően fontos és megkerülhetetlen.

Mivel az MRSA-n kívül a giráz és topoizomeráz IV mutációk valamennyi fontos nozokomiális patogén fluorokinolon rezisztenciájának kialakulásában szerepet játszanak, felmerül, hogy az MRSA esetében megfigyelt összefüggések érvényesek-e más kórokozókra is. A közelmúltban vizsgálatokat kezdtünk a *Klebsiella pneumoniae* és a *Clostridium difficile* klonális dinamikájának tisztázására és előzetes eredményeink alapján elmondható, hogy az MRSA-val kapcsolatban megfigyelt összefüggések – feltehetőleg – rájuk is érvényesek. Ezek után indokoltnak látszik további jelentős nozokomiális patogének vizsgálata is, mint az *E. coli*, a *Pseudomonas aeruginosa*, az *Acinetobacter baumannii* és az *Enterococcus faecalis*.

KÖVETKEZTETÉSEK

Végül, felmerül a kérdés, hogy az elmondottak alapján, hogyan értékelhetjük újra a fluorokinolon típusú antibiotikumok szerepét. Vizsgálataink szerint a fluorokinolon típusú szerek használata egyrészt kiszorította a nagy nemzetközi MRSA klónokat, amelyek a korábban előforduló kevésbé életképes klónokat kiszorították és elterjedésük az MRSA incidencia jelentős emelkedéséhez vezetett. Másrészt úgy tűnik, hogy hosszú távon a fluorokinolon típusú antibiotikumok a sikeres nemzetközi klón törzsek életképességét is csökkentik, és így folyamatos használatuk a patogének incidenciájának visszaeséséhez vezet. Úgy érezzük, egyelőre nem rendelkezünk elegendő információval ahhoz, hogy a fluorokinolonok alkalmazásának valamennyi vonatkozását helyesen megítélhessük. Mindenképpen további kutatómunka végzésére volna szükség tehát a témában.

IRODALOMJEGYZÉK

- [1] www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx
- [2] Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008, 8, 747–763
- [3] Harris SR, Feil EJ, Holden MT, Quail MA, Nickerson EK, Chantratita N, Gardete S, Tavares A, Day N, Lindsay JA, Edgeworth JD, de Lencastre H, Parkhill J, Peacock SJ, Bentley SD. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science* 2010, 327, 469–474
- [4] Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med* 2010, 7, e1000215
- [5] Johnson AP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. *J Antimicrob Chemother* 2011, 66(Suppl 4), iV43–iV48
- [6] Ma XX, Ito T, Chongtrakool P, Hiramatsu K. Predominance of clones carrying Panton-Valentine leukocidin genes among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in Japanese hospitals from 1979 to 1985. *J Clin Microb* 2006, 44, 4515–4527
- [7] Velazquez-Meza ME, Aires de Sousa M, Echaniz-Aviles G, Solórzano-Santos F, Miranda-Novales G, Silva-Sanchez J, de Lencastre H. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pediatric hospital in Mexico City during a 7-year period (1997 to 2003): clonal evolution and impact of infection control. *J Clin Microbiol* 2004, 42, 6877–6880
- [8] Conceição T, Aires-de-Sousa M, Fűzi M, Tóth A, Pászti J, Ungvári E, van Leeuwen WB, van Belkum A, Grundmann H, de Lencastre H. Replacement of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Hungary over time: a 10-year surveillance study. *Clin Microbiol Infect* 2007, 13, 971–979
- [9] Ungvári E, Berta B, Hajdu Á, Tákosné Fabók É, Vörös P, Szabó Attila T, Szikra L, Lakatos F, Kamotsay K, Markó E, Papp K, Székelyi K, Baranyai G, Kispál Gy, Urbán E, Kálmán Zs, Szabó J, Knausz M, Jung Á, Pászti J, Tóth Á. Véráram- fertőzést okozó, domináns *Staphylococcus aureus* klónok azonosítása Európában- a második nemzetközi felmérés magyarországi eredményei *Mikrobiológiai Közlevél* 2012, 12, 1-16
- [10] Tóth A, Kispál G, Ungvári E, Viola M, Szeberin Z, Pászti J, Molnár K, Gacs M, Fűzi M. First report of heterogeneously vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) causing fatal infection in Hungary. *J Chemother* 2008, 20, 655-6.
- [11] Pantosti A, Sanchini A, Monaco M. Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol* 2007, 2, 323–334
- [12] Horváth A, Dobay O, Kardos S, Ghidán Á, Tóth Á, Pászti J, Ungvári E, Horváth P, Nagy K, Zissman S, Fűzi M. Varying fitness cost associated with resistance to fluoroquinolones governs clonal dynamic of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012 jan 5 (online)

A SZERZŐK BEMUTATÁSA



Dr. Fűzi Miklós egyetemi docens, a Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetének munkatársa; a klinikai mikrobiológia területén országos szakfelügyelő főorvosként is dolgozik. Kutatási területei a nozokomiális kórokozók antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata, valamint a fehérje természetű patogének, a prionok, tanulmányozása.

Tagja számos szakmai testületnek, valamint az *Acta Microbiologica et Immunologica* szerkesztő bizottságának.



Dr. Nagy Károly egyetemi tanár, az orvosi mikrobiológia szakorvosa, a Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetének igazgatója. Kutatási területe a vírus – sejt kapcsolat, elsősorban a HIV vírus molekuláris pathogenezeise, a



Dr. Dobay Orsolya a Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetében adjunktusként dolgozik, 2005-ben szerzett PhD fokozatot. Kutatási területe a Gram-pozitív coccusok (elsősorban a pneumococcusok) epidemiológiai vizsgálata, különös tekintettel ezek tünetmentes hordozására. Több szakmai testület tagja. A kutatás mellett

részt vesz a graduális és posztgraduális oktatásban, jelenleg 2 PhD hallgató témavezetője.

gyógyszer-rezisztens vírus mutánsok kialakulása, hatékony antivirális anyagok tesztelése. Vendég kutatóként angolai, orosz, svéd, és amerikai kutatóintézetekben dolgozott. Főszerkesztője az *Acta Microbiologica et Immunologia* szakfolyóiratnak. A Federation of European Academy of Medicine magyar képviselője.