



SZENT ISTVÁN EGYETEM

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. BEVEZETÉS	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1 KÖRNYEZETBIZTONSÁG	9
2.2 PATOGENITÁS.....	10
2.3 VIRULENCIA	11
2.4 INVAZIVITÁS.....	12
2.5 KOLONIZÁCIÓ – INFEKCIÓ.....	12
2.6 KLINIKAI EPIDEMIOLÓGIA.....	13
2.7 BIOFILM.....	13
2.8 ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIA	14
2.9 BIOLÓGIAI ÁGENSEK BESOROLÁSA KÖZEGÉSZSÉGÜGYI SZEMPONTBÓL.....	17
2.10 OPPORTUNISTA PATOGÉN BAKTÉRIUMOK	18
2.10.1 Az <i>Acinetobacter</i> nemzetség jellemzése.....	18
2.10.1.1 Az <i>Acinetobacter</i> fajok humánegészségügyi jelentősége.....	20
2.10.1.2 Az <i>Acinetobacter baumannii</i> jellemzése és kórházi jelentősége.....	21
2.10.1.2.1 Az <i>A. baumannii</i> virulenciája	22
2.10.1.2.2 Antibiotikum terápia és rezisztencia az <i>A. baumannii</i> törzsek körében	22
2.10.1.2.3 Az <i>A. baumannii</i> biofilm képző képessége	26
2.10.1.2.4 <i>A. baumannii</i> a környezetben	26
2.10.2 A <i>Pseudomonas</i> nemzetség.....	27
2.10.2.1 A <i>Pseudomonas aeruginosa</i> jellemzése	28
2.10.2.1.1 A <i>P. aeruginosa</i> kórházi jelentősége.....	29
2.10.2.1.2 A <i>P. aeruginosa</i> virulenciája.....	29
2.10.2.1.3 <i>P. aeruginosa</i> szerotípusok	31
2.10.2.1.4 Antibiotikum terápia és rezisztencia a <i>P. aeruginosa</i> törzsek körében	32
2.10.2.1.5 A <i>P. aeruginosa</i> biofilm képző képessége.....	34
2.10.2.1.6 <i>P. aeruginosa</i> a környezetben	34
2.10.2.1.7 Kórházi és környezeti <i>P. aeruginosa</i> törzsek összehasonlítása	37
2.10.3 Filogenetikai vizsgálatok szerepe az opportunisták mikroszervezetek genotipizálásában	37
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	39
3.1 MINTAVÉTELEZÉS.....	39
3.2 KÖRNYEZETI EREDETŰ ACINETOBACTER FAJOK IZOLÁLÁSA	40
3.3 KÖRNYEZETI EREDETŰ PSEUDOMONAS AERUGINOSA IZOLÁLÁSA.....	41
3.4 AZ IZOLÁLT TÖRZSEK FAJ SZINTŰ MEGHATÁROZÁSA 16S rDNS ALAPON.....	42
3.4.1 <i>Acinetobacter</i> törzsek identifikációja 16S rDNS szekvencia analízissel.....	42
3.4.2 16S rDNS <i>P. aeruginosa</i> fajspecifikus génszakaszának kimutatása	45
3.5 ANTIBIOTIKUM REZISZTENCIA VIZSGÁLAT.....	46
3.5.1 Minimális gátló koncentráció meghatározása MIC tesztesikkel.....	46
3.5.2 A bla _{OXA-51} , antibiotikum rezisztencia gén vizsgálata <i>Acinetobacter</i> törzsekkel	47
3.6 VIRULENCIA FAKTOROK VIZSGÁLATA	47
3.6.1 Hemolitikus aktivitás vizsgálata.....	47
3.6.2 Biofilm képző képesség vizsgálata.....	48
3.6.3 Virulencia gének vizsgálata.....	49
3.6.4 Szerológiai vizsgálatok	50
3.6.5 Motilitás vizsgálatok	50
3.6.6 Virulencia vizsgálat nagy viaszmosoly (<i>Galleria mellonella</i>) modellen	51
3.7 FILOGENETIKAI KAPCSOLATOK VIZSGÁLATA	52
3.7.1 Multilokusz Szekvencia Tipizáló Módszer (MLST).....	52
3.7.1.1 Az <i>A. baumannii</i> MLST vizsgálatához használt háztartási gének és funkcióik	52
3.7.1.2 A <i>P. aeruginosa</i> MLST vizsgálatához használt háztartási gének és funkcióik.....	53
3.7.1.3 A háztartási gének felszaporítása és szekvenálása	53
3.7.1.4 Allélikus profil és szekvencia típus (ST) meghatározás	55

3.7.2 Pulzáló erőterű gélelektroforézis (PFGE).....	56
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	59
4.1 AZ ACINETOBACTER TÖRZSEKKEL VÉGZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI.....	59
4.1.1 Az <i>Acinetobacter</i> törzsek izolálásának és azonosításának eredményei.....	59
4.1.2 Antibiotikum rezisztencia vizsgálat eredményei.....	62
4.1.2.1 MIC teszt.....	62
4.1.2.2 A <i>bla_{OXA-51}</i> , béta-laktamáz antibiotikum rezisztencia gén vizsgálata.....	65
4.1.3 A hemolitikus aktivitás vizsgálatának eredményei.....	65
4.1.4 A biofilm képző képesség vizsgálatának eredményei.....	67
4.1.5 Az MLST módszer eredményei.....	67
4.1.6 Az <i>A. baumannii</i> törzsek eredményeinek összefoglaló értékelése.....	69
4.2 A <i>P. AERUGINOSA</i> TÖRZSEKKEL VÉGZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI.....	69
4.2.1 A <i>P. aeruginosa</i> törzsek izolálásának és azonosításának eredményei.....	69
4.2.2 Antibiotikum rezisztencia vizsgálat eredményei.....	70
4.2.2.1 MIC teszt.....	70
4.2.3 A hemolitikus aktivitás vizsgálatának eredményei.....	72
4.2.4 A biofilm képző képesség vizsgálatának eredményei.....	73
4.2.5 <i>P. aeruginosa</i> törzsekkel végzett komplex vizsgálati kör eredményei.....	74
4.2.5.1 Biofilm képző képesség vizsgálatának eredményei – mikrotiter lemezes módszer és konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével.....	74
4.2.5.2 A virulencia gének vizsgálatának eredményei.....	75
4.2.5.3 A szerotipizálás eredményei.....	78
4.2.5.4 A motilitás vizsgálatának eredményei.....	79
4.2.5.5 A <i>Galleria mellonella</i> nagy viaszmosoly teszt eredményei.....	80
4.2.5.6 Az MLST módszer eredményei.....	81
4.2.5.7 A PFGE vizsgálat eredményei.....	82
4.2.5.8 <i>P. aeruginosa</i> törzsek eredményeinek összehasonlító értékelése.....	83
4.2.5.8.1 Az antibiotikum rezisztencia és a <i>Galleria mellonella</i> tesztben mutatott virulencia összefüggései (n=46).....	84
4.2.5.8.2 A motilitási formák és a <i>Galleria mellonella</i> tesztben mutatott virulencia összefüggései (n=46).....	85
4.2.5.8.3 A szerotipizálás eredményei és a <i>Galleria mellonella</i> tesztben mutatott virulencia (n=46), illetve a szerotípusok és az MLST vizsgálat eredményeinek összefüggései (n=16).....	85
4.2.5.8.4 A virulencia gének jelenléte és a hemolitikus aktivitás, a <i>Galleria mellonella</i> teszt eredményei, illetve a szerotípusok összefüggéseinek elemzése (n=46).....	86
4.2.5.8.5 A környezeti <i>P. aeruginosa</i> törzsek jellemzése a PFGE alapján felállított filogenetikai fa és különböző vizsgálati irányok szerint (n=46).....	87
4.2.5.8.6 A PFGE eredmények alapján rokon környezeti és kórházi <i>P. aeruginosa</i> törzsek jellemzése különböző vizsgálati irányok szerint (n=5).....	88
4.2.5.8.7 A PFGE és az MLST vizsgálatok összevetése (n=16).....	89
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	91
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	97
7. ENGLISH SUMMARY.....	101
1. SZ. MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK.....	103
2. – 13. SZ. MELLÉKLETEK: AZ ÉRTEKEZÉS TOVÁBBI MELLÉKLETEI.....	116

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACB-komplex	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> – <i>Acinetobacter baumannii</i> komplex
CF	Cisztás fibrózis
CFU	Colony Forming Unit/ Telepképző egység
CLSI (NCCLS)	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy/ Konfokális Lézer Pásztázó Mikroszkóp
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen/ Német Mikroorganizmusok és Sejtkultúrák Nemzeti Gyűjteménye
EARS-NET	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network/ Antimikrobiális Rezisztencia Európai Felügyeleti Hálózat
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control/ Európai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter</i> fajok
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
LAM	Leeds <i>Acinetobacter</i> Medium táptalaj
MDR	Multidrug-resistant/ Multirezisztens
MIC teszt	Minimal Inhibitory Concentration/ Minimális Gátló Koncentráció, antibiotikum rezisztencia teszt
MLST	Multilocus Sequence Typing/ Multilokus Szekvencia Tipizálás
NNK	Nemzeti Népegészségügyi Központ
OD	Optikai Denzitás
PBS	Phosphate Buffered Saline/ Foszfát Sóoldat
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Polimeráz Láncreakció
PDR	Pandrug Resistance/ Pánrezisztens
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis/ Pulzáló Erőterű Gélelektroforézis
TGE	Trypton Glükóz Élesztőkivonatós táptalaj
TPH	Total Petroleum Hydrocarbons/ Összes Alifás Szénhidrogén
TRBA	Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe/ Biológiai anyagokkal való munkavégzésre vonatkozó technikai szabályozás
TSB	Tryptic Soy Broth/ Trypton Szója Tápleves
XDR	Extensive Drug Resistance/ Kiterjedt rezisztencia

1. BEVEZETÉS

„A végtelenül kicsinek végtelenül nagy a szerepe.”

- Louis Pasteur

A környezetbiztonság témakörének biológiai oldalról való megközelítése során első lépésben kerülnek megemlítésre azok a mikrobák, melyek a kockázatkezelés szempontjából kiemelt jelentőségűek. Számos, opportunista patogén baktérium – gyengültségi kórokozó – része a természetes környezetnek, közreműködője az anyagkörforgalmi folyamatoknak. Jelentős részük kiváló metabolikus képességekkel rendelkezik, a szakirodalomban igen nagy számban találunk adatokat különböző szennyező anyagok baktériumok által történő bontásáról. Ezen mikroorganizmusok meghatározó része 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 szakirodalomban számtalan adatot találunk kórházi fertőzésekből származó baktériumtörzsek vizsgálatáról, azonban a környezeti izolátumok tanulmányozásával jóval kevesebb publikáció foglalkozik. Olyan tanulmányok pedig, melyek kórházi és környezeti izolátumok vizsgált tulajdonságainak összehasonlítását tűzték ki célul, csak igen korlátozott számban állnak rendelkezésre és ezen eredmények is ellentmondásosak néhány esetben. A baktériumok lehetséges biológiai veszélyeit számos faktor befolyásolja. Különböző tényezők játszanak szerepet a kolonizáció, infekció létrejöttében, a kórokozó viselkedés megnyilvánulásában vagy a bekövetkezett fertőzés kimenetelében.

Mindezek tükrében tehát hiánypótló információkkal szolgálhat, ha képet kapunk a környezetben előforduló opportunista patogén fajok elterjedtségéről és a természeti környezetben mutatott tulajdonságaikról, hiszen különböző expozíciós útvonalakon bármikor közvetlen kapcsolatba kerülhetnek az emberi szervezettel.

Doktori munkám során olyan opportunista patogén baktériumok vizsgálatát tűztem ki célul, mint az *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó fajok és a *Pseudomonas aeruginosa* faj, melyek ubikviter szervezetekként a környezetben (is) általánosan elterjedtek, azonban jelentős problémát okoznak kórházi körülmények közt betegségkialakító képességükkel és az egyre nagyobb mértékben megnyilvánuló antibiotikum rezisztenciájukkal. Végző célomként a környezeti törzsek környezetbiztonsági kockázatának megítélését határoztam meg, melyre a vizsgálatokba vont izolátumok tulajdonságai, mint az antibiotikum rezisztencia, a virulencia megnyilvánulása különböző, az adott faj esetében releváns tesztekben (hemolitikus aktivitás, *Galleria mellonella* teszt, motilitás, szerotípus, biofilm képző képesség), illetve különböző virulencia gének vizsgálata

és a molekuláris biológiai módszerekkel végzett filogenetikai kapcsolatok felderítése adott lehetőséget.

Doktori kutatási munkám során tehát az alábbi konkrét célokat határoztam meg:

- Az *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó fajok, illetve a *Pseudomonas aeruginosa* faj környezeti képviselőinek izolálása és azonosítása 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 láncreakció)
 - 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/Multilokusz Szekvencia Tipizálás)
 - PFGE (Pulsed-field Gel Electrophoresis/Pulzáló Erőterű Gélelektroforézis).

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Környezetbiztonság

A környezetvédelem szerteágazó, ugyanakkor igen összetett szakterület, mely számos feladatot foglal magában és egyre szorosabban függ össze a környezetbiztonság tevékenységi körével. A környezetbiztonság fogalma az Európai Közösség által elfogadott definíció szerint, *„az Európai Közösség azon képességét jelenti, hogy a környezeti erőforrások szűkössége és a környezeti károsodás elkerülésével képes fejlődést biztosítani”* (HANKÓ & FÖLDI, 2009). Más megfogalmazás szerint *„a mindenkorin környezetvédelem adott állapota, annak egyes elemei vonatkozásában külön-külön és együttvéve. A föld, a vizek, a levegő, a természetes és mesterséges környezetnek az emberekre, a társadalomra, az egész érintett élő- és élettelen világra, valamennyi értékre gyakorolt, negatív hatással szembeni védettségek a mértékében”* (NAGY, 2001). A Nemzeti Köszolgálati Egyetem, Környezetbiztonság című jegyzetében megfogalmazottak szerint *„a környezetbiztonság a környezeti elemek védettségi állapotának mértékét fejezi ki az emberi tevékenységek, az ember által működtetett műszaki, technológiai folyamatokkal, rendszerekkel szemben, ugyanakkor azt az állapotot jelképezi, amikor a természet, a környezet sem közvetlenül, sem pedig az emberi tevékenységeken keresztül nem veszélyezteteti sem az embert, sem pedig annak természetes és mesterséges környezetét”* (SZOBOSZLAY, 2003; HALÁSZ & FÖLDI, 2014).

Számos megfogalmazás létezik tehát, ha egybevetjük őket, a közös pontok a következők lesznek: az egyén és a közösség egyes csoportjai egyetértésben vannak a különböző társadalmak, illetve az emberiség természeti, társadalmi, gazdasági és politikai környezetével.

A környezetbiztonság a nemzeti biztonság részét képezi, mely magában foglalja a környezet védettsége mellett a környezeti ártalmak általános fokát, a katasztrófa-, vízrajzi és meteorológiai helyzetet, illetve a **közegészség és járványügyi** állapotokat, a védekező mechanizmusok és megelőző rendszerek meglétével párhuzamosan (HALÁSZ & FÖLDI, 2014).

Napjainkra igen széles körben felismerték, hogy környezetvédelem nélkül hosszú távon katasztrófális változásokra számíthat az emberiség, így számos nemzetközi és nemzeti szervezet tűzte zászlajára közvetve vagy közvetlenül a környezetvédelmi problémák megoldását, a környezeti károk megelőzését, mérséklését szabályozáson, adatszolgáltatáson keresztül. Mi sem bizonyítja ezt jobban, mint hogy az **Amerikai Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatalának** (US EPA – United States Environmental Protection Agency) elsődleges feladata az emberi egészség és a környezet védelme (http1). Az Európai Unió által működtetett, **Európai Környezetvédelmi Ügynökség** (EEA – European Environment Agency) legfőbb célja pedig, hogy független, megbízható tájékoztatást nyújtson a környezetről a fenntartható fejlődés támogatásának érdekében (http2). A nemzetközileg is mérvadó környezetvédelmi ügynökségek

mellett számos, specifikusabb csoport működik kormányok által vagy civil kezdeményezés formájában, nemzeti vagy nemzetközi összefogással, melyek igen különböző témakörökre fókuszálnak. A teljesség igénye nélkül megemlítve néhányat, ilyen szervezet például a *Greenpeace*, mely a világ legnagyobb független természetvédelmi és környezetvédelmi civilszervezete. Célja a környezettudatos szemlélet terjesztése minél szélesebb körben, valamint a természetet és az emberi környezetet ért pusztító tevékenység felderítése és megváltoztatása (http3). A *WWF* (World Wide Fund for Nature – Természetvédelmi Világalap), a világ legnagyobb civil természetvédelmi szervezete, mely az élővilág sokféleségének megőrzéséért, az élőhelyek és a veszélyeztetett fajok védelméért küzd világszerte. Küldetésük egy olyan jövő megteremtése, ahol az emberiség és a természet harmóniában él egymással (http4). Az *ENSZ Környezetvédelmi Programjának* (United Nations Environment Programme) legfőbb feladatai közé a környezet állapotának figyelése és adatok beszerzése, valamint a nemzetközi környezetvédelmi együttműködés segítése és az esetleges környezeti katasztrófák kezelése tartozik (http5). A *Globális Környezeti Alap* (GEF – Global Environment Facility) a biodiverzitás, a klímaváltozás, az ózonzó és a környezetszennyezés problémájával foglalkozik (http6). Az *Éghajlat-változási Kormányközi Testület* (IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change) célja, hogy összefoglalja és értékelje az emberi tevékenység hatására bekövetkezett klímaváltozással kapcsolatos kutatási eredményeket (http7).

Az **Egészségügyi Világszervezet** (WHO – World Health Organization) az ENSZ egyik alszervezete, mely a nemzetközi közegészségügy irányító hatóságaként tevékenykedik. Fő feladatai közé tartoznak a segítségnyújtási, kutató- és irányítási tevékenységek az egészségügy minden területén, különös tekintettel a fertőző betegségek, járványok, gyermekbetegségek, rák és AIDS okainak felderítésére (http8). A környezetvédelem tehát szorosan összefügg a környezetbiztonság tevékenységi körével, mely magában foglalja a **közegészség- és járványügyi állapotokat** is.

2.2 Patogenitás

Az, hogy egy adott mikroorganizmus milyen közegészségügyi jelentőséggel bír, számos tényező függvénye, melyek közül a legfontosabb a patogenitás. A patogenitás, vagy patogenicitás definícióját a következőképpen fogalmazzák meg: egy fertőző ágens abszolút képessége a betegség kialakítására vagy sérülés okozására a gazdaszervezetben. Egy fertőző ágens vagy patogén, vagy nem (CANN, 2016; BURRELL ET AL., 2017). A patogenitás, vagy a betegség kialakításának képessége viszonylag ritka a mikrobák között. A fertőzőképesség, vagy a gazdaszervezet védelmi képességének megsértése és a virulencia, egy multifaktoriális változó, ami

össességében egy patogén képessége, hogy ártson a fogadószervezetnek (ALA'ALDEEN & WOOLDRIDGE, 2012).

A baktériumok között a patogének két típusát különböztetjük meg. Az **opportunisták** ritkán váltanak ki megbetegedést az egészséges immunrendszerrel rendelkezők körében. Általában veleszületett vagy szerzett betegség, immunvédekezésben gátolt, vagy veszélyeztetett, illetve immunszuppresszív terápia alatt állók vagy műtéti beavatkozáson átesettek körében képesek betegség kialakítására. Számos, opportunistika kórokozó része a normál emberi mikrobiótának a bőrön vagy a nyálkahártyán, ahol ártalmatlanok, nem okoznak megbetegedést (ALA'ALDEEN & WOOLDRIDGE, 2012). A primer vagy elsődleges, más néven **obligát patogének** olyan virulencia mechanizmus(ok)kal rendelkeznek, melyek segítségével képesek egészséges szervezetekben is betegség kiváltására. Az opportunistika kórokozók csak a védekezésben gátolt gazdaszervezetet támadják, míg az obligát patogének egészséges egyedekben is okozhatnak megbetegedést. (FALKOW, 1997). A virulencia faktorok megléte (birtoklása) különbözteti meg a patogéneket a nem patogénektől, illetve azok mennyisége és hatékonysága választja el az opportunistákat az obligát patogénektől (ALA'ALDEEN & WOOLDRIDGE, 2012).

2.3 Virulencia

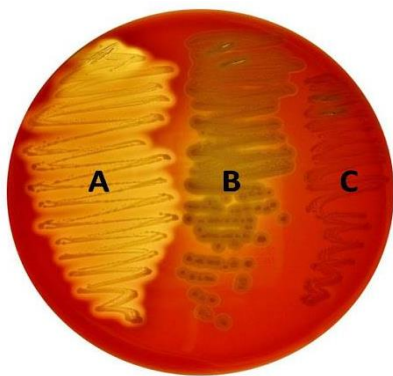
A patogén szervezeteken belül a virulencia meghatározza az adott törzsre jellemző, speciális, gazdaszervezetet károsító tulajdonságokat (ISENBERG, 1988). A virulencia a kórokozóképességnek egy pontosan meghatározott törzsre vonatkoztatott mennyiségi kifejezése. Kicsit árnyaltabb megközelítésben, a virulencia klinikai értelemben vett olyan komplex kórokozó-gazda kapcsolat megnyilvánulása, amelyben egy mikroszervezet betegség okozó képességét a gazda rezisztenciájával kapcsolatban vizsgálják (ALA'ALDEEN & WOOLDRIDGE, 2012).

A virulencia a patogenitás mértékét fejezi ki, általában morbiditási, vagy mortalitási értékekkel (pl. LD₅₀ értékkel) jellemzik, ami a mikroorganizmus vagy az általa termelt toxin mennyiségére utal, és a kísérleti szervezetek felét képes elpusztítani (WONG ET AL., 1996). A virulencia meghatározásában szerepe van a mikroorganizmusok sejtfelépítésének és anyagcseretermékeinek. Ezeket virulencia faktorként vagy patogenitási tényezőként tartjuk számon. A legtöbb patogénnek számtalan virulencia faktora van, amelyek meghatározzák, hogy milyen gazdaszervezetet tudnak megtámadni, milyen szövetekbe hatolnak be és a betegségnek milyen tüneteit váltják ki. Ha valamelyik tényező hiányzik, a patogén csökkent virulenciájú, vagy avirulens.

Az endotoxinok és exotoxinok ismert virulencia faktorok. Az endotoxinokat a lipopoliszacharidok szinonimájaként is számon tartják a Gram-negatív baktériumok körében, megfelelő mennyiség termelése mellett endotoxikus sokk alakulhat ki a gazdaszervezetben. Az

exotoxinok olyan fehérjék, melyek károsodást vagy működési rendellenességet okozhatnak a gazdasejt membránján történő jelátvitellel (I. típus), a membrán károsításával (II. típus) vagy a célsejtek megnyitásával és funkciójuk közvetlen megváltoztatásával (III. típus) (ALA'ALDEEN & WOOLDRIDGE, 2012).

A virulencia faktorok további nagy csoportjai az adhezinek, invazinok, a szervezet védekező rendszerei ellen ható és egyéb formában károsító faktorok. A virulencia mérésére szolgáló módszerek között leggyakoribb a hemolitikus aktivitás vizsgálata, mely során a baktériumok vörösvérsejtekre gyakorolt hatását tesztelik fenotípusosan, általában birkavért tartalmazó agarlemezen.



1. sz. ábra: A hemolitikus aktivitás különböző formái. A: béta, B: alfa, C: gamma; forrás: [http9](http://)

A vörösvérsejtek bontása alapján alfa-, béta- és gamma-hemolizáló törzseket különítenek el egymástól (1. sz. ábra), melyek közül a legintenzívebb forma a béta-hemolízis. A béta-hemolizáló törzsek teljes mértékben elbontják a vörösvérsejteket, így a telepek körül jól látható, áttetsző feltisztulási zóna alakul ki. Az alfa-hemolízis során a hemoglobinban található vasat oxidálják a baktériumok, melynek hatására zöldes elszíneződés figyelhető meg a véres táptalajon, míg a gamma-hemolizáló törzsek nem képesek a hemolízisre. A hemolitikus aktivitás formái szerint bizonyos nemzetségekhez (pl.: *Streptococcus*) tartozó fajokat további alcsoportokba sorolnak (FACKLAM, 2002).

2.4 Invazivitás

Az invazivitás a mikrobák bizonyos szövetekbe való behatolási képességét jelenti, például képes-e az ép bőrön áthatolni, mint a *Leptospira*, vagy csak sérülésen keresztül (pl.: *Clostridium tetani*). A *Vibrio cholerae* noninvazív, nem hatol be a vékonybél endothel sejtjeibe, hanem enterotoxinjával a bélnyálkahártyára hatva okozza a hasmenést (LOSONCZY, 2001).

2.5 Kolonizáció – infekció

A mikroorganizmusok megtelepedése és szaporodása adott gazdaszervezet szöveteiben – a szervezet válaszreakciójától függően - kolonizációhoz vagy infekcióhoz vezet. Az infekciót a szervezet válaszreakciója jelzi, általában klinikai tünetekkel jár, míg a kolonizáció esetében a bőrön vagy nyálkahártyán megtelepedő mikrobák szaporodásának nincsenek jelei, a válaszreakció hiányzik vagy minimális. Azon mikroorganizmusok összességét, melyek általánosságban megtalálhatók az emberi szervezetben, mikrobiótának nevezzük (LOSONCZY, 2001).

2.6 Klinikai epidemiológia

A klinikai epidemiológia vagy más néven klinikai járványtan a nozokomiális (gyógyító intézményekben szerzett) fertőzések elleni tevékenységet foglalja magában. Fő feladata megelőzni az (általában) immunhiányos ápoltak betegellátása során fellépő fertőző betegségek terjedését, előfordulásuk esetén leküzdeni azokat (LOSONCZY, 2001).

2.7 Biofilm

A mikrobáknak biztosítaniuk kell az ellenállást az őket érő különböző hatásokkal szemben, melyben fontos szerepet játszik a különböző felületeken való megtapadási képesség. Ebben az adhézióban nyújt segítséget exopoliszacharid termelés révén kialakuló biofilm.

A biofilmek olyan zárt mátrixú mikrobióta aggregátumok, amelyek egymáshoz, illetve természetes vagy mesterséges felszínhez kötődnek és különösen nagy szerkezeti és funkciós stabilitással rendelkeznek. A mikrobióta tokba záródik az extracelluláris mátrix miatt, ezáltal védetté válik a kedvezőtlen környezeti körülményekkel szemben. A biofilm szelektív előnyhöz is juttatja a baktériumokat, hiszen fenntartja a mobilis genetikai elemek sokféleségét és kárpótolja az ahhoz kötődő „fitness cost”-ot (a rezisztencia gének megszerzése után a fenntartásukat igénylő energia) (CHAPMAN, 2015). A biofilm forrása lehet a krónikus és perzisztens fertőzéseknek és erős védelmet jelent az immunrendszerrel és az antibiotikumokkal szemben (WEI & MA, 2013).

Ez az ősi alkalmazkodási forma korán megjelent, az evolúció prokarióta fázisában, hogy védelmet biztosítson a sejtek számára. A biofilm egyetlen primitív, soksejtes organizmusnak is tekinthető, amely ugyanazt a stratégiát alkalmazza a környezettel történő kölcsönhatásában, mint az eukarióta szervezetek (AMINOV, 2011).

A biofilmek megtalálhatóak a természetes vízi ökoszisztémákban a folyók és patakok kavicsain, az álló víztestek felszínén, a szennyvíztisztító rendszereken belül a szennyvízcsöveken, csepegtető testes rendszerekben, a melegvízű forrásokban, a tengeri ökoszisztémák partvidékein, illetve az emberek és állatok fogain, valamint az emberi testben krónikus fertőzés esetén. Humán vonatkozásban a biofilm képződés főként a fertőzőes betegségek kórtanához köthető, melytől rendkívül nehéz megszabadulni a megnövekedett antibiotikum rezisztencia miatt (AMINOV, 2011). A biofilmek gyorsabb regenerációra képesek és szélsőséges környezeti hatásokra megváltoztatják közösségük működését és felépítését. Az antibiotikum termelő baktériumok biofilmjében élő, antibiotikumra érzékeny baktériumok túlélésében közre játszanak a rezisztencia gének (HENRIQUES ET AL., 2012).

A mikroorganizmusok kölcsönhatásban állnak egymással a biofilmekben és kémiai jelanyagokkal (pl. homoszerin laktón) érintkeznek, melyeket *quorum sensing* molekuláknak nevezünk. A *quorum sensing* a baktériumoknál egyfajta sejtközötti jelátvitelt jelent, amikor a

magas sejtsűrűség miatt a jelző molekulák a sejteken kívülre kerülnek, majd a sejtek között kapcsolatot teremtenek koordinálva a génexpressziót. Mivel a *quorum sensing* fontos a biofilm képzésben, ezért a folyamatba történő közbeavatkozás segíthet kontrollálni a biofilmeket (MATZ, 2011).

A biofilmekben lévő mikrobiális sejtek antibiotikum ellenállása meghaladhatja a tízszeres - százszoros értéket a planktonikus társaikhoz képest. Ahhoz, hogy az antibiotikum kifejtsen a hatását, a védelmező mátrixon keresztül be kell jutnia, ahol a beágyazódott sejtek találhatóak. A mátrix limitálja az anyagok transzportját a biofilm szerkezete révén, így az antibiotikum behatolásának esélyét csökkenti. Az antibiotikumok megkötődhetnek a mátrixban is, így képtelenek kifejteni hatásukat a beágyazódott sejtekre, illetve a mátrixban jelenlévő enzimek szintén hatástalanítani tudják őket (MCCARTY ET AL., 2014).

2.8 Antibiotikum rezisztencia

A használatban lévő antibiotikumok túlnyomó többsége, melyek jó része szintetikus úton kerül előállításra, a környezeti mikroorganizmusok által termelt antibiotikumok szerkezetén alapszik. A penicillin felfedezése óta antibiotikumok százait fedezték fel vagy szintetizálták, humán vagy állati fertőzések gyógyítása céljából. Az antibiotikumok megreformálták a modern mezőgazdaságot a profilaxis, illetve terápia céljából alkalmazott kezelésekkel (SARMAH ET AL., 2006). Helytelen, illetve túlzott használatuk azonban antibiotikum rezisztens baktériumok és antibiotikum rezisztencia gének kialakulásához és terjedéséhez vezetett, ami jelentősen csökkentette a terápiás hatékonyságukat a humán és állati megbetegedések kezelése során (WRIGHT, 2010). 2015-ben a WHO sürgősen kezelendő, globális, közegészségügyi problémának minősítette az antibiotikum rezisztenciát (WHO, 2015).

Az antibiotikum rezisztencia lehet **genetikailag kódolt**, azaz jellemző az adott faj összes képviselőjére (például az *Enterobacteriaceae* család glikopeptidekkel szemben való ellenállása) vagy **szerzett** tulajdonság, ami kizárólag az adott törzset érinti. A szerzett rezisztencia eredetileg érzékeny baktériumtörzseknél alakulhat ki, rezisztenciát kódoló gén megszerzésével más baktériumtól (fajon belül vagy akár nemzetségek közt is), vagy mutációval. Az antibiotikum rezisztencia gének általában mobilis genetikai elemeken helyezkednek el, melyek lehetnek plazmidok (a kromozómától független, gyűrű alakú, kettős szálú DNS molekula) vagy transzpozonok („ugráló gének”, a DNS mobilis szekvencia részei, melyek képesek megváltoztatni helyüket a genomon belül). Rezisztencia gén szerzése több módon végbemehet: **konjugációval** (közvetlenül sejt-sejt közti átadással), **transzdukción** során (bakteriális DNS bakteriofággal történő átvitele) és **transzformáció** segítségével (DNS felvétele a környezetből). Az antibiotikum rezisztencia fő mechanizmusai közé tartozik az **inaktiváló enzimek** termelése (pl.: béta-

laktamázok, karbapenemázok, aminoglikozidokat módosító enzimek stb.), a **célstruktúra megváltozása** (az antibiotikum kötődésére alkalmas hely megváltoztatásával csökken, vagy akár teljesen meg is szűnhet a gyógyszer hatása), az **efflux pumpa** mechanizmus (a sejt folyamatosan pumpálja ki az antibiotikumot, így nem jön létre a hatáshoz szükséges koncentráció) és a sejtfal **permeabilitásának megváltozása** (a porin csatornák megszüntetésével megváltozik a bakteriális sejtfal átteresztő képessége, így a hatóanyag nem tud bejutni a sejtbe) (MACGOWAN&MACNAUGHTON, 2017).

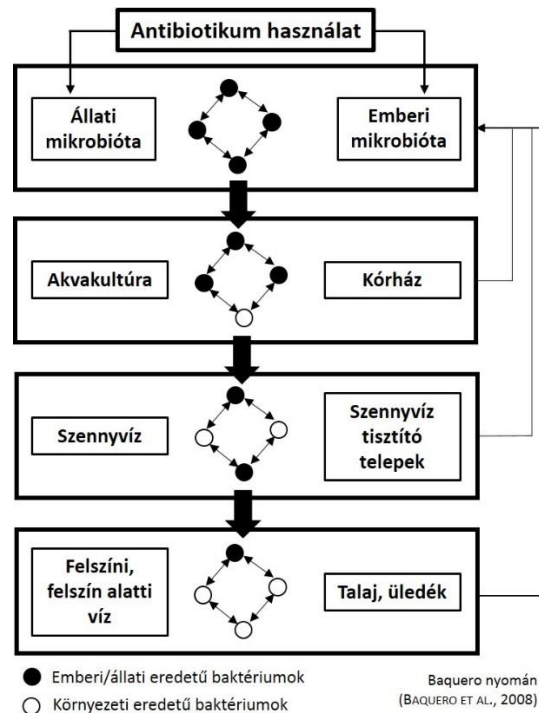
Az antibiotikum rezisztencia tekintetében fontos megemlíteni néhány fogalmat, melyek használata időnként még a nemzetközi irodalomban sem egységes. Magyarországon gyakran szinonimaként említik a nemzetközi irodalomból ismert, három különböző kifejezést.

Érzékeny (szenzitív) egy adott baktériumtörzs, ha a terápiában releváns antibiotikum hatóanyagokra nézve nem mutat rezisztenciát. Egy baktériumtörzset akkor is érzékenynek tekintünk, ha természetes rezisztenciájánál fogva bizonyos (a terápia szempontjából nem releváns) hatóanyagokkal szemben ellenálló. **Multirezisztens** baktériumról (MDR – multidrug-resistant) abban az esetben beszélhetünk, ha az adott baktérium a klinikai terápiában használt, legalább három antibiotikum hatóanyagcsoport legalább egy-egy hatóanyagával szemben ellenállónak bizonyul. A „**kiterjedt rezisztenciával**” rendelkező kórokozók (XDR - extensively drug-resistant) a klinikai terápiában releváns hatóanyagcsoportok közül egy vagy két hatóanyagcsoport kivételével ellenálló a hatóanyagcsoportok legalább egy hatóanyagával szemben. A legkritikusabb kategóriába a **pánrezisztens** (PDR – pandrug-resistant) mikroorganizmusok tartoznak, melyek gyakorlatilag az összes elérhető antimikrobiális szerrel szemben ellenállást mutatnak (FALAGAS&KARAGEORGOPOULOS, 2008; MAGIORAKOS ET AL., 2011).

Az antibiotikum rezisztens baktériumok között egyre gyakoribbak a pánrezisztens mikroorganizmusok, melyek legyőzése új, hatékony gyógyszerek nélkül igen nagy kihívást jelent. Különös aggodalomra adnak okot az „ESKAPE” csoportba (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) tartozó kórokozók, melyek a nozokomiális fertőzések szempontjából kiemelt jelentőségűek. Európában évente 25 000 ember halálát okozza antibiotikum rezisztens baktérium által okozott, kórházban szerzett fertőzés (BASSETTI ET AL. 2011; MACGOWAN&MACNAUGHTON, 2017; ECDC, 2017).

Antibiotikum rezisztens mikrobák a vízi környezetbe kerülhetnek emberi és állati forrásból egyaránt, ahol képesek átadni rezisztencia génjeiket a természetes vízi ökoszisztémában élő mikroorganizmusoknak. Az antibiotikum rezisztencia négy „reaktora” ismert (2. sz. ábra), ahol lehetőség nyílik a genetikai elemek kicserélődésére és rekombinációjára, ami formálja és meghatározza a rezisztencia „fejlődését”. A humán- vagy állati eredetű baktériumok leginkább a

legalacsonyabb szinten lévő reaktorban keverednek a környezeti eredetű baktériumokkal növelve a genetikai sokféleség jelentőségét, illetve az új rezisztencia mechanizmusok kialakulásának lehetőségét, melyek ismét bekerülhetnek az emberi vagy állati szervezetbe. A vizekbe kerülő ipari eredetű antibiotikumok szintén megváltoztathatják a mikrobiális ökoszisztémát. A megelőzés elvét követve, célszerű az emberi- és állati eredetű baktériumok keveredését elkerülni a környezeti mikroorganizmusokkal (BAQUERO ET AL., 2008).



2. sz. ábra: Az antibiotikum rezisztencia négy „reaktora” (BAQUERO ET AL., 2008).

Napjainkban számos kutatás irányul a vizekben megjelenő antibiotikum szennyeződések felderítésére, megakadályozására. Összehasonlították például Vietnamban a Mekong folyóban (7-360 ng/L) és Japánban a Tamagawa folyóban (4-448 ng/L) előforduló antibiotikumokat és mennyiségüket, mely során a Japán víztestben többféle antibiotikumot (szulfamethoxazol, szulfapiridin, trimethoprim, eritromicin, azitromicin, klaritromicin, roxitromicin), nagyobb mennyiségben találtak (MANAGAKI ET AL., 2007). Egy állatorvosi gyakorlatban alkalmazott szer, a szulfametazin, igen magas koncentrációját detektálták a vietnami vizekben, mely sertésfarmok és csirketelepek elfolyó szennyvizében is kimutatható. Az adott szer molekuláris markerként hatékonyan alkalmazható állati eredetű szennyezések felderítésére (MANAGAKI ET AL., 2007). Egy másik tanulmányban három antibiotikum csoport (Fluorokinolonok, Tetraciklinek, Szulfonamidok) jelentlétét vizsgálták Kína természetes vízgyűjtő területén, ahol a domináns szerek a Tetraciklinek voltak 3164 ng/L koncentrációval (ZHANG ET AL., 2014).

2.9 Biológiai ágensek besorolása közegészségügyi szempontból

A biológiai ágensek közül a mikroorganizmusok többsége az emberre nézve ártalmatlan, sőt számos, előnyös tulajdonsággal rendelkezik, melyeket előszeretettel alkalmazunk a biotechnológiában például enzimek, metabolitok előállítására vagy felhasználjuk őket bioremediációs célokra, illetve az élelmiszeriparban fermentációs eljárásokhoz. A csoport egy kisebb része azonban olyan tulajdonságokkal bírhat, mint a patogenitás és a virulencia, aminek következtében képesek lehetnek betegségek kialakítására különböző gazdaszervezetekben (humán, állati, növényi). E tulajdonságok vizsgálatával foglalkozik az infektológia tudománya, melynek főbb definícióit korábban ismertettem.

Ezen mikroorganizmusok több figyelmet kapnak, hiszen veszélyt jelentenek az emberi-, az állati egészségre és a mezőgazdaságra, komoly gazdasági károkat is okozva. Az általuk okozott fertőzés mértéke függ a kórokozó tulajdonságaitól (virulencia, invazivitás, toxikus anyagok termelése stb.), illetve a gazdaszervezet ellenállóképességétől, immunrendszerének állapotától (http10).

Kockázatelemzés és -kezelés céljából a mikroorganizmusokat az emberi egészséget fenyegető kockázatuk alapján is osztályozzák. A leggyakrabban alkalmazott, négykategóriás besorolást a nemzetközi szervezetek „biosafety level” (biológiai veszély szintje) vagy „risk group” (kockázati csoport) elnevezéssel illetik.

Az Európai Unió hatályban lévő, 2000/54/EC számú irányelve szerint, a biológiai ágensekkel történő munkavégzés során az alábbi kategóriákat kell figyelembe venni:

Group 1: nem valószínű, hogy emberben megbetegedést vált ki.

Group 2: emberben betegséget okozhat és veszélyt jelenthet a munkavállalók számára; nem valószínű, hogy közösségben elterjed, általában hatékony megelőzés és kezelés áll rendelkezésre vele szemben.

Group 3: súlyos emberi megbetegedést válthat ki, és veszélyt jelent a munkavállalókra nézve; kockázat áll fenn a közösségben való elterjedésére, de általában hatékony megelőzés és kezelés áll rendelkezésre vele szemben.

Group 4: súlyos emberi betegséget okoz, súlyos veszélyt jelent a munkavállalókra; nagy a kockázat esetében a közösségben való elterjedésre és általában nem áll rendelkezésre hatékony megelőzés vagy kezelés esetében (DIRECTIVE 2000/54/EC).

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO, USA) által kiadott Laboratory Biosafety Manual-ban (Laboratóriumi Biológiai Biztonság Kézikönyve) foglaltak szerint a 4 kockázati csoport az alábbiak szerint alakul a laboratóriumi dolgozókat, a közösséget, az állatállományt és a környezetet illetően:

Risk Group I.: alacsony egyéni és közösségi kockázat; nem valószínű, hogy emberi vagy állati betegséget okoz.

Risk Group II.: mérsékelt egyéni, korlátozott közösségi kockázatot jelent; emberi vagy állatbetegséget okozhat, de nem valószínű, hogy súlyos veszélyt jelent a laboratóriumi dolgozókra, a közösségre, az állatállományra vagy a környezetre. A laboratóriumi expozíció súlyos fertőzést okozhat, de hatékony kezelés és megelőző intézkedések állnak rendelkezésre, a terjedési kockázat korlátozott.

Risk Group III.: magas egyéni, alacsony közösségi kockázat; általában súlyos emberi betegséget okoz, de általában nem terjed a közösségben.

Risk Group IV.: magas egyéni és közösségi kockázatot jelent; általában súlyos emberi vagy állati megbetegedést okoz, könnyen terjed közösségben közvetlenül vagy közvetve (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

A legátfogóbb kockázati listával a német TRBA (Technische Regel für Biologische Arbeitsstoffe, Biológiai anyagokkal való munkavégzésre vonatkozó technikai szabályozás) rendelkezik, melynek kategóriái megfeleltethetők az európai irányelvben meghatározott csoportosításának. Részletessége miatt a továbbiakban az egyes fajok kockázati besorolásánál a TRBA listára hivatkozom (<http://11>).

2.10 Opportunista patogén baktériumok

A patogén mikroszervezetek közül kiterjedt antibiotikum rezisztenciája miatt kiemelt kutatás-fejlesztési prioritást élvez a karbapenem-rezisztens *A. baumannii*, *P. aeruginosa* és az *Enterobacteriaceae* család (<http://15>). Doktori dolgozatom középpontjában így a kritikus jelentőségű mikroszervezetek közül a környezeti viszonyok között még kevésbé vizsgált *Acinetobacter* nemzetség (különös tekintettel az *A. baumannii* fajra), és a *Pseudomonas aeruginosa* baktériumfaj áll. A következő alfejezetekben ezt a két fajt és nemzetségeiket jellemzem részletesebben.

2.10.1 Az *Acinetobacter* nemzetség jellemzése

A nemzetség tagjait első azonosításuk óta számos különböző néven leírták, az *Acinetobacter* elnevezést először 1954-ben rendszeresítették. Ez egy heterogén csoportot jelzett, melynek tagjai olyan, mozgásra képtelen Gram-negatív szaprofiták voltak, melyeket más, hasonló baktériumoktól a pigmentáció hiánya különböztetett meg. 1971-ben az *Acinetobacter* nemzetség az előző csoportból már csak az oxidáz-negatív törzseket tartalmazta. A Bergey's-féle baktériumhatározó 1984-ben a *Neisseriaceae* családba sorolta a nemzetséget, azonban újabb, molekuláris taxonómiai kutatások eredményeként ma már a *Moraxellaceae* család tagjaiként tartják őket számon, a *Moraxella* és a *Psychrobacter* nemzetségekkel egyetemben (BERGOGNE-

BEREZIN&TOWNER, 1996). A nemzetség hivatalos, érvényben lévő taxonómiai besorolása a következő: Prokarióták → Domén: *Bacteria* → Törzs: *Proteobacteria* → Osztály: *Gammaproteobacteria* → Rend: *Pseudomonadales* → Család: *Moraxellaceae* (http12).

A nemzetséghez jelenleg 62 törzs tartozik (http13), melyek közül 40 típus-törzs hozzáférhető a Német Nemzeti Törzsgyűjteményben (DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) is. A német törzsgyűjteménynél letétbe helyezett 40 faj közül 19-et Risk Group 2¹-es besorolás mellett tartanak számon (http14).

Az *Acinetobacter* nemzetség tagjai oxidáz tesztben negatív reakciót adnak, míg a kataláz teszt során pozitív eredményt figyelhetünk meg. A legtöbb törzs annak ellenére, hogy nem képes a nitrátot nitráttá redukálni, nitrogénforrásként hasznosítani tudja mindkét vegyületet. Az *Acinetobacter*-ek jelentős része nem képes fermentálni a glükózt, de előfordulnak olyan törzsek, melyek az Entner-Doudoroff² úton keresztül fel tudják azt használni energiaforrásként (TOWNER, 2006, ALMASAUDI, 2018). Nem fermentáló, szigorúan aerob, szabadon élő, ubikviter, jellemzően opportunista baktériumok, melyek nem csak a talajban, felszíni és felszín alatti vizekben, illetve élelmiszerekben fordulnak elő, hanem klinikai környezetben is jelen vannak számos nozokomiális fertőzést okozva. Morfológiai jellemzésük során kicsi, telt pálcákat, vagy kokkobacilluszokat figyelhetünk meg, melyek gyakran állnak párban, vagy láncba kapcsolódva. Nem spóráképző, és flagellumok, csillók hiányában alapvetően mozgásra képtelen mikroszervezetek, azonban félfolyékony tápközegben bizonyos speciális mozgásformák mégis megfigyelhetők esetükben (TOWNER, 2006). A telepek átmérője 1-2 mm, ép szélűek, felületük lehet sima vagy fényes, nyálkás. Az *Acinetobacter* nemzetség képviselői széles hőmérsékleti tartományban szaporodnak, a legtöbb törzs hőoptimuma 33°C, de néhány környezeti izolátum jobban szaporodik 20-30°C-on. A klinikai törzsek általában 37°C-on növekednek legjobban, de előfordulnak olyanok is, amelyeknek a 42°C kedvez (TOWNER, 2006).

Sokoldalú metabolikus tulajdonságaiknak köszönhetően fontos szerepet játszhatnak különböző ipari-környezeti biotechnológiai folyamatokban, mint például a környezeti szennyező anyagok biodegradációjában (TOWNER, 2006; ERDEM&LEBER, 2018).

A nemzetség számos tagja képes lebontani különböző vegyületeket, beleértve alifás alkoholokat, aminosavakat, zsírsavakat, egyenes láncú szénhidrogéneket, cukrokat, és számos, viszonylag nehezen lebomló aromás vegyületet, mint a benzoát, az n-hexadekán, a ciklohexanol és a 2,3-butándiol. A nemzetség tagjai különösen alkalmasak a ritka biokémiai utak tanulmányozására, és szerepet játszhatnak számos szennyező anyag és ipari termék – például a

¹ Risk Group 2: Legyengült szervezetben betegség kialakítására képes

² Entner-Doudoroff út: a baktériumoknál a glükóz lebontásának (piruvátig) egyik útja, csak prokariótákra jellemző. Eredménye: 1 ATP, 1 NADH

poliklórozott bifenilek – lebontásában. Képesek a szennyvízből eltávolítani a foszfátot, csökkentve ezzel az eutrofizáció problémáját a szennyvíztisztító telepeken (TOWNER, 2006).

Izoláltak olyan *Acinetobacter* törzseket, amelyek motorolajból származó, hosszú láncú n-paraffinokat bontottak és nagymértékben csökkentették az olaj mennyiségét a szennyezett talajban (KOMA ET AL., 2001). Bioaugmentációs eljárás során egy *A. baumannii* törzs 90 nap alatt 89,3 g/talaj kg-ról 53,9 g/talaj kg-ra csökkentette a közegben mérhető TPH szennyezést. Laboratóriumi körülmények között rázólabombikos kísérletben is tesztelték ugyanazon törzs bontási képességét, és a kezdeti TPH szint több, mint 50%-os csökkenést mutatott 120 óra elteltével (MISHRA ET AL., 2004). Az *Acinetobacter lwoffii* kevert mikrobatenyészetben metil-terc-butil-éter biodegradációja képes (ACUNA-ASKAR ET AL., 2000). Az *Acinetobacter calcoaceticus* biofilm képzésre hajlamos törzs, mely képes olajszármazékok jelenlétében növekedésre, illetve az alifás és aromás szénhidrogének emulgeálására (MARÍN ET AL., 1995).

2.10.1.1 Az *Acinetobacter* fajok humánegészségügyi jelentősége

Az *Acinetobacter* nemzetség tagjai opportunisták, és az utóbbi években a nozokomiális fertőzések mind gyakoribb kórokozói: különösen nagy veszélyt jelentenek az intenzív osztályok betegeire. Elsődlegesen tüdőgyulladást okozhatnak, főként immunhiányos betegeknél, akik műtéten, vagy valamilyen traumán estek át (pl.: égési sérülés, roncsolt sebek stb.). Általuk okozott megbetegedés még a vérmérgezés, a szívbelhártya gyulladás, az agyhártyagyulladás, a bőr- és sebfertőzések, valamint a húgyúti fertőzés. A nemzetségen belül, kórházi környezetből leggyakrabban izolált kórokozócsoport az *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* komplex (ACB) (GIAMARELLOU ET AL., 2008), mely magában foglalja az *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii* és *A. nosocomialis* fajokat (NEMEC ET AL., 2011). A komplex négy tagját fenotípusos és biokémiai tulajdonságai alapján szinte lehetetlen elkülöníteni egymástól, igen nagy a hasonlóság köztük, ennek köszönhető az ACB komplex csoport létrejötte (GERNER-SMIDT ET AL., 1991). A komplex tagjai közül azonban klinikai jelentőséggel csupán három tag, az *A. baumannii*, az *A. nosocomialis* és az *A. pittii* bír (WISPLINGHOFF ET AL., 2012). Ezen belül is, a legnagyobb veszélyt az *A. baumannii* fajnak tulajdonítják, mely magasabb mortalitási mutatókkal rendelkezik az *A. nosocomialis* és *A. pittii* fajoknál (LIU ET AL., 2017). A csoport negyedik tagját, az *A. calcoaceticus* faj képviselőit leggyakrabban talajból és vízmintákból izolálják, humán megbetegedéssel nagyon ritkán hozzák összefüggésbe (NEMEC ET AL., 2011).

Az *Acinetobacter* nemzetség képviselői által kiváltott egészségkockázatot súlyosbítja, hogy rendkívül gyorsan fejlesztenek rezisztenciát a legtöbb potenciálisan ellenük adható antibiotikummal szemben, aminek az egyik fő oka, hogy a kórházakban túlélő törzsek a kezelések során túlzott és helytelen mértékben alkalmazott antibiotikumokhoz adaptálódnak, és így

ellenállóvá válnak velük szemben. A nemzetség képviselői különböző rezisztencia mechanizmusokkal védekezhetnek az antibiotikumok széles körével szemben. Hajlamosak általában csak az *A. baumannii* törzsek által hordozott antibiotikum rezisztencia gének jelentőségének hangsúlyozására, azonban fontos kiemelni a nemzetség más, „nem-*baumannii*” fajai által hordozott veszélyeket. 2017-ben először jelentettek *A. schindleri* fertőzést járóbetegnél (52 éves, HIV pozitív és Hepatitis C fertőzött nő), ahol a kitenyésztett izolátum több antibiotikummal szemben, köztük a Karbapenemekre is rezisztens volt és birtokolta a bla_{NDM-1} gént. Ez a példa is igazolja, hogy fontos felhívni a figyelmet azon rezisztencia génekre, melyeket a nemzetség „nem-*baumannii*” törzsei széleskörben birtokolhatnak (MONTAÑA ET AL., 2018).

Ellentétben a *Moraxellaceae* család más tagjaival, a nemzetség legtöbb tagja rezisztens a penicillinnel, valamint számos klinikai izolátum a Cefalosporinokkal szemben a kromozómális cefalosporináz enzim termelése miatt. Az antibiotikumokkal szemben mutatott rezisztencia összefüggésben van a plazmidokon kódolt tulajdonságokkal (TOWNER, 2006), a megszerzett tulajdonságot a törzsek ugyanis gyakran mobilis genetikai elemek közvetítésével át tudják adni egymásnak, terjesztve ezzel a rezisztenciát. Ilyen módon vált a klinikai *A. baumannii* törzsek nagy része az utóbbi években a Karbapenemekkel, Fluorokinolonokkal és Aminoglikozidokkal szemben ellenállóvá.

Multirezisztens *Acinetobacter* izolátumokat világszerte, számos kórházban észlelnek, Európából, az Egyesült Államokból, Kínából, Hong Kongból, Koreából és Japánból is jelentettek ilyen törzseket (GIAMARELLOU ET AL., 2008). A multirezisztens törzsek száma folyamatosan emelkedik, ami hazai körülmények között is jelentős problémát okoz. 2007-ben Magyarországon 84 beteg fertőződött meg multirezisztens *A. baumannii*-val, ami 2009-re elérte a 230-at, 2010-ben pedig már 352-re emelkedett (PÁSZTI ET AL., 2011).

2.10.1.2 Az *Acinetobacter baumannii* jellemzése és kórházi jelentősége

A nemzetség leggyakrabban vizsgált képviselője az *Acinetobacter baumannii*, mely Gram-negatív, pálcika alakú, aerob, mozgásra képtelen, opportunista patogén, egészségkockázati besorolása Risk Group 2, azaz elsősorban legyengült immunrendszerrel rendelkezők körében képes betegség kiváltására. Patogén tulajdonságai közt számon tartják a biofilm képzést, a különböző felületeken való megtapadást, az antibiotikum rezisztenciát és azt a képességet, hogy különböző genetikai elemeket szerezzen akár nem rokon nemzetségektől, ezáltal sokoldalúvá téve genetikai állományát (HOWARD ET AL., 2012). Nozokomiális fertőzésekért felelős, mint a véráram fertőzés, a tüdőgyulladás, az agyhártyagyulladás, húgyúti fertőzések és sebfertőzések (FOURNIER & RICHET, 2006; MUNOZ-PRICE & WEINSTEIN, 2008). Általában vizes környezettel hozzák összefüggésbe, kolonizál bőrön és nyálkahártyán, fertőzött egyéneknél gyakran izolálják

légzőszervi és garat váladékból (TURTON ET AL., 2006; SEBENY ET AL., 2008). Karbapenem rezisztens változata szerepel a WHO „elsőbbségi patogén” (http15) listáján antibiotikum rezisztenciája miatt, illetve része az „ESKAPE” csoportnak, melynek tagjai a nozokomiális fertőzések döntő hányadáért felelősek (SANTAJIT & INDRAWATTANA, 2016; ECDC, 2017).

2.10.1.2.1 Az *A. baumannii* virulenciája

Az acinetobacterek virulenciája egyelőre kevésbé feltérképezett, így kevesebb információ áll rendelkezésre a témában, mint pl. a *P. aeruginosa* esetében. Korábban az *A. baumannii* fajt alacsony virulenciájú kórokozónak tekintették (PELEG ET AL., 2008), azonban a közelmúltban végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy különböző patogenitási formákat mutat, mint a biofilm képzés, gazdasejtek inváziója (BROSSARD & CAMPAGNARI, 2012; GADDY ET AL., 2009; SMANI ET AL., 2012) vagy a vas felvétele, ami az acinetobactin nevezetű sziderofór termelésének köszönhető, így a gazdaszervezetből elvonja a vasat (ZIMBLER ET AL., 2009).

A Gram-negatív baktériumok külső membránja főként foszfolipidekből, lipopoliszacharidból és külső membrán proteinekből (Omp - outer membrane protein) áll, melyek fontos szerepet játszanak a baktériumok patogenitásában (BEVERIDGE, 1999; LIN ET AL., 2002). Japán kutatók különböző külső membrán proteinek kódoló gének (*ompA*, *omp33-36*, *carO*) expresszióját vizsgálták *A. baumannii* törzsekben, ahol összefüggést találtak a gének kifejeződése és a törzsek patogenitása között (SATO ET AL., 2017). Ezzel egyidőben, *A. baumannii* törzsek genomanalízise alapján, az *ompA* gént mutatták ki leggyakrabban, a faj egyik fő virulencia faktoraként (VIJAYASHREE ET AL., 2018).

Egy másik kutatás a foszfolipáz C (*plcN*) és az elasztáz (*lasB*) termeléséért felelős virulencia géneket vizsgálta, melyek jelenléte növelte a törzsek esetében megjelenő mortalitást, illetve fokozott invazivitást okozott az A549 sejtvonalon (KAREEM ET AL., 2017).

Egy laboratóriumi kísérletben a *tonB* géntől függő réz receptort kiütötték az *A. baumannii* kromoszómájából, mely hatására csökkent az adott törzs túlélési képessége, biofilm képzése és tapadása a humán epiteliális sejtekhez, ezzel bizonyították a gén szerepét az *A. baumannii* virulenciájában (ABDOLLAHI ET AL., 2018).

2.10.1.2.2 Antibiotikum terápia és rezisztencia az *A. baumannii* törzsek körében

Az antibiotikum érzékeny *Acinetobacter* törzsek által okozott fertőzések esetében első választású szerek lehetnek a Cefalosporinok csoportjába tartozó ceftazidim és cefepim hatóanyagok vagy béta-laktamáz gátlóval kombinált változatuk, illetve a Karbapenem hatóanyagok, mint az imipenem, a meropenem és a doripenem (FISHBAIN&PELEG, 2010). Az imipenem rezisztens izolátumok érzékenyek lehetnek a meropenem hatóanyagra és fordítva, így a

specifikus Karbapenem hatóanyag alkalmazását megelőzően javasolt megbizonyosodni hatásosságáról. A béta-laktamáz gátlók közül a szulbaktám is igen hatásos az *Acinetobacter* fertőzésekkel szemben (FISHBAIN&PELEG, 2010), az Egyesült Államokban ez csak az ampicillin (Penicillin) kombinációjával érhető el (JELLISON ET AL., 2001; SMOLYAKOV ET AL., 2003), melynek hatékonysága az imipenemével közel azonos. Azon esetekben mikor a Cefalosporin és Karbapenem hatóanyagok hatástalanok egy hatóanyaggal történő kezelésben (monoterápia), Fluorokinolon vagy Aminoglikozid hatóanyagokkal kombinációban is alkalmazzák őket (TATMAN-OTKUN ET AL., 2004), vagy egyedi terápiában Aminoglikozid, ritkán pedig piperacillin/tazobaktám hatóanyagot javasolnak (TUON ET AL., 2015). Az első választású szerekkel (pl. Karbapenemek) szemben jelentkező rezisztencia esetén korlátozottak a terápiás lehetőségek, ilyenkor alternatív szerként alkalmazhatnak a Polimixinek csoportjába tartozó szereket (kolisztin, polimixin B), továbbá a Tetraciklinek közé tartozó minociklin és tige ciklin szintén fontos szerepet játszhat (DE PASCALE ET AL., 2014; GARNACHO- MONTERO ET AL., 2015). A különböző, nemzetközi szervezetek által kiemelten fontosnak tartott antibiotikum hatóanyagok listáját a 2. sz mellékletben foglaltam össze.

Az *A. baumannii* törzsek körében igen nagy jelentőséggel bír az antibiotikum rezisztencia, a világ minden részéről jelentettek már multirezisztens izolátumokat (LIN & LAN, 2014; ALMASAUDI, 2018). A leggyakrabban kimutatott rezisztencia gének közt szerepelnek a béta-laktamázok, melyek inaktíválják a béta-laktám antibiotikumokat. Ilyen például a *TEM*, *SHV*, *CTX-M*, *GES*, *PER*, *VEB*, *CARB*, *KPC*, *ESBL*, *VIM*, *IMP*, *NDM* stb., melyeket különböző osztályokba (A, B, C, D) sorolnak. Az *A. baumannii* egyik jellegzetessége a kromoszómáisan kódolt *bla_{OXA-51}* csoportba tartozó béta-laktamáz gén hordozása, mely a Karbapenemekkel szembeni rezisztenciát kódolja (PÁSZTI ET AL., 2011). Az OXA-51 oxacillináz normál expressziója alapvetően a Penicillinek és Karbapenemek gyenge hidrolízisére elegendő (nem aktívak a széles-spektrumú cephalosporinok ellen), azonban kimutatták, hogy az ISAbal, vagy az ISAbal9 genetikai elemek jelenléte a *bla_{oxa-51}* típusú gének upstream régiójában fokozza a génexpressziót (TURTON ET AL., 2006). A rezisztenciáért felelősek még az efflux pumpa túlműködésében közrejátszó gének (*Ade*, *Abe*, *Tet* stb.), illetve a sejtfa permeabilitás megváltozásáért (*omp*, *carO*...stb.) és a célhely megváltozásáért felelős gének (*GyrA*, *ParC*, *TetM*, *ArmA* stb.) (LIN & LAN, 2014). Az *A. baumannii* esetében azonosított antibiotikum rezisztencia mechanizmusokat Roca és munkatársai (2012) gyűjtötték össze az 1. sz. táblázatban foglalt módon.

1. sz. táblázat: Antibiotikum rezisztencia mechanizmusok az *A. baumannii* faj estében (ROCA ET AL., 2012)

Antimikrobiális hatóanyag	Rezisztencia mechanizmus	Csoport/család	Fehérje	Igazolt kapcsolat	
Béta-laktám	Kromoszómális cephalosporináz	C osztály	AmpC	IS	
	Karbapenem-hidrolizáló, D osztályú béta laktamáz	D osztály	OXA-51 OXA-23 OXA-24/40 OXA-58 OXA-143	IS IS, Tn, AbaR XerC/XerD IS, Tn	
	Metallo-béta-laktamáz	B osztály	IMP VIM SIM-1 NDM	Integron Integron IS, Tn AbaR	
	Kis jelentőségű béta-laktamázok	A osztály	TEM SHV SCO-1 CARB PER VEB CTX-M GES KPC	AbaR IS, Tn, integron IS, Tn, integron IS, integron, AbaR TN Integron	
			D osztály	OXA-2, 10, 20, 37	
			Csökkent permeabilitás	CarO 47 kDa OMP 44 kDa OMP 37 kDa OMP 33-36 kDa OMP 22-33 kDa OMP HMP-AB 43 kDa OMP	IS
			Efflux pumpa	RND	AdeABC AdeIJK PBP PBP
	Aminoglikozidok	Aminoglikozid-modifikáló enzimek		Acetiltransferázok Nukleotidiltransferázok Foszfotranszferázok	IS, Tn, Integron AbaR
		Célhely/kötőhely mutációja		16S rRNS metilázok	IS, Tn
		Efflux pumpa	RND MATE	AdeABC AbeM	IS
Kinolonok	Célhely mutációja		GyrA/ParC		
	Efflux pumpa	RND MATE SMR	AdeABC AdeIJK AdeFGH AbeM AbeS	IS	
Kloramfenikol	Efflux pumpa	RND	AdeABC AdeIJK AdeFGH	IS	
		MFS	CmlA CraA	AbaR	
		MATE SMR	AbeM AbeS		
Tetraciklinek	Efflux pumpa	MFS	TetA TetB	IS, Tn, AbaR	
	Riboszómális védelem	TetM			
Tigeciklin	Efflux pumpa	RND	AdeABC AdeIJK	IS	
Polimixin	'A' lipid modifikáció Lipopoliszacharid vesztés		PmrCAB LpxABC	IS	

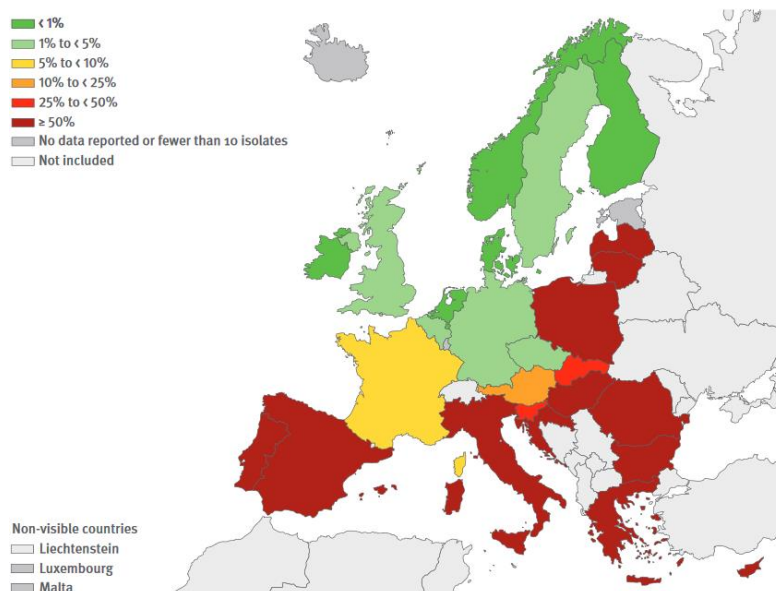
IS – inszerciós szekvencia; Tn – transzpozon; AbaR – rezisztencia sziget; RND – rezisztencia nodulációs sejt (resistant nodulation cell) divízió; MATE – multirezisztens és toxikus komponenseket kiválasztó család (multidrug and toxic compound extrusion family); SMR – az efflux pumpák egyik családja (small multidrug resistance family)

A magyarországi Országos Epidemiológiai Központ jogutódjaként működő Nemzeti Népegészségügyi Központ az európai rendszer részeként vizsgálja és jelenti az ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) felé az *Acinetobacter* törzsek által okozott fertőzések kezelésére leggyakrabban használt antibiotikumokkal (imipenem, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, gentamicin, tobramicin, amikacin, szumetrolim – trimethoprim+szulfamethoxazol) szembeni rezisztenciát (http15).

Az Európai Unió ügynöksége, az Európai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control) 2017-ben kiadott, 2016-ra vonatkozó jelentése szerint a tagországoktól származó adatok alapján a tesztelt klinikai *Acinetobacter* törzsek 55,4%-a mutatott rezisztenciát valamilyen hatóanyagcsoporttal szemben (Aminoglikozidok, Karbapenemek, Fluorokinolonok), amiből 43,3% a multirezisztencia kritériumainak is megfelelt (ECDC, 2017).

Magyarországi viszonylatban a Nemzeti Népegészségügyi Központ adatai szerint (http16) 2016-ban több mint 4 000 betegből izoláltak *Acinetobacter baumannii*-t és vizsgálták 8 különböző, klinikailag releváns antibiotikummal (imipenem, meropenem, ciprofloxacin, levofloxacin, gentamicin, tobramicin, amikacin, szumetrolim) szemben az érzékenységüket. Minden esetben 39% feletti rezisztenciát detektáltak.

A Karbapenem rezisztenciát kiemelt figyelem kíséri, mivel ezek voltak az első szerek, melyeket alkalmazni kezdtek az *Acinetobacter* törzsekkel szemben, azonban terápiás jelentőségük a fokozódó rezisztencia miatt évről évre csökken. Helyettesítésükre egyelőre korlátozottak a lehetőségek, bár egyre gyakrabban váltják ki Polimixinekkel (pl. kolisztin) annak ellenére, hogy utóbbi hatóanyagok jelentős toxicitással rendelkeznek (főként akut veseelégtelenséget és neurológiai rendellenességeket okozhatnak) és farmakokinetikai jellemzőik (szervezeten belüli sorsuk) sem előnyösek (ZAVASCKI ET AL., 2008). Az ECDC felé jelentett Karbapenem rezisztencia adatok alapján hazánk az Európai Unió egyik legrosszabb helyzetben lévő országa (3. sz. ábra). A környezeti eredetű *A. baumannii* antibiotikum rezisztenciájáról elenyésző ismeretekkel rendelkezünk, mivel a baktériumfaj környezeti mintákból ritkán azonosítható (HIGGINS ET AL., 2018).



3. sz. ábra: Karbapenem antibiotikumokkal szemben rezisztens *Acinetobacter* törzsek aránya az Európai Unió országaiban, 2016. (ECDC, 2017)

2.10.1.2.3 Az *A. baumannii* biofilm képző képessége

Az *A. baumannii* biofilm képzésre képes, ami hozzájárul megbetegítő képességének fenntartásához és segítséget nyújt a kedvezőtlen külső hatásokkal szembeni védelemben. A kórházi törzsek képessége a biofilm képzésre, szerepet játszik a perzisztenciájukban és antibiotikum rezisztenciájukban (LONGO ET AL., 2014). A biofilm képzés növeli az *A. baumannii* törzsek virulenciáját, melyben többek közt szerepet játszik a *BfmS/BfmR* gének által szabályozott rendszer (TOMARAS ET AL., 2008; GADDY, 2009), a külső membrán protein (*OmpA*) (CHOI ET AL., 2005) és a *quorum sensing*et szabályozó *AbaI* (NIU ET AL., 2008) is. Összesen több mint 55 gén aktivitását figyelték meg az *A. baumannii* fajnál biofilm képzés során (RUMBO-FEAL ET AL., 2013).

2.10.1.2.4 *A. baumannii* a környezetben

Az *A. baumannii* faj környezeti eredetű képviselőiről igen kevés információ áll rendelkezésre a szakirodalomban. Többnyire, biodegradációs képességeinek köszönhetően, bontási kísérletek (LIU ET AL., 2016) vagy kármentesítési területekről izolált törzseket (PHROMMANICH ET AL., 2009; NKEM ET AL., 2016; POI ET AL., 2018) vonnak vizsgálat alá. Előfordul azonban egy-egy publikáció, mely a faj természetes környezetben való előfordulását, viselkedését kutatja. Egy Libanonban készült átfogó vizsgálat alapján a környezet, mint az *A. baumannii* lehetséges rezervoárja kapcsán nyertek információkat, mely alapján a környezeti forrásokból származó törzsek döntő többsége érzékeny volt a vizsgált antibiotikumokra (imipenem, meropenem, ciprofloxacín, doxiciklin, rifampicin) (RAFEI ET AL., 2015). Horvát kutatócsoport savas talajból izolált *A. baumannii* törzset, mely az antibiotikum rezisztencia vizsgálat során

rezisztens volt több hatóanyaggal szemben, mint a gentamicin, trimethoprim-szulfamethoxazol, ciprofloxacín és levofloxain (HRENOVIC ET AL., 2014). Szintén egy horvát kutatókból álló csoport eredményei alapján, szennyvíztisztítóból izolált *A. baumannii* törzsek képesek voltak túlélni a szennyvíztisztítás különböző fázisait és jelentős részük antibiotikum rezisztencia géneket (pl. OXA-23, OXA-72) hordozott. A humán eredetű rezisztens baktériumtörzsek így a tisztított szennyvízzel kijutnak a természetes vizekbe (HIGGINS ET AL., 2018).

Külföldi példát számos esetben találunk az *A. baumannii* faj szénhidrogén bontási képességének vizsgálatára és környezetvédelmi alkalmazására (PHROMMANICH ET AL., 2009; NKEM ET AL., 2016; POI ET AL., 2018). A magyarországi jogszabályok szerint a **13/2017** (VI. 12.) **EMMI** rendeletben (hulladékgazdálkodási közszolgáltatás körébe tartozó hulladékkal kapcsolatos közegészségügyi követelményekről) foglaltaknak megfelelően, a környezetvédelemben használatos oltóanyagok szűrését 6 paraméterre kell elvégezni, melyek higiénés indikátor baktériumok és a parazita bélféreg peteszám mellett a *Pseudomonas aeruginosa* baktériumfaj kimutatására is kiterjednek. Az *A. baumannii* fajra (vagy az *Acinetobacter* nemzetségre) specifikusan vonatkozó jogszabályi korlátot vagy vizsgálati követelményt ivóvíz, élelmiszer vagy a környezetbe kijuttatható készítmény szempontjából sem a hazai, sem az Európai Unió jogszabályok áttekintését követően nem találtam.

2.10.2 A *Pseudomonas* nemzetség

A *Pseudomonas* nemzetséget 1894-ben jegyezték le először, ma az egyik legdiverzebb és legelterjedtebb bakteriális nemzetségként tartják számon. Az utóbbi években több mint 70, a nemzetséghez tartozó, új fajt izoláltak és írtak le, melyek igen változatos helyekről származtak (talaj, víz, üledék, levegő, állatok, növények, gombák, algák, komposzt, illetve humán eredetű minták) (PEIX ET AL., 2018). A *Pseudomonas* fajok Gram-negatív, aerob pálcák, melyek poláris flagellum segítségével mozgásra képesek. Nem képeznek spórákat, az oxidáz- és kataláz-teszt során pozitív eredményt adnak. A nemzetség tagjai széleskörű metabolikus aktivitással rendelkeznek (PALLERONI, 2010; ROJO, 2010), illetve számos képviselője termel valamilyen másodlagos anyagcsereterméket, melyek esszenciálisak az extrém környezetben való túléléshez (SPIERS ET AL., 2000). A *Pseudomonas* nemzetség taxonómiai besorolása a következő: Prokarióták → Domén: *Bacteria* → Törzs: *Proteobacteria* → Osztály: *Gammaproteobacteria* → Rend: *Pseudomonadales* → Család: *Pseudomonadaceae* ([http17](http://17)).

A nemzetség egyik leggyakrabban vizsgált faja az opportunista patogén *P. aeruginosa*, mely ubikviter szervezetként (BOTZENHART&DÖRING, 1993) általánosan elterjedt.

2.10.2.1 A *Pseudomonas aeruginosa* jellemzése

A *P. aeruginosa* egy Gram-negatív, nem fermentáló aerob pálcá alakú baktérium, mely igen könnyen adaptálódik környezetéhez. Anaerob körülmények között is képes növekedésre, amennyiben terminális elektron akceptorok (nitrát, nitrit, dinitrogén-oxid) elérhetők, vagy amennyiben L-arginin szubsztrát rendelkezésre áll (ZANNONI, 1989). A *P. aeruginosa* széleskörűen elterjedt a talajban, vízben, de megtalálható növényeken, állatokban is (BOTZENHART&DÖRING, 1993). A szakirodalomban először 1882-ből találunk említést róla a francia gyógyszerész, Carle Gessard tanulmányában, aki felfedezte, hogy a *P. aeruginosa* egy vízben oldódó pigmentet termel, amely ultraibolya fény hatására zöldes-kék színt mutat, illetve feljegyezte patogén jellegét (GESSARD, 1882). A *P. aeruginosa* általában két pigment termelésére képes, a pyocianin kék, míg a pyoverdín sárgás-zöld vagy sárgás-barna színt kölcsönöz neki. Amennyiben egy törzs egyidejűleg mindkét pigment termelésére képes, a kolóniák kékes-zöld színt mutatnak (MOORE & FLAWS, 2011). Legelső elnevezése, a *Bacillus pyocyaneus* név pigmenttermelő képességére utalt (BOTZENHART&DÖRING, 1993).

Motilis, mely tulajdonsága fontos szerepet tölt be a gazda-parazita kapcsolatában, hiszen a virulencia és a motilitás szorosan kapcsolódnak egymáshoz (KEARNS, 2011). A motilitás képességével a gazdaszervezethez vezető különböző expozíciós útvonalak megnyílnak, előnyhöz juttatva a baktériumot a terjedésben, egyéb tulajdonságai (pl.: virulencia) megnyilvánulásában és a túlélésben. A motilitás *P. aeruginosa* esetében ismert formái a „swimming”, azaz úzás (flagellumok segítségével végzett mozgás folyékony közegben), a „swarming”, azaz rajzás (flagellum és pilusok segítségével végzett mozgás félszilárd és nedves felületen), a „twitching” (IV. típusú pilusok által kivitelezett mozgás szilárd felületen), melyre magyar kifejezések egész sorát használja a terminológia (rángatózás, bukfencezés stb.) és a „gliding” (csúszó mozgás) (AMINA&AHMED, 2017). A magyar nevezéktan kiforratlansága miatt a továbbiakban a motilitási formák angol megnevezéseit használom.

Egészséges emberekből ritkán izolálják, 10^6 csíraszám szervezetbe kerülés esetén tudták kimutatni emberi székletből (BOTZENHART&DÖRING, 1993), legyengült immunrendszerrel rendelkezők azonban (pl.: újszülöttek, idősek, égési sérültek, cukorbeteg, HIV fertőzöttek...stb.) könnyen megbetegedhetnek *P. aeruginosa* fertőzés következtében (HAUSER&RELLO, 2003). A *P. aeruginosa* expozíciójának következménye lehet tünetmentes kolonizáció vagy akár halálos kimenetelű fertőzés is. A kimenetel függ az adott baktériumtörzs virulenciájától és a gazdaszervezet ellenálló képességétől, a fertőző mikroorganizmus sejtszámától és fertőzési útjától, illetve a környezeti tényezőktől (HAUSER&RELLO, 2003).

2.10.2.1.1 A *P. aeruginosa* kórházi jelentősége

A *P. aeruginosa* fajt az egyik leggyakrabban jelentett, nozokomiális fertőzésekért felelős baktériumként tartják számon, igen magas morbiditási és mortalitási mutatókkal (ALHAZMI, 2015; EL ZOWALATY ET AL., 2015; LIU ET AL., 2015). Kockázati besorolása Risk Group 2, azaz elsősorban legyengült immunrendszerű egyéneknél képes betegség kialakítására. A *P. aeruginosa*-val összefüggésbe hozható fertőzések körében igen ijesztő, 18-61%-os halálozási arányt regisztráltak (IGLEWSKI, 1996; LIU ET AL., 2015). Jelentőségét emeli, hogy mind közösségben szerzett, mind nozokomiális fertőzések kiváltásáért felelős lehet. A leggyakrabban jelentett betegségek, a bakterémia és a szívbelhártya-gyulladás mellett számolni kell az egyéb fertőzésekkel is, mint a központi idegrendszer, ízületi, csont, fül, szem, bőr és gastroenterális fertőzések (HAUSER&RELLO, 2003). Komoly problémákat okoz olyan kórházakban, ahol daganatos, cisztás fibrózisban (CF) szenvedő, illetve égési sérülteket kezelnek (BOTZENHART&DÖRING,1993). A cisztás fibrózisban szenvedő betegek különösen érzékenyek a légzőszervi fertőzésekre, esetükben a tüdőgyulladás kiváltásának leggyakoribb okozója a *P. aeruginosa*, mely ezáltal az egyik legveszélyesebb biológiai tényező a CF betegekre nézve (SILVA-FILHO ET AL., 2013).

Elsősorban légzőszervi, húgyúti és véráram fertőzésekért felelős, azonban jelentős számú megbetegedést kötnek hozzá az égési sérültek és sebfertőzöttök között is. A *P. aeruginosa* által okozott nozokomiális fertőzések körében 16% a húgyúti, 9,5% a sebészeti beavatkozás során szerzett és 3,4% a véráram fertőzés (GAYNES ET AL., 2005).

Ez a baktériumfaj tehát olyan környezeti, klinikai és közegészségügyi aggályokat vet fel, amelyek globális jelenlétének, invazivitásának és a kialakult életveszélyes fertőzéseknek tulajdoníthatók (EL ZOWALATY ET AL., 2015).

2.10.2.1.2 A *P. aeruginosa* virulenciája

A *P. aeruginosa* virulencia faktorok egész „arzenálját” birtokolja, melyek a kromoszómáisan kódolt és a szerzett antibiotikum rezisztencia génekkel erősítve egymást hozzájárulnak a baktérium patogén viselkedéséhez és széleskörű elterjedéséhez (MITOV ET AL., 2010; EL ZOWALATY ET AL., 2015; KHATTAB ET AL., 2015; BENIE ET AL., 2017). A legfontosabb és leggyakrabban vizsgált virulencia faktorok közé tartozik a toxikus proteinek termeléséért felelős génszakaszok kimutatása, mint például a toxin A (*toxA*), az alkalikus proteáz (*aprA*), az elasztáz (*lasA*, *lasB*), illetve bizonyos exoenzimek kódolásáért felelős *exoS*, *exoU*, *exoT*. Két foszfolipázt kódoló gén, a *plcH* és a *plcN* szintén jelentős, szerepet játszhat a foszfolipidek hidrolízisében (2. sz. táblázat; KRALL ET AL., 2000; FAZELI&MOMTAZ, 2014; SAWA ET AL., 2014).

A *P. aeruginosa* patogenitásáért másrészt a sejthez kapcsolt, illetve extracelluláris virulencia faktorok is felelősek. Égési osztályról izolált törzsek körében (n=93) nem detektáltak *exoU* gént, azonban a *toxA*, *plcH*, *phzI*, *exoY* és *phzII* gének valamelyike, vagy a gének valamilyen kombinációja több mint 90%-ban jelen volt. A törzsek 94,6%-a legalább három antibiotikum-csoporttal szemben rezisztens (multirezisztens) volt és legalább 5 virulencia faktort birtokolt (HAGHI ET AL., 2018).

Egy másik vizsgálat alapján az égési osztályról izolált törzsek körében a leggyakrabban kimutatható virulencia faktornak a *toxA* és a *lasB* gén bizonyult (ASADPOUR, 2018).

A *P. aeruginosa* komplex III típusú szekréciós rendszer segítségével termeli az ExoS, ExoT, ExoU és ExoY toxinokat az eukarióta célszervezetekkel szemben. A 4 toxin közül az ExoU-t tartják a fő virulencia faktornak, melyet a PAPI-2 patogén gén klaszter régió tartalmaz. Akut tüdőkárosodás esetén felelősnek tartják az alveoláris hámsejtek (ezeken keresztül folyik a gázcsere) sérüléséért. Egyes források szerint a virulens törzsek ismertetője, hogy birtokolják az *exoU* gént, míg a nem virulensek génkészletéből hiányzik (SAWA ET AL., 2014), ezt támasztja alá a Lee és munkatársai eredményei alapján megfogalmazott vélemény, miszerint az ExoU százszor citotoxikusabb, mint az ExoS (LEE ET AL., 2005). Klinikai izolátumok körében az *exoU* genotípus korrelált a fluorokinolon rezisztens fenotípussal (SAWA ET AL., 2014).

2. sz. táblázat: A *P. aeruginosa* által termelt toxikus exotermékek Sawa nyomán (SAWA ET AL., 2014)

Exo termék	Gén	Szekréciós típus	Aktivitás	Hatás a gazdaszervezetre
Alkalikus proteáz	<i>aprA</i>	I	Proteolízis	Fehérjék kisebb peptidekre, aminosavakra hasítása
Elasztáz	<i>lasA</i> , <i>lasB</i>	II	Elasztolitikus aktivitás	Szövetkárosítás
Exotoxin A	<i>toxA</i>	II	ADP ribozil-transzferáz	Citotoxicitás
Foszfolipáz C	<i>plcH</i> , <i>plcN</i>	II	Foszfolipáz C	Hőérzékeny hemolízis
Exoenzim S	<i>exoS</i>	III	ADP ribozil-transzferáz GAP	Anti-fagocitózis
Exoenzim T	<i>exoT</i>	III	GAP aktivitás	Megakadályozza a sebgyógyulást
Exotoxin U	<i>exoU</i>	III	Foszfolipáz A2	Citotoxicitás, anti-fagocitózis
Exotoxin Y	<i>exoY</i>	III	Adenilat-cikláz	Ödéma kialakulása

A *P. aeruginosa* különböző mechanizmusokon keresztül elváltozásokat okozhat a tüdőben is. A mutáció, mely felelős a mucoid formáért, összefüggésben áll az alginát (*algD*) gén transzkripciójának aktivitásával. A mucoid kolóniák formációja, melyek szerkezete az *algD* géneknek is köszönhető, megvédi a baktériumot a gazdaszervezet immunválaszától és ellenáll az antibiotikumokkal szemben, továbbá szerepet játszik a biofilmek struktúrájának megőrzésében és stabilitásában (SUTHERLAND, 2001). Laktoperoxidázként, az alginátok részt vesznek a baktérium légzőhámhoz való tapadásában (FADHIL ET AL., 2016). A *lasB* gén által kódolt elasztáz

elasztolitikus aktivitást mutat a tüdőszöveten, támadja az eukarióta fehérjéket, mint a kollagén és az elasztin (a kötőszövet alkotóeleme, mely rugalmassá teszi a bőrt), és elpusztítja a sejt strukturális fehérjéit (LEE ET AL., 2005). A környezeti feltételek változása fokozhatja az elasztáz expresszióját ezekben a patogén mikroorganizmusokban (DEZIEL ET AL., 2001).

A *P. aeruginosa* képes két típusú foszfolipáz termelésére, melyek közül a (hemolitikus típusú) *plcH* hidrolizálja a szfingomielint a foszfatidil-kolinnal együtt (OSTROFF ET AL., 1990). A *toxA* virulencia faktort tüdővel kapcsolatos fertőzésekben szenvedő betegekből jelentették, míg az *exoS* jelentősebb a cisztás fibrózisban szenvedő betegek esetében (WOODS ET AL., 1982; LANOTTE ET AL., 2004).

A virulencia faktorok és a szerocsoportok egyidejű vizsgálata igen érdekes eredményeket hozhat a *P. aeruginosa*-val társult fertőzések megfigyelésénél (BENIE ET AL., 2017).

2.10.2.1.3 *P. aeruginosa* szerotípusok

A mikrobák rendszerezése során találkozhatunk több, faj alatti kategóriával is, melyek közül a *P. aeruginosa* esetében igen nagy jelentőséggel bír a szerotípus vagy szerovar. Ez egy fajon belül a hasonló antigén tulajdonságokkal rendelkező törzsek csoportját jelöli (FELFÖLDI, 2013).

Klinikai környezetben, tüdőgyulladásban szenvedő betegekből izolált *P. aeruginosa* törzsek esetében az O6-os szerotípus bizonyult a leggyakrabban kimutatottnak, melyet az O11-es, az O10-es, az O2-es és az O1-es követett. A halálozási arány az O1-es szerotípus esetében volt a legmagasabb (40%) és az O2-es esetében a legalacsonyabb (0%) (LU ET AL., 2014). A virulencia és a szerotípusok közti összefüggéseket vizsgálták, ahol azt találták, hogy az *exoU* profillal rendelkező törzsek esetében az O11-es szerotípus volt a leggyakoribb, míg az O6 szerotípus az *exoU* hiányával mutatott összefüggést (LU ET AL., 2014).

Sebek ápolása során használt tamponokról tenyésztett *P. aeruginosa* törzsek körében az O11 (22,64%), az O6 (15,09%) és az O1 (11,32%) szerotípus volt a leggyakrabban kimutatható (NEDELJKOVIĆ ET AL., 2015). 1992 és 1993 között, Kanadában vizsgált klinikai izolátumok körében a leggyakrabban előfordult szerotípusok az O1, O3, O5, O6, O10 és O11 voltak (9-13%) (RAVAOARINORO ET AL., 1996). Egy teheráni kórház égési osztályán sebfertőzésekben származott törzsek között a legtöbb esetben az O6 szerotípust mutatták ki, melyet az O11 és az O5 követett. Összességében az O6, O11, O5 és O16 szerotípusok aránya 60% felett volt a mintákban (ESTAHBANATI ET AL., 2002). Görög kórházban vizsgált törzsek között az O12 (25%), az O1 (17%), az O11 (16%) és az O6 (10%) szerotípus dominált (TASSIOS ET AL., 1998).

Egy másik tanulmány szerint klinikai mintákban leggyakrabban kimutatható az O11 (YOKOTA & NOGUCHI, 1994), a klinikumban és a környezetben legelterjedtebb az O11, az O6 és

az O1 szerocsoport (MAYO ET AL., 1986). Az O11 környezeti és klinikai mintákhoz egyaránt köthető (ALCOCK, 1977; FARMER ET AL., 1982). Bouhaddioui és munkatársai szerint kórházi és környezeti (tengerből tenyésztett) törzsek összehasonlítása során a kórházi izolátumoknál az O1, O4, O10 és O11, míg a környezeti törzseknél az O6 (95,8%) szerotípus dominált (BOUHADDIOUI ET AL., 2002).

2.10.2.1.4 Antibiotikum terápia és rezisztencia a *P. aeruginosa* törzsek körében

A *Pseudomonas aeruginosa* fertőzések kezelésére alkalmazott szerek kiválasztása függ a kialakult fertőzés milyenségétől (pl.: véráramfertőzés, húgyúti fertőzés, tüdőgyulladás, lágszöveti fertőzés stb.) és a beteg egyéb kockázati tényezőitől (pl.: idős emberek, cukorbetegség, tumor, szervátültetés, dialízis, májbetegség, immunvédekezésben gátolt szervezet stb.), illetve az adott földrajzi helyre jellemző rezisztencia állapotoktól. Alapvetően nyolc különböző hatóanyagcsoporthoz tartozó antibiotikum hatóanyagot alkalmaznak, melyek az Aminoglikozidok (gentamicin, tobramicin, amikacin, netilmicin), Karbapenemek (imipenem, meropenem), Cefalosporinok (ceftazidim, cefepim), Fluorokinolonok (ciprofloxacín, levofloxacín), Penicillinek és béta-laktamáz gátlóval kombinált változataik (tikarcillin és piperacillin klavulánsavval és tazobaktámmal), Monobaktámok (aztreonam), foszfomicin és a Polimixinek (kolisztin és Polimixin B), azonban egyes esetekben egyedi mérlegelés szerint a fentiekől eltérhetnek (BASSETTI ET AL., 2018).

P. aeruginosa által okozott fertőzés esetén első választású szerként ajánlják a Karbapenemeket (imipenem, meropenem), a ceftolozan/tazobaktámot, a cefepimet, a ceftazidimet (Cefalosporinok) vagy a piperacillin/tazobaktám hatóanyagot (Penicillinek) (BASSETTI ET AL., 2018). Amennyiben a monoterápia (egy hatóanyaggal történő kezelés) nem hatásos, az előbb felsorolt szereket Aminoglikozid (gentamicin, amikacin), Fluorokinolon (ciprofloxacín, levofloxacín), kolisztin vagy foszfomicin hatóanyaggal kombinálhatják (BASSETTI ET AL., 2018). A béta-laktám (Karbapenem, Cefalosporin, Penicillin) hatóanyagokat tüdőgyulladás esetén Fluorokinolon, Aminoglikozid vagy kolisztin hatóanyaggal kombinálják, májfertőzés esetén valamilyen Aminoglikozid, kolisztin vagy foszfomicin hatóanyaggal, míg véráram fertőzés esetén Aminoglikozid vagy kolisztin hatóanyagot alkalmaznak a kevert készítményben (BASSETTI ET AL., 2017).

Amennyiben az első, illetve második választású szerek nem hatásosak adott fertőzés gyógyítására, alternatív szerként olyan hatóanyagokat is alkalmazhatnak, melyeket a fertőzést kiváltó baktériummal szemben kevésbé ajánlanak vagy toxikus, illetve egyéb (szervezetet) károsító hatásuk miatt nem részesítenek előnyben. A különböző, nemzetközi szervezetek által kiemelten fontosnak tartott antibiotikum hatóanyagok listáját a 2. sz mellékletben foglaltam össze.

Az antibiotikum rezisztencia a *P. aeruginosa* esetében egyre inkább elterjedt az elmúlt években (EL ZOWALATY ET AL., 2015), melyet igazol, hogy égési sérültek mintáiból tenyésztett törzsek esetében (n=93), több mint 90% bizonyult multirezisztensnek, azaz legalább három hatóanyagcsoporttal szemben ellenállt (HAGHI ET AL., 2018). Egy másik vizsgálat során, szintén égési és sebfertőzésekből származó törzsek (n=90) 72,2% -a volt multirezisztens (ASADPOUR, 2018). Az Amerikai Egyesült Államok Járványkezelési- és Megelőzési Központja (CDC - Centers for Disease Control and Prevention) által közzétett lista szerint 2013-ban a *P. aeruginosa*-t a „komoly fenyegetést” jelentő csoportba sorolták a multirezisztens baktériumok között (CDC, 2013), illetve része az „ESKAPE” csoportnak, melynek tagjai nosokomiális fertőzések döntő hányadáért felelősek (SANTAJIT & INDRAWATTANA, 2016).

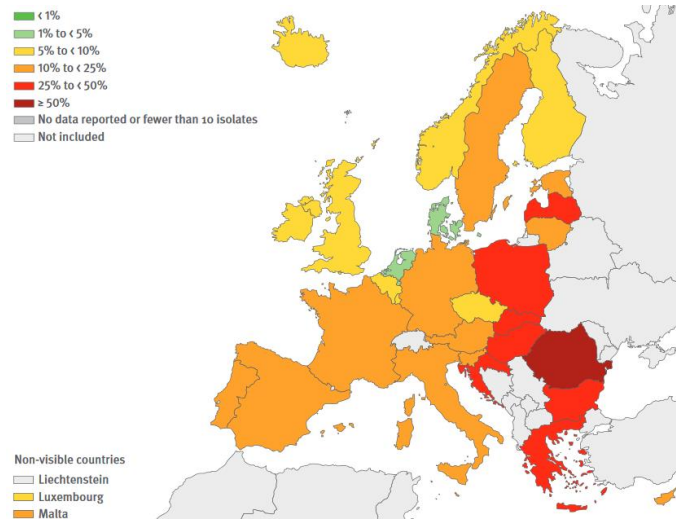
Három fő rezisztencia mechanizmus érintett a *P. aeruginosa* antibiotikum rezisztenciájának tekintetében, melyek az antibiotikum inaktiválása, változás a célszerkezetben, illetve a korlátozott felvétel és az efflux pumpa túlműködése (LAMBERT ET AL., 2002).

A genetikailag kódolt és a rövid idő alatt megszerzett antibiotikum rezisztencia mechanizmusok miatt a *P. aeruginosa* terápiás kezelésének lehetőségei igen korlátozottak (GAYNES ET AL., 2005). Az Európai Unió ügynöksége, az Európai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control) 2017-ben kiadott, 2016-ra vonatkozó jelentése szerint a tagországoktól származó adatok alapján a tesztelt *P. aeruginosa* törzsek 33,9%-a mutatott rezisztenciát valamilyen hatóanyaggal szemben (Aminoglikozidok, Karbapenemek, Fluorokinolonok, ceftazidim, piperacillin-tazobaktám), amiből 10,6% a multirezisztencia kritériumainak is megfelelt (ECDC, 2017).

A magyarországi Nemzeti Népegészségügyi Központ az európai rendszer részeként vizsgálja és jelenti az ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) felé a *P. aeruginosa* törzsek által okozott fertőzések kezelésére leggyakrabban használt antibiotikumokkal (piperacillin/tazobaktám, imipenem, meropenem, ceftazidim, cefepim, ciprofloxacín, gentamicin, tobramicin, amikacin) szembeni rezisztenciát ([http18](http://18)). Hazai viszonylatban a Nemzeti Népegészségügyi Központ adatai szerint ([http18](http://18)) 2015-ben több mint 17 000 betegből izoláltak *P. aeruginosa* baktériumot és vizsgálták 9 különböző antibiotikummal (piperacillin-tazobaktám, cefepim, ceftazidim, imipenem, meropenem, ciprofloxacín, amikacin, gentamicin, tobramicin) szemben az érzékenységüket. A szerek több mint felével szemben a vizsgálatba vont baktériumtörzsek 20%-a mutatott rezisztenciát.

A közelmúltig a Karbapenemek csoportjába tartozó antibiotikumok bizonyultak a leghatásosabbnak, így komoly aggodalomra ad okot a karbapenem-rezisztens törzsek megjelenése és terjedése, melyek jelenléte a különböző földrajzi régiókban eltérő (4. sz. ábra). Egy 2010-ben, az USA-ban végzett felmérés alapján a karbapenem-rezisztens törzsek aránya 7,4% és 35,4%

között mozgott (MORROW ET AL., 2013). Hazai viszonylatban elmondható, hogy a Karbapenem rezisztens *P. aeruginosa* törzsek aránya 18-24% közé tehető (http18).



4.sz. ábra: Karbapenem antibiotikumokkal szemben rezisztens *P. aeruginosa* törzsek aránya az Európai Unió országaiban, 2016. (ECDC, 2017)

2.10.2.1.5 A *P. aeruginosa* biofilm képző képessége

A *P. aeruginosa* a biofilm képzés vizsgálatának egyik modellszervezete (GHOLAMI ET AL., 2017), három exopoliszacharidot azonosítottak a fajban, melyek részt vesznek a biofilm előállításában: alginát (termelődéséért felelős gének: *algU*, *algL*, *algD*), illetve két poliszacharid, a *Psl* és *Pel*, melyek a biofilm mátrix szerkezetét biztosítják (COLVIN ET AL., 2011). Az alginát fontos szerepet játszik biofilm struktúrájának és stabilitásának megőrzésében (ASADPOUR, 2018), a *pslA* génnek a biofilm képződés kezdetleges szakaszában van nagy jelentősége, illetve segíti a sejtek egymáshoz, és a szubsztráthoz való kapcsolódását (MA ET AL., 2006; BILLINGS ET AL., 2013).

A *P. aeruginosa* patogén tulajdonságát egyes szerzők a biofilm képző képességének is tulajdonítják, összefüggésben néhány virulencia faktor kifejeződésével (MITOV ET AL., 2010; KHATTAB ET AL., 2015). A biofilm képző képesség és a multirezisztencia összefüggést mutatott égési osztályon vizsgált törzsek esetében, miszerint minden multirezisztens izolátum biofilm képzésre is képes volt (ASADPOUR, 2018).

2.10.2.1.6 *P. aeruginosa* a környezetben

A környezeti tényezők igen nagymértékben hozzájárulhatnak a patogén mikroorganizmusok adaptációjához és fejlődéséhez. A patogén baktériumok jelenléte

aggodalomra adhat okot, a környezeti elemekben terjedhetnek, illetve horizontális géntranszfer segítségével átadhatják egymásnak a hordozott tulajdonságaikat (MARTIN ET AL., 2018).

A környezetben a *P. aeruginosa* is általánosan elterjedt (ubikviter), azonban többnyire csak kórházi képviselőiről találunk szakirodalmi forrásokat. Abban a néhány esetben, amikor környezeti törzseket is vizsgálat alá vonnak, leggyakrabban tengervízből (BOUHADDIOUI ET AL., 2002), ivóvízből (MULAMATTATHIL ET AL., 2014), talajvízből és talajból (KASZAB ET AL., 2010; MARTIN ET AL., 2018) izolálják a faj képviselőit, általában kis sejtszámban (CHATTERJEE ET AL., 2017). A *P. aeruginosa* metabolikus tulajdonságainak köszönhetően képes különböző anyagok biodegradációjára, így a környezetben spontán felszaporodhat, ahol diverz feltételek mellett is megtalálja az életfeltételeit. Szénhidrogénnel szennyezett környezeti mintákban akár a kialakuló mikrobióta domináns tagjává is válhat (CHAERUN ET AL., 2004).

Felszíni vízből, illetve az ivóvízrendszerből vett mintákból kimutatták a *P. aeruginosa* jelenlétét, antibiotikum rezisztencia vizsgálata során pedig törzseit több hatóanyaggal (eritromicin, trimetoprim, amoxicillin) szemben is rezisztensnek találták (MULAMATTATHIL ET AL., 2014).

Egy 2018-ban publikált tanulmány arra hívja fel a figyelmet, hogy a talajvizeket és ezáltal az ivóvizet veszélyeztető szénhidrogén szennyezések környezetében felszaporodhatnak a biodegradációra képes opportunista patogén baktériumok, mint például a *P. aeruginosa*, emelve a vízfogyasztás jelentette expozíció kockázatát. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok alapján az izolált *P. aeruginosa* törzsek több hatóanyaggal (ampicillin, eritromicin, Tetraciklin) szemben ellenállónak bizonyultak (MARTIN ET AL., 2018).

Bizonyos országokban előszeretettel használják fel a *P. aeruginosa* faj biodegradációs tulajdonságait: Kínában potenciális oltóanyag alkotóként tartják számon olajszenyezett területeken remediációs célokra (LIU ET AL., 2017), illetve alkalmazzák *in situ* bioaugmentációs eljárások során (ZHAO ET AL., 2018). Egy másik tanulmány, egy szántóföldről izolált és vizsgált törzs eredményei alapján, ideális jelöltnek tartja a *P. aeruginosa* fajt bioremediációs célokra való felhasználáshoz, illetve szántóföldi növénytermesztés során a búza kezelésére termélnövelő/növekedés serkentő anyagként (ISLAM ET AL., 2014).

Egy 2017-ben publikált kutatás eredménye a genetikailag módosított *P. aeruginosa* új területen való alkalmazása, mely szerint pyocianin termelésén keresztül, egy érzékeny és költséghatékony módszert biztosít a vízminták toxicitásának meghatározására (YU ET AL., 2017).

A magyarországi jogszabályok több területen rendelkeznek a megengedett *P. aeruginosa* sejtszámról, többek között az ivóvíz, a palackozott ásványvíz, egyes élelmiszerek, a hulladékgazdálkodás és a termélnövelő anyagok szabályozásával kapcsolatban.

A **201/2001. (X. 25.) Korm. rendelet** az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről alapján a *P. aeruginosa*, mint indikátor vízminőségi jellemző esetében

a vonatkozó határérték 0/100 ml, kivéve a tartályban forgalmazott víz esetében, melyre 0/250 ml határérték vonatkozik.

A **65/2004.** (IV. 27.) **FVM–ESZCSM–GKM együttes rendelet** a természetes ásványvíz, a forrásvíz, az ivóvíz, az ásványi anyaggal dúsított ivóvíz és az ízesített víz palackozásának és forgalomba hozatalának szabályairól szerint a vízkivételi helynél és a forgalomba hozatal során a természetes ásványvíz nem tartalmazhat *P. aeruginosa*-t egyik vizsgált 250 ml-es mintában sem.

A **74/1999.** (XII. 25.) **EüM rendelet** a természetes gyógytényezőkről alapján a *P. aeruginosa* számot vizsgálni kell az elismert természetes ásványvizeknél előírt bakteriológiai vizsgálatok körében: telepképző egység/100 ml (palackozási célú felhasználás esetében a vizsgálatokat 250 ml-ből kell elvégezni).

A **4/1998.** (XI. 11.) **EüM rendelet** az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről alapján egyes termékek (sör, pasztőrözött sör, bor és egyéb magasabb alkoholtartalmú ital) esetében előírt a *P. aeruginosa* vizsgálata és ajánlott határérték is megállapításra került. A visszautasítás határértéke *P. aeruginosa*-ra nézve sörnél: 0/1 cm³, pasztőrözött sörnél 0/20 cm³, bor és egyéb magasabb alkoholtartalmú italnál 0/1 cm³.

A **13/2017.** (VI. 12.) **EMMI rendelet** a hulladékgazdálkodási közszolgáltatás körébe tartozó hulladékkal kapcsolatos közegészségügyi követelményekről alapján a vegyes hulladék lebomlását, szagtalanítását elősegítő vegyi anyag vagy mikroorganizmus, továbbá a komposztálás gyorsítására vagy hatékonyságának növelésére szolgáló mikrobiológiai preparátumok és enzimkeverékek forgalmazásának bejelentéséhez szükséges adatok és vizsgálatok szerint a higiénés mikrobiológiai paraméterek között határérték került meghatározásra a *P. aeruginosa*-ra nézve, miszerint 2x10 g, vagy 2x10 ml mintában negatív kell hogy legyen.

Hasonlóan rendelkezik a termésközelítő anyagok engedélyezéséről, tárolásáról, forgalmazásáról és felhasználásáról szóló **36/2006.** (V. 18.) **FVM rendelet** (melyet módosított a 18/2017. (IV. 11.) **FM rendelet**), melyben az engedélyezési eljárás szerint csak olyan anyag hozható forgalomba, ami nem okoz kedvezőtlen mellékhatásokat a növényre, talajra, az ember és az állat egészségére. Eszerint a higiénés mikrobiológiai vizsgálatok körében 3x0,5 kg/L mintából kell meghatározni *P. aeruginosa* számot szerves trágyák, komposztok, gilisztahumuszok, talajjavító anyagok, mikrobiológiai készítmények, termesztőközegek, növénykondicionáló készítmények esetében. A vonatkozó határérték: <10 db/g, vagy <10 db/ml.

Az Európai Unió jogi szabályozása a **98/83/EK** (1998. november 3.) irányelvben, (módosítva a 2015/1787) rendelkezik az emberi fogyasztásra szánt víz minőségéről, ahol 250 ml vízben nem lehet *P. aeruginosa*. A **2009/54/EK** (2009. június 18.) irányelv a természetes ásványvizek kinyeréséről és forgalmazásáról rendelkezik, mely alapján a természetes ásványvíz sem a víznyerőhelyen, sem értékesítéskor nem tartalmazhat *P. aeruginosa*-t (250 ml vizsgált

mintában mérve). A **2017/2470** végrehajtási rendelet (új élelmiszerek Uniós jegyzékének megállapításáról) 2. számú táblázata tartalmazza az új élelmiszerekre vonatkozó specifikációkat, amiben a *P. aeruginosa* faj is említésre kerül.

2.10.2.1.7 Kórházi és környezeti *P. aeruginosa* törzsek összehasonlítása

A kórházi és a környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek összehasonlító vizsgálataira hazai és nemzetközi példákat egyaránt találunk. Kórházi (n=100) és környezeti (n=119) törzsek szerotípus, antibiotikum rezisztencia és pyocianin termelésre irányuló összehasonlító vizsgálatának eredményeiről számoltak be Bouhaddioui és munkatársai, mely alapján a két csoport teljes elkülönülését tapasztalták (BOUHADDIOUI ET AL., 2002). Egy másik tanulmányban azonban, kórházi (n=13) és környezeti törzsek (n=4) genom vizsgálata nem, vagy csak igen kismértékű eltérést mutatott a két csoport között (GROSSO-BECERRA ET AL., 2014).

Egy frissebb kutatásban klinikai (n=50; légúti, húgyúti fertőzés, égési sérült sebfertőzés) és környezeti (n=50; talaj és felszíni víz) törzsek esetében vizsgáltak antibiotikum rezisztenciát és biofilm képző képességet és jelentős különbséget tapasztaltak mind a biofilm képzésben (klinikai 70%, környezeti 28%), mind az antibiotikum rezisztenciát illetően. Rezisztens volt a klinikai izolátumok 74%-a gentamicinre, 70%-a meropenemre, míg a környezeti törzsek 30%-ban mutattak ellenállást a ceftazidimmel szemben, és 28%-ban a gentamicin és a meropenem esetében, illetve antibiotikum rezisztencia gének is csak kis számban (bla_{TEM} 20%, bla_{SHV} 6%) voltak kimutathatók körükben (GHOLAMI ET AL., 2017).

2.10.3 Filogenetikai vizsgálatok szerepe az opportunista mikroszervezetek genotipizálásában

Összefoglalva, a fentiek alapján jól látható, hogy a *P. aeruginosa* és az *A. baumannii*, illetve az *Acinetobacter* nemzetség egyéb képviselői igen fontos szerepet töltenek be közegészségügyi szempontból, azonban a klinikai törzsekkel ellentétben, környezeti képviselőinek tulajdonságairól kevesebb információ áll rendelkezésre. Kockázati besorolásukat nehéz megállapítani megfelelő mennyiségű adat nélkül, ennek ellenére bizonyos országokban előszeretettel ajánlják és alkalmazzák őket bioremediációs célokra arra hivatkozva, hogy a környezeti izolátumok a nozokomiális törzsektől eltérő rokonsági kört képviselnek, így humánegészségügyi kockázatuk elenyésző. A tények feltárása érdekében munkám során a *P. aeruginosa* és az *Acinetobacter* nemzetség környezeti törzseit vontam különböző, humánegészségügyi szempontból is releváns vizsgálatok alá, illetve felhasználtam a genotipizálás nyújtotta lehetőségeket a környezeti és klinikai baktériumtörzsek közötti rokonsági kapcsolatok feltárására, melynek vonatkozó módszerei (PFGE, ERIC-PCR, MLST) közül két eljárás, a pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) és a multilocus-sequence typing (MLST) bevonására is lehetőségem nyílt.

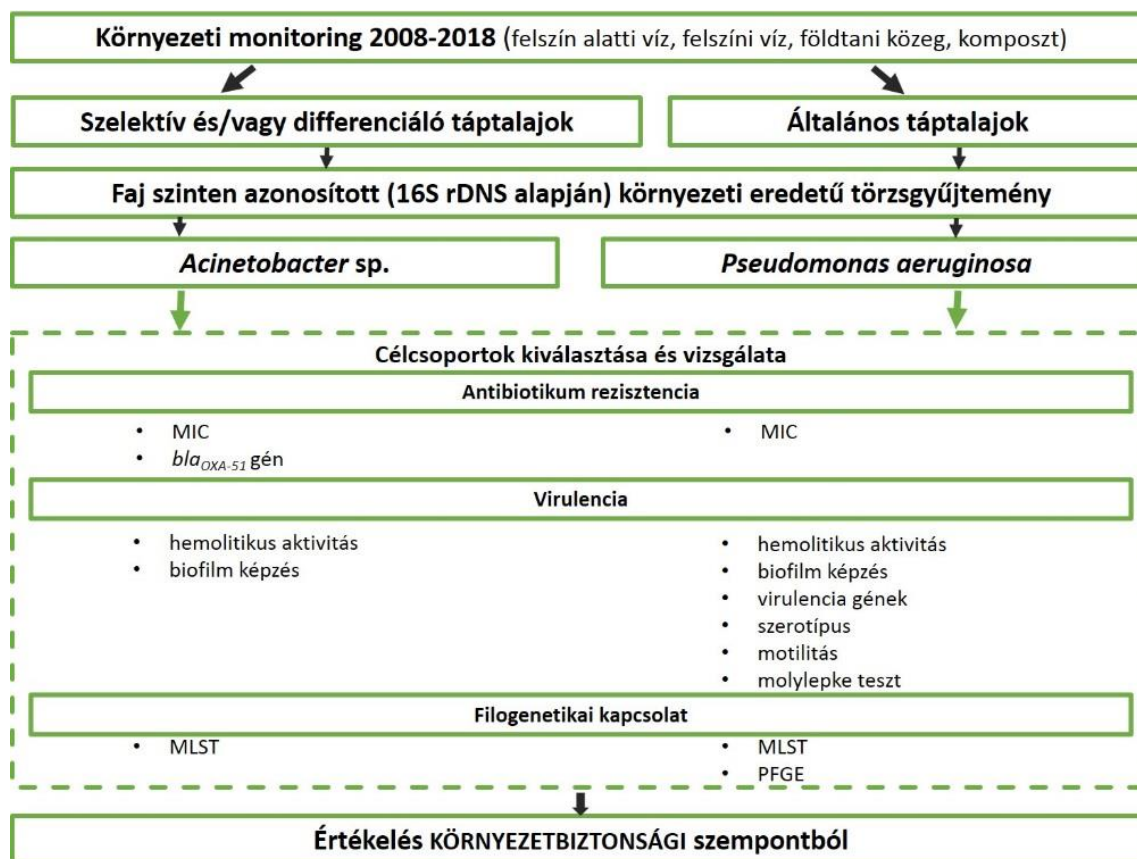
Az általunk alkalmazott két eljárás előnyeit, hátrányait és korlátait foglalja össze a 3. számú táblázat a *P. aeruginosa* tipizálásának példáján (LIBISCH, 2013).

3. sz. táblázat: A PFGE és az MLST módszer előnyeinek, hátrányainak és korlátainak bemutatása a *P. aeruginosa* példáján (LIBISCH, 2013 nyomán)

Módszer	Tipizálhatóság (%)	Reprodukálhatóság (%)	Diszkriminatív indexek (DI)	Előnyök	Hátrányok
PFGE (<i>SpeI</i> enzim)	95-100	100	0,98-0,997	Magas DI, jól definiált kritériumok, reprodukálhatóság	Labor és időigényes, költséges, az eredmények laboratóriumonként eltérők lehetnek
MLST	100	100	0,95-0,97	Szilárd biológiai alapok, félreérthetetlen, reprodukálható, laboratóriumok közt megegyező eredmények	Magas költségek, a kellő gyakorlat megszerzése időigényes

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

A doktori munkám során elvégzett vizsgálatok könnyebb áttekintésének érdekében, folyamatábrán (5. sz. ábra) szemléltetem kísérletsorozatom egészét.



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

3.1 Mintavételezés

A 2008-2018 közötti időszakban *Acinetobacter* és *P. aeruginosa* törzsek izolálása céljából környezeti mintákat vételeztem felszíni- és felszín alatti vizekből, földtani közegből, illetve egyéb, mezőgazdasági termeléshez köthető forrásokból (komposzt, zöldségek, halhús). A mintavételezések a vonatkozó Magyar Szabványoknak megfelelően történtek (MSZ 21464: 1998. Mintavétel felszín alatti vizekből; MSZ 5667-4:1995. Mintavétel a természetes és mesterséges tavakból; MSZ 21470-1:1998. Környezetvédelmi talajvizsgálat. Mintavétel.), majd a minták ~4°C-on szállítva kerültek a laboratóriumba további, mikrobiológiai vizsgálatok céljából. A vizsgálatba vont, kereskedelmi forgalomban kapható zöldségek (retek, sárgarépa, zeller) esetében laboratóriumi körülmények között, a halhús tételnél terepen, közvetlenül a ponty, halastóból való kivételét követően steril vattapálca segítségével vettem mintát.

Az *Acinetobacter* törzsek izolálása céljából 2008 és 2018 között összesen 403 magyarországi és 2 unikális mintavételi helyről (Tanzánia, Afrika) származó környezeti mintát (felszín alatti víz, felszíni víz, földtani közeg, egyéb) dolgoztam fel (3. sz. melléklet), melyekből

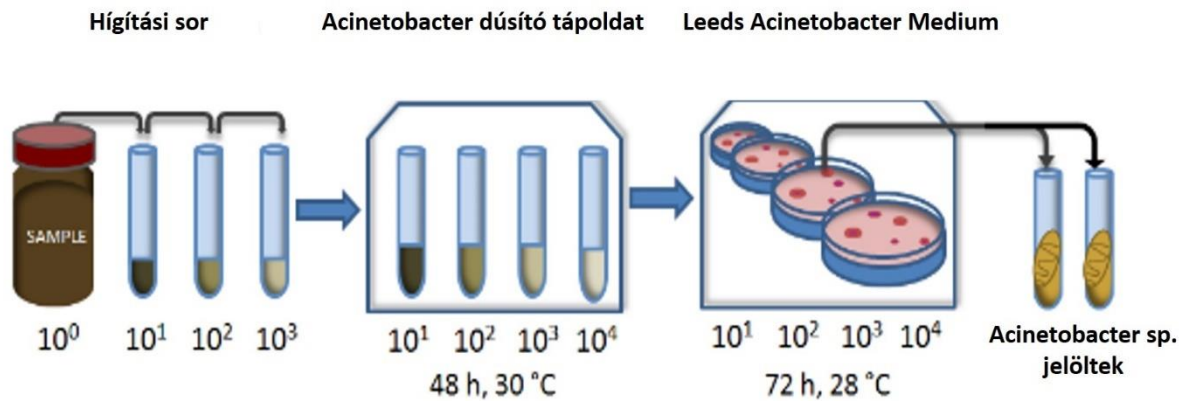
a későbbiekben kimutatási gyakoriságot is megállapítottam. A tanzániai minták, bár csekély számban álltak rendelkezésre, összehasonlítási alapul szolgáltak a különböző éghajlati viszonyok hatását illetően.

A *P. aeruginosa* faj kimutatása céljából 2009-2018 között összesen közel 300 környezeti mintát dolgoztam fel, melyek közül ~200 minta felszín alatti víz, földtani közeg és komposzt, 92 minta pedig felszíni víz volt (álló- és folyóvíz). A felszíni vízminták esetében 3 helyszínen (6. sz. melléklet) volt tisztított szennyvíz bevezetési pont a mintavételi helyektől maximum 300 m távolságra. Mivel a *P. aeruginosa* kimutatási gyakoriságára nézve felszín alatti vízből, földtani közegből, illetve komposztból a tanszéken korábban már születtek eredmények (KASZAB, 2010), így dolgozatomban az ilyen jellegű minták részletes adatainak ismertetésére nem térek ki. **Felszíni vizek esetében** ugyanakkor nem állt rendelkezésre részletes adatsor, így munkám során kitértem a vizsgálatba vont 92 db felszíni vízminta alapján megállapítható kimutatási gyakoriságra is. A felszíni vízminták részletes adatait foglalja össze a 6. sz. melléklet.

3.2 Környezeti eredetű *Acinetobacter* fajok izolálása

Előkísérletek (RADÓ, 2014) és szakirodalmi kutatások során szerzett tapasztalatok alapján a környezeti minták tízszeres hígításával dolgoztam, melyből 1 ml-t *Acinetobacter* dúsító tápoldatot (4,21g KH₂PO₄, 0,749g Na₂HPO₄, 2g 0,2%-os Na-acetát, 2g 0,2%-os KNO₃, 0,2g 0,02%-os MgSO₄ · 7 H₂O, 20 ml Hutner-féle ásványi kiegészítő, 1000 cm³ desztillált víz; BAUMANN, 1968) tartalmazó kémcsőbe pipettáztam. A beoltott csöveket ezt követően 48 órán át, 30°C-on inkubáltam. A 48 órás inkubáció után 1-1 ml-t Petri-csészébe pipettáztam, majd lehetőségem nyílt általános (pl. TGE-5 táptalaj: 10g tripton, 5g glükóz, 10g élesztőkivonat, 18g bakteriológiai agar, 1000 cm³ desztillált víz) és szelektív/differenciáló táptalajjal [Leeds *Acinetobacter* Medium-LAM (JAWAD ET AL., 1994): 15g kazein sav hidrolizát, 5g szójapepton, 5g nátrium-klorid, 5g fruktóz, 5g szacharóz, 5g mannitol, 1g fenilalanin, 0,4g vas-ammónium-citrát, 0,02g fenolvörös, 12g bakteriológiai agar, 1000 cm³ desztillált víz] történő lemezöntésre. A LAM tápközegen az *Acinetobacter* nemzetség képviselői jellegzetes mályvaszínű mutatókat mutatnak, illetve a táptalaj fenolvörös tartalmának köszönhetően a telepek körül található rózsaszín, diffúz elszíneződés alapján jól elkülöníthetők.

A kiöntött lemezeket saját tapasztalataim és szakirodalmi utalások (TOWNER, 2006) alapján 28°C-os hőmérsékleten, 48-72 órán át inkubáltam, majd a típusos (mályva színű, kerek, ép szélű, kiemelkedő, fényes) telepeket tisztítószélesztés után, TGE-5 ferde agarra oltottam, illetve -80°C-on tároltam, további vizsgálatok és törzsfenntartás céljából (6. sz. ábra).

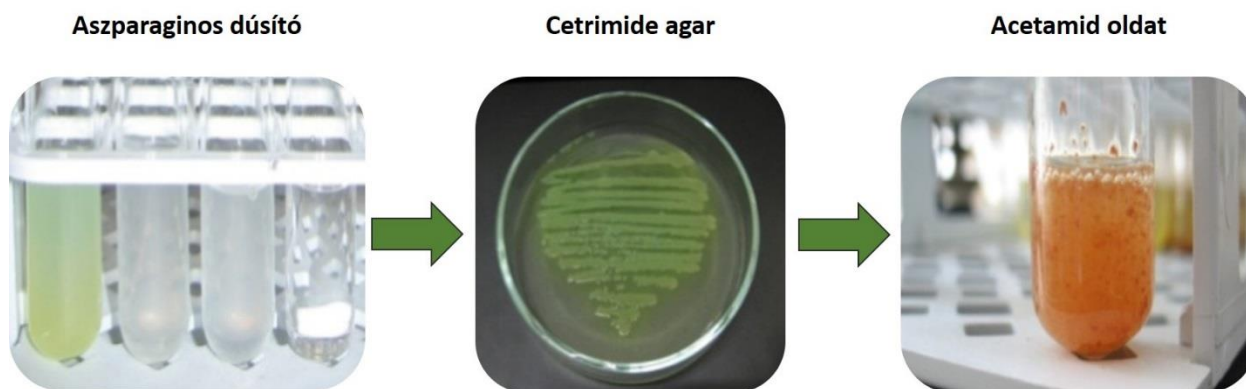


6. sz. ábra: A környezeti minták feldolgozásának folyamata *Acinetobacter* fajok tenyésztésének céljából (saját ábra)

3.3 Környezeti eredetű *Pseudomonas aeruginosa* izolálása

A beérkező környezeti mintákat a vonatkozó magyar szabvány (MSZ 21470-77:1988) szerint dolgoztam fel, *P. aeruginosa* izolálás céljából. Szelektív és differenciáló táptalajokon történt a tenyésztés, melynek folyamatát a 7. sz. ábra szemlélteti.

Első lépésben a környezeti minta tízszeres hígításával dolgoztam, melyből aszparaginos dúsító oldatot (3g L-aszparagin, 1g K_2HPO_4 , 0,5g $MgSO_4 \times 7H_2O$, 10 cm^3 glicerol, 1000 cm^3 desztillált víz; pH:7,0) tartalmazó kémcsőbe oltottam, melyeket 48 órán keresztül 42°C-on inkubáltam. Következő lépésben, a szelektíven felszaporodott mikroszervezeteket tartalmazó oldatot Cetrimid agar (MERCK®) felszínére szélesztettem, a lemezeket 24 órán át, 37°C-on inkubáltam. Az egyéb Gram-negatív és pozitív fajok gátlása mellett a *P. aeruginosa* jelentősebb inhibíció nélkül fejlődik a táptalajon, a telepek körül megjelenő sárgászöld, majd barnuló pigment (pyocianin) kíséretében, ezáltal nagy biztonsággal elkülöníthető más mikroorganizmustól. A kékeszöld elszíneződésű, pigmentet termelő telepeket végül tovább oltottam acetamid oldatot (1g acetamid, 5g NaCl, 2g KH_2PO_4 , 0,1g $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1000 cm^3 desztillált víz; pH:6,8) tartalmazó kémcsőbe, melyeket 24 órán keresztül 37°C-on inkubáltam. *P. aeruginosa* jelenlétében az acetamid hidrolízise során ammónia keletkezik, melyet Nessler-reagens (7g KI, 10g HgI_2 , 10g KOH, 100 cm^3 desztillált víz) hozzácsöpögtetésével ellenőrizhetünk. Barna elszíneződés esetén a *P. aeruginosa* jelenléte a mintában igazolt. Tisztítószélesztés után ferde agaron és -80°C-on tároltam a törzseket.



7. sz. ábra: A környezeti minták feldolgozásának folyamata az MSZ 21470-77:1988, Magyar Szabványban foglaltak szerint (saját ábra)

3.4 Az izolált törzsek faj szintű meghatározása 16S rDNS alapon

Az izolált törzsek faj szintű identifikációját molekuláris biológiai módszerrel végeztem. Az *Acinetobacter*-ek esetében 16S rDNS szekvencia analízist alkalmaztam, míg a *P. aeruginosa* izolátumoknál a 16S rDNS V2 és V8 fajspecifikus alegységeinek kimutatását végeztem el.

3.4.1 *Acinetobacter* törzsek identifikációja 16S rDNS szekvencia analízissel

A fajszintű meghatározáshoz 16S rDNS szekvencia analízist végeztem, mely során polimeráz láncreakció segítségével felszaporítottam a kijelölt génszakaszt és kapilláris gélelektroforézissel meghatározásra került a bázissorrend.

DNS izolálás

A törzsekből legfeljebb 24 órán át inkubált folyékony tenyészetet hoztam létre TGE-5 táptalajon, majd a MOBIO Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, USA) segítségével DNS-t izoláltam belőlük, a gyártó ajánlásainak megfelelően, melyet agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem.

Agaróz gélelektroforézis

A folyamat végrehajtásához 70 ml SB pufferben (0,4 g NaOH; 3,044 H₃BO₄; 1000 cm³ desztillált víz) 0,7 g nagy tisztaságú agarózt (SeaKem agarose, Lonza Switzerland) oldottam fel, majd a kézmelegre hűtött oldatba 3,5 µl EcoSafe (Pacific Image Electronics, Kanada) festéket pipettáztam. A gélt fésűsorokat tartalmazó, OWL-típusú futtatókádban szilárdítottam. A 4 µl DNS és az 1 µl DNA Loading Dye (Thermo Scientific, USA) elegyét a fésűsorok eltávolítását követően kialakult zsebekbe pipettáztam. Minden mintasor mellé standardként 3 µl DNS markert (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas) vittem fel, így a termék hozzávetőleges méretének ellenőrzésére is lehetőség nyílt.

A DNS molekula foszfátcsoportjai miatt pH 7 értéken negatív össztöltéssel rendelkezik, így egyenáram hatására a DNS a pozitív pólus felé vándorol. A DNS-szalba beépül az előzetesen a gélhez adott EcoSafe festék és UV fény alatt fluoreszkál, így a DNS könnyen kimutatható a gélben. A mintákat 100 V feszültségen 40 percig futtattam, majd UV fény alatt ellenőriztem a termék jelenlétét.

Polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction – PCR)

A PCR reakció során tetszőleges DNS cél régiójából nagyszámú másolatot hozhatunk létre forward és reverz primerek, valamint DNS-polimeráz segítségével. A PCR reakció három fő lépésből áll. A *denaturáció* során a kettős szálú DNS-t magas hőmérsékletre hevítjük, hogy a kettős szálak a hidrogénhid-kötések felbomlásával szétváljanak, és egyszálú templátot kapjunk. A második lépésben az *anelláció* során csökkentjük a hőmérsékletet, így a primerek hozzá tudnak kapcsolódni a DNS szálakhoz. A hőmérséklet ebben a fázisban a primerek olvadási hőmérsékletétől függ. Az *elongáció* szakaszában a DNS-polimeráz (Taq-polimeráz) a szabad nukleotidok beépítésével létrehozza a hiányzó szálakat.

A reakcióhoz az alábbi PCR mastermixet használtam (egy reakcióelegyre számolva, 50 µl végtérfogat mellett):

- DNS templát (1 µl): tartalmazza a DNS-szakasz amplifikálandó régióját
- Forward és Reverz primer [1 µM (27f, 1492r)]: meghatározza az amplifikálandó szakasz elejét és végét
- DNS-polimeráz [1,25 U Dream Taq DNA polymerase (Thermo Sceintific, USA)]: lemásolja az amplifikálandó szakaszt
- Taq-puffer [5 µl (Thermo Sceintific, USA)]: biztosítja a DNS-polimeráz számára a megfelelő kémiai környezetet
- dNTP [dezoxiribonukleotid-trifoszfátok; 4mM]: a polimeráz az új DNS szálakat ezekből építi fel
- Nukleáz-mentes víz (32,75 µl): a végtérfogat beállításához

A reakció során felhasznált univerzális *Bacteria* doménspecifikus 27f és 1492r primerek szekvenciáit a 4. sz. táblázatban ismertetem.

4. sz. táblázat: A 16S rDNS PCR során felhasznált primerek szekvenciái (LANE, 1991)

Primer jelölése	Amplifikáló primerek szekvenciája
27f	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG - 3'
1492r	5'- GGTTACCTTGTTACGACTT- 3'

A PCR reakció az automata Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf, Németország) készülékben zajlott a következő hőprofil alapján: 95°C 3' 32x (94°C 30'' 52°C 30'' 72°C 1') 72°C 10' 4°C ∞. A folyamat végén a készülék 4°C-ra hűti a PCR terméket, melyet agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem, majd felhasználásig szintén 4°C-on tároltam.

PCR termék tisztítása

A megfelelő méretű és minőségű PCR termék elérése esetén a 16S rDNS amplifikált szakaszának szekvencia meghatározása érdekében a következő lépésben a szükségtelen alkotókat (maradék dNTP, primer dimerek) NucleoSpin Extract II DNA Clean-up szettel (Macherey-Nagel, Germany) a gyártó előírásainak megfelelően eltávolítottam. Az így létrejött, tisztított terméket agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem, majd a későbbiekben a szekvenáló reakcióhoz templátként használtam.

Sänger-féle szekvenáló reakció

Az amplifikált DNS szekvencia bázissorrendjének meghatározásához szekvenáló reakciót hajtottam végre BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit® (Applied Biosystems, USA), és Eppendorf Mastercycler® készülék segítségével. A folyamat az úgynevezett didezoxi-, vagy Sängert-féle láncterminációs módszeren alapszik. A reakcióban fluoreszcens festékkel jelölt, módosított didezoxi-nukleotidok - melyek esetében a ribóz 2' és 3' helyéről is hiányzik az oxigén - vesznek részt. A ciklusok során a polimeráz enzim beépíti a módosított didezoxi-nukleotidokat is, így a hiányzó kapcsolódási pont (OH-csoport) miatt a beépülés helyén megszakad a lánccsintézis. Így a DNS templát különböző hosszúságú fragmentjei jönnek létre, melyek végén módosított fluoreszcens nukleotidok helyezkednek el. A szekvenáló reakcióelegy összetétele egy mintára számítva 10 µl végtérfogat mellett: 1 µl Big Dye, 1,5 µl Big Dye puffer, 0,5 µl primer (27f, 338f, 803f), 3,5 µl DNS templát (tisztított PCR termék), 3,5 µl MQ-víz. A reakció a következő hőprofil alapján zajlott 96°C 1' 28x (96°C 10'' 51°C 5'' 60°C 4') 4°C ∞.

A készülék a reakciósort követően 4°C-ra hűti a mintákat. A kapott végtermék a teljes 16S rDNS szekvencia esetében körülbelül 1500 bázispár hosszúságú, amelyből az adott baktériumtörzs nagy pontossággal azonosítható.

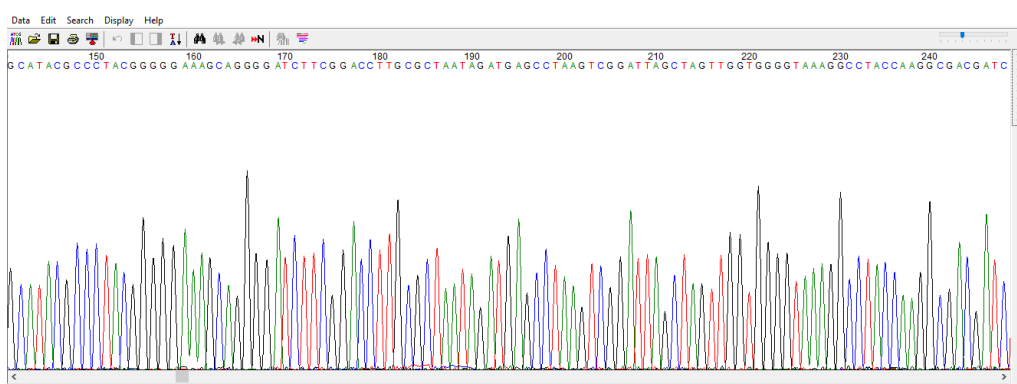
A jelölt DNS visszanyerése – etanol-precipitáció

A szekvenciák meghatározásához a szekvenáló reakciót követően a jelölt DNS visszanyerése szükséges. Ehhez a szekvenáló termékét ún. acetát-mix-szel [3 µl NaAc (3M), 62,5 µl EtOH (95%), 14,5 µl MQ-víz] vortexeltem, majd 10 percig szobahőmérsékleten állni hagytam. Ezt követően az elegyet 3220 g fordulaton, 30 percig, 4°C-on centrifugáltam. A felülúszó fázis leöntése után 180 µl 70%-os etil-alkoholt pipettáztam a mintákra, majd 3220 g-n 20 percig, 4°C-on ismét centrifugáltam. A felülúszót maradéktalanul eltávolítottam, majd 20 µl Hi-Di formamidot (Thermo Fischer Scientific, USA) mértem a kicsapott DNS-re. Az így előkészített mintákat legalább 1 napig 4°C-on inkubáltam.

Kapilláris gélelektroforézis

A szekvenáló reakció előkészített termékét ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) készülék segítségével vizsgáltuk a nukleotid sorrend megállapítása érdekében. A készülék méri a szekvenálás eredményeképpen kapott különböző hosszúságú fragmentek végén elhelyezkedő módosított didezoxi-nukleotidok fluoreszcenciáját, és jelöli a különböző nukleotidokat (lásd 8. sz. ábra).

Mivel a teljes 16S szekvencia egyetlen szekvenáló reakcióval nem fedhető le, a végső szekvenciát több, rövidebb fragment nukleotid sorrendjének szoftveres illesztésével értem el. A szekvenciák illesztését MEGA6 (TAMURA ET AL., 2013) program segítségével hajtottam végre. Az így kapott szekvenciákat az EzTaxon adatbázisával (EZBIOCLOUD.NET; YOON ET AL., 2017) összehasonlítottam, és így faj szinten meghatározhattam az azonosításra váró baktériumtörzset.



8. sz. ábra: A HF13 – *Acinetobacter lwoffii* törzs 16S rDNS szekvenciájának részlete MEGA6 programban (saját ábra)

3.4.2 16S rDNS *P. aeruginosa* fajspecifikus génszakaszának kimutatása

A *P. aeruginosa* törzsek azonosítása érdekében PA-SS PCR reakciót hajtottam végre, mely során a 16S rDNS V2 és V8 fajspecifikus alegységeit mutattam ki. A DNS izolálást a korábban leírtaknak megfelelően végeztem el, a PCR reakcióhoz a PA-SS specifikus primerpárt használtam (5. sz. táblázat).

5. sz. táblázat: A PA-SS PCR reakcióhoz használt primerek szekvenciái (SPILKER ET AL., 2004)

Primer jelölése	Amplifikáló primerek szekvenciája
PA-SS f	5' - GGGGGATCTTCGGACCTCA - 3'
PA-SS r	5' - TCCTTAGAGTGCCACCCG - 3'

A PCR reakcióelegy összetétele egy mintára számítva 50 µl végtérfogat mellett: 5 µl Taq puffer (Thermo Scientific, USA), 1 µl (5 U) Dream Taq polimeráz (Thermo Scientific, USA), 10 µl dNTP (4mM), 0,5 µl (1µM) PA-SS f primer, 0,5 µl (1µM) PA-SS r primer, 2 µl DNS templát, 31 µl MQ-víz. A reakció a következő hőprofil alapján zajlott 95°C 2' 25x (94°C 25'' 58°C 40''

72°C 40'') 72°C 1', 4°C ∞. A PCR termék ellenőrzése a korábban leírtaknak megfelelően agaróz gélelektroforézissel történt.

3.5 Antibiotikum rezisztencia vizsgálat

3.5.1 Minimális gátló koncentráció meghatározása MIC tesztsíkkal

A környezeti eredetű *Acinetobacter* és *P. aeruginosa* 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).

A vizsgálatba vont törzsekből friss, legfeljebb 24 órás tenyészetet hoztam létre, szilárd TGE-5 ferde agaron, majd 0,9 %-os NaCl-os fiziológias sóoldatban 0,5 McFarland ($1-3 \times 10^8$ CFU) zavarosságú baktérium szuszpenziót készítettem (MCFARLAND, 1907). Ezt követően steril vattapálca segítségével 20 ml előre kiöntött és megszilárdult Müller-Hinton agart (MERCK®)

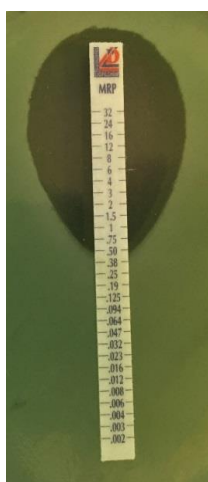
tartalmazó, 9 cm átmérőjű Petri-csészébe szélesztettem a homogén baktérium szuszpenziót. A szélesztést követően a baktériumgyepre helyeztem az adott antibiotikum hatóanyagot koncentráció-gradiens mentén tartalmazó MIC-teszt csíkokat (1 csík/Petri-csészé), majd a lemezeket 35°C-on, 24 óráig inkubáltam.

A vizsgálatokba vont antibiotikum hatóanyagokat mind az *Acinetobacter*, mind a *P. aeruginosa* fajok esetében nemzetközi ajánlások (EUCAST, ECDC, NCCLS, OEK) szerint választottam ki, melyek a klinikai terápiában első, illetve második választásként alkalmazott, valamint az alternatív terápiában (amennyiben az első választású szerek valamilyen okból hatástalanok, vagy ellenjavalltak egy fertőzés kezelésére) használt készítmények körét fedték le. Áttekintésük a 2. sz. mellékletben található.

Az inkubációt követően a tesztsíkokon feltüntetett koncentráció gradiens segítségével könnyen meghatározhatóvá vált a minimális gátló koncentráció (MIC, Minimal Inhibitory Concentration). A csík körül – amennyiben tapasztalható gátlás – kialakul egy szimmetrikus gátlási ellipszis. Ahol a gátlási ellipszis metszi a tesztsíkot, a megadott lépték segítségével µg/ml értékben

leolvasható a MIC érték (lásd. 9. sz. ábra).

A minimális gátló koncentráció értékeket a CLSI és az EUCAST ajánlásai alapján értékeltem, a MIC érték függvényében adott törzs érzékeny (S – sensitive), átmeneti (I – intermediate), vagy rezisztens (R – resistant) besorolást kapott (CLSI, 2017; EUCAST, 2017). Az antibiotikum rezisztencia tesztek minőségellenőrzésére a nemzetközileg elfogadott, ATCC (American Type



9. sz. ábra:

A P133 – *P. aeruginosa* törzs

meropenemmel szemben mutatott érzékenysége (saját felvétel)

Culture Collection) gyűjteményből származó *Escherichia coli* ATCC 25922, valamint *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 referencia törzseket alkalmaztam.

3.5.2 A *bla_{OXA-51}*, antibiotikum rezisztencia gén vizsgálata *Acinetobacter* törzsekkel

A *bla_{OXA-51}* gén kromoszómálisan kódolt az *A. baumannii* törzsek esetében, melyet többek közt genetikai markerként is alkalmaznak a faj azonosításakor, illetve a Karbapenemek és a Penicillinekkal szemben mutatott rezisztenciával hoznak összefüggésbe (ASADOLLAHI ET AL., 2012).

A gén kimutatásához a korábban bemutatott polimeráz láncreakció módszerét alkalmaztam. A vizsgálni kívánt törzsekből az előzőekben leírtak alapján DNS-t izoláltam, majd az 6. sz. táblázatban található primer pár segítségével PCR-t indítottam az alábbi hőprofil szerint: 95°C 5', 40x (95°C 30'', 56°C 30'', 72°C 30''), 72°C 5', 4°C ∞. A folyamat végén a PCR termék jelenlétét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem.

6. sz. táblázat: A *bla_{OXA-51}* gén kimutatásához alkalmazott primerek (MERKIER&CENTRON, 2006)

Primer jelölése	Amplifikáló primerek szekvenciája	Amplikon hossza (bp)
<i>bla_{OXA-51}</i> F	5' - ATGAACATTAAAACACTCTTACT -3'	825 bp
<i>bla_{OXA-51}</i> R	5' - TATAAAATACCTAATTGTTC - 3'	

3.6 Virulencia faktorok vizsgálata

3.6.1 Hemolitikus aktivitás vizsgálata

A virulencia megnyilvánulásaként számon tartott hemolízis vizsgálata során defibrinált birkavérrel kiegészített Columbia véragar lemezekkel (Heipha-Diagnostica) dolgoztam (23g speciális tápanyag szubsztrát; 1 g keményítő; 5 g NaCl; 13 g bakteriológiai agar; 1000 cm³ desztillált víz; 5 v/v% defibrinált birkavér, pH: 7,3±0,2). A vizsgálatba vont törzseket fémkacsal, steril körülmények között szélesztettem a véragar lemez felszínére, majd 6, 22, illetve 48 órás, 37°C-on végzett inkubációt követően az átvilágított lemezekről leolvastam az eredményeket. A vizsgálat során megfigyelhető volt a baktériumtörzsek növekedése, annak mértéke, illetve a hemolitikus aktivitás megjelenése, típusa és a béta-hemolízis mértéke (ELLNER ET AL., 1966). A hemolitikus aktivitás értékelése során figyelembe vettem, hogy adott baktériumtörzs hány óra inkubációs idő elteltével volt képes telepkezésre, illetve hemolitikus aktivitás kifejtésére az alkalmazott tápközegen, melynek megítélésakor a gyártó (Heipha- Diagnostica) utasításai alapján a 22 órás leolvasást tekintetem mérvadónak. A hemolízis intenzitásának jellemzésére ötfokozatú skálát alkalmaztam az alábbiak szerint:

- - nincs hemolízis
- +/- kétséges hemolízis
- + gyenge hemolízis
- ++ hemolízis
- +++ intenzív hemolízis

3.6.2 Biofilm képző képesség vizsgálata

A biofilm képző képességet, illetve a biofilm képző képesség erősségét Stepanović és munkatársai (STEPANOVIĆ ET AL., 2000), valamint Kumari és munkatársai (KUMARI ET AL., 2013) által publikált, módosított módszer szerint vizsgáltam. Négy darab, egyenként 96 lyukú, steril, lapos aljú, műanyag mikrotiter lemez mélyedéseibe minden egyes vizsgált törzsből három ismétlésben 20 µl inokulumot és 230 µl TSB (Tryptic Soy Broth - Tripton-szója-tápleves; Merck, Németország) táplevest pipettáztam. A kontroll minta három párhuzamos mélyedése baktériummentes, steril táplevest tartalmazott. A lemezeket lefedtem és 24, 48, 72 és 96 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam a Thermo Shaker (BioSan, Lettország) microplate rázótermostát segítségével.

A mérés napján dekantálást követően az összes mélyedést 250 µl PBS oldattal (Phosphate Buffered Saline – Foszfát Sóoldat: 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g KH₂PO₄; 1 L desztillált víz) átmostam háromszor, hogy a mikrotiter lemez oldalára fel nem tapadt baktérium sejteket eltávolítsam. A feltapadt baktérium sejteket 250 µl metanollal (99,9%) fixáltam 15 percen keresztül, majd ismét dekantáltam a lemezt. A fixált baktérium sejteket 250 µl kristályibolya festék



10. sz. ábra: A biofilm képző képesség vizsgálata mikrotiter lemezes módszer segítségével (saját felvétel)

oldattal (5%) megfestettem, majd 20 percig állni hagytam. Steril desztillált vízzel átmostam a mikrotiter lemez mélyedéseit, majd a feltapadt, megfestett sejteket 33%-os jégeccel visszaoldottam (10. sz. ábra).

A leolvasás során az optikai denzitást (OD) 550 nm-en mértem a BioTek ELx800 Absorbance Microplate Reader (BioTek, USA) segítségével. Az eredményeket Stepanović és munkatársai (STEPANOVIĆ ET AL., 2000) által publikált tanulmány alapján értékeltem, a törzseket a

biofilm termelés alapján a kontrollhoz viszonyítva 4 osztályba soroltam:

- | | |
|---|-------------------------------|
| • $OD \leq OD_c^3$ | nincs biofilm termelés (0) |
| • $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ | gyenge biofilm termelés (+) |
| • $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ | közepes biofilm termelés (++) |
| • $4 \times OD_c < OD$ | erős biofilm termelés (+++) |

³ OD_c érték: a negatív kontrol szórásának háromszorosa plusz a negatív kontrol átlag OD értéke.

Néhány *P. aeruginosa* törzs biofilm képző képességének vizsgálatára lehetőség nyílt a németországi TWINCORE (Twincore - Zentrum für Experimentelle und Klinische Infektionsforschung - Hannover) Kutatóintézetben SP8 system típusú Leica konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (Confocal Laser Scanning Microscopy - CLSM) alkalmazásával is, ahol a 48 órás, statikus mikroplate-en nőtt biofilmeket van Duuren és munkatársai által leírt (2017) módszerrel vizuálisan értékeltém, mely alapján elkülöníthettem az élő és élettelen sejteket, valamint a strukturált biofilmeket a planktonikus sejtek halmozódásától.

3.6.3 Virulencia gének vizsgálata

Virulencia gének vizsgálatát *P. aeruginosa* törzsekkel végeztem, ahol olyan, szakirodalmi ajánlások alapján (AJAYI ET AL., 2003., LANOTTE ET AL., 2004; BADAMCHI ET AL., 2017) kiválasztott virulencia faktorok jelenlétének vizsgálatát preferáltam, mint az alginát (*algD*), az elasztáz (*lasB*), a hemolitikus foszfolipáz (*plcH*), az alkalikus proteáz (*aprA*), illetve exoenzimek/exotoxinok (*exoS* és *exoU*). A tanszéken korábban zajlott kutatások során egyéb exoenzimek (*exoA*, *exoT*, *exoY*) jelenlétét vizsgálták környezeti *P. aeruginosa* törzsek genomjában, azonban ezek a gének a kísérletbe vont törzsek 100%-ánál jelen voltak (KASZAB, 2010), általánosnak tekinthetők, így munkám során nem vizsgáltam őket.

A gének felszaporításához szükséges PCR-t a 7. sz. táblázatban található primerek segítségével végeztem. Az egy mintához szükséges mastermix összetevői a következők voltak 25 µl ösztérfogatra számolva: 2,5 µl Taq-puffer (Thermo Sceintific, USA), 0,5 U Taq-polimeráz (Thermo Sceintific, USA), 4 mM dNTP (Thermo Sceintific, USA), 1µM forward primer, 1µM reverz primer, 0,5 µl DNS templát, 16,4 µl nukleáz-mentes víz.

A folyamat az automata Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf, Németország) készülékben zajlott a következő hőprofilok alapján:

- *lasB*: 94°C 5 min, 35x (94°C 35", 60°C 1', 72°C 1'), 72°C 7', 4°C ∞;
- *algD*, *aprA*, *plcH*: 95°C 5', 30x (95°C 1', 55°C 45", 72°C 75"), 72°C 10', 4°C ∞;
- *exoS*, *exoU*: 94°C 2', 36x (94°C 30", 58°C 30", 68°C 1'), 68°C 7', 4°C ∞.

A folyamat végén a készülék 4°C-ra hűti a PCR terméket, melynek jelenlétét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem.

7. sz. táblázat: A *Pseudomonas aeruginosa* virulencia gének vizsgálata során használt primerek (AJAYI ET AL., 2003., LANOTTE ET AL., 2004; BADAMCHI ET AL., 2017)

Primer jelölése	Amplikon hossza	Amplifikáló primerek szekvenciája
<i>algD</i>	1310 bp	F: 5' TGCGAATCAGCATCTTTGGT 3' R: 5' CTACCAGCAGATGCCCTCGGC 3'
<i>lasB</i>	300 bp	F: 5' GGAATGAACGAAGCGTTCTC 3' R: 5' GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG 3'
<i>plcH</i>	307 bp	F: 5' GAAGCCATGGGCTACTTCAA 3' R: 5' AGAGTGACGAGGAGCGGTAG 3'
<i>aprA</i>	140 bp	F: 5' ACCCTGTCCTATTCGTTCC 3' R: 5' GATTGCAGCGACAACCTGG 3'
<i>exoS</i>	118 bp	F: 5' GCGAGGTCAGCAGAGTATCG 3' R: 5' TTCGGCGTCACTGTGGATGC 3'
<i>exoU</i>	134 bp	F: 5' CCGTTGTGGTGCCGTTGAAG 3' R: 5' CCAGATGTTCCACCGACTCGC 3'

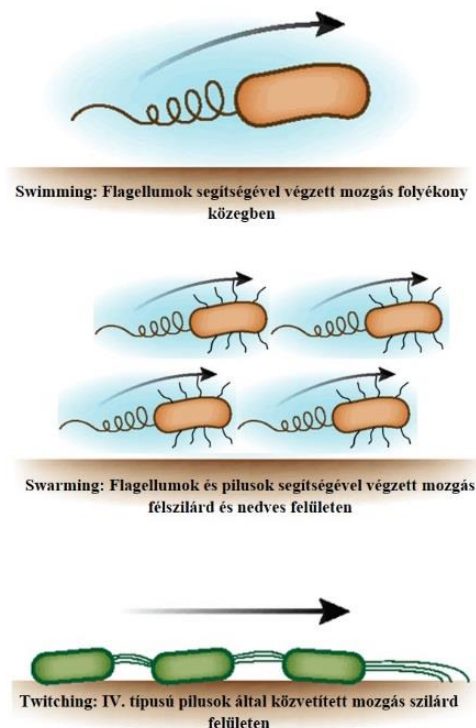
3.6.4 Szerológiai vizsgálatok

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.

3.6.5 Motilitás vizsgálatok

A *P. aeruginosa* folyékony, félfolyékony és szilárd közegekben különböző mozgásformákra képes (swimming, swarming, twitching, gliding, lásd: 2.10.2.1 alfejezet), melyek közül vizsgálataim a swimming, swarming és twitching mozgásformákra terjedtek ki. A motilitás általunk vizsgált formáit szemlélteti a 11. sz. ábra. A *P. aeruginosa* törzsek motilitás vizsgálatára a németországi TWINCORE Kutatóintézetben került sor intézetek közötti együttműködés keretében. A vizsgálatokhoz pozitív kontrollként a *P. aeruginosa* PA14 törzset alkalmaztam.

A motilitás teszthez OD600 1,5-2,5 sűrűségű baktériumszuszpenziót használtam, melyet 15 órás inkubáció után értékeltem a motilitási zóna megállapításával és mérésével, melyet az ImageJ



11. sz. ábra: A kísérleteink során vizsgált motilitási formák (swimming, swarming, twitching)

képkalkoló program segítségével elemeztem. A motilitás eredményeit három kategóriába soroltam: **nem motilis, motilis, hipermotilis** (8. sz. táblázat). A hipermotilitás határértékének a PA14 referencia törzs átlagértékét tekintetem, melyet minden kísérlet esetében kiszámoltam.

8. sz táblázat: A motilitási vizsgálat során megállapított és alkalmazott kategóriák

	Swimming	Terület (cm ²)*	Swarming	Terület (cm ²)*	Twitching	Terület (cm ²)*
1. kategória	nem motilis	0	nem motilis	0	nem motilis	0
2. kategória	motilis	0-1,10	motilis	0-8,17	motilis	0-1,82
3. kategória	hipermotilis	1,1-**	hipermotilis	8,18-**	hipermotilis	1,83-**

* terület meghatározása ImageJ képkalkoló program segítségével történt

** a hipermotilis kategória határértékének a PA14 referencia törzs átlagértékét tekintetem

A „swimming” mozgást 12 lyukú plate-en (12 well Nunc plates, Thermo Scientific Nunc®, USA), BM2 médium (Basal Medium2: 0,925g (NH₄)₂SO₄, 6,97g K₂HPO₄, 2,99g KH₂PO₄, 10mM FeSO₄, 50mM MgSO₄, 40g glükóz, 1000cm³) segítségével vizsgáltam, mely 0,3% agart tartalmazott. A plate mélyedéseibe 0,5 µl folyékony baktérium tenyészetet pipettáztam.

A “swarming” esetében szintén BM2 táptalajt használtam, azonban a félszilárd közegben bekövetkező mozgást már Petri-csészében vizsgáltam 0,5% agar és 0,5% kazein hidrolizátum hozzáadásával a jobb flagelláris szintézis érdekében. Az agarlemezek tetejére 1 µl baktérium kultúrát oltottam.

A “twitching” mozgás megfigyeléséhez 25 ml agaros LB (Luria-Bertani táptalaj: 10g Tripton, 5g Élesztőkivonat, 9g NaCl, 18g bakteriológiai agar, desztillált víz) táptalajjal lemezt öntöttem, majd 3 egyforma lyukat vágtam egymástól egyenlő távolságra, hogy a korábban 1 ml folyékony baktérium tenyészetből lecentrifugált pelletet belemérjem.

3.6.6 Virulencia vizsgálat nagy viaszmosoly (*Galleria mellonella*) modellen

A nagy viaszmosoly tesztek szintén a németországi TWINCORE laboratóriumaiban zajlottak. A vizsgálandó *P. aeruginosa* baktériumtörzsek „overnight” folyékony tenyészetéből 1,5 ml-t 5 percig 7168 g fordulaton, szobahőmérsékleten centrifugáltam, majd a pelletet foszfát pufferben felfuszpendáltam és OD-t (OD600: 0,5) állítottam. A minták tízszeres hígításával dolgoztam, az ötödik hígítási tagból 300 µl-t a nagy viaszmosoly (*Galleria mellonella*) lárvájának fertőzéséhez használtam fel (10 hernyó/baktériumtörzs). A negatív kontrollt baktériummentes foszfátoldattal, míg a pozitív kontrollt a PA14 referencia törzs tenyészetével kezeltem, illetve beállítottam egy kezelés mentes kontroll csoportot is. Minden tesztet két párhuzamosban végeztem, a lárvák



12. sz. ábra: A *Galleria mellonella* lárvák életképességének vizsgálata 48h után

életképességét 24 és 48 óra elteltével 37 °C-os inkubáció után ellenőriztem (12. sz. ábra). Feketés elszíneződés és lassú mozgás esetén fertőzöttnek tekintetem az adott lárvát, amennyiben semmilyen mozgás nem volt megfigyelhető, a lárvát életképtelennek nyilvánítottam. A vizsgált törzsek virulenciáját a nagy viaszmosoly lárva túlélése szerint négy kategóriába soroltam:

- avirulens (túlélési ráta:100-75%)
- közepesen avirulens (túlélési ráta:74-50%)
- közepesen virulens (túlélési ráta:49-25%)
- virulens (túlélési ráta: 24-0%).

3.7 Filogenetikai kapcsolatok vizsgálata

3.7.1 Multilokusz Szekvencia Tipizáló Módszer (MLST)

Az MLST olyan nukleotid bázissorrend meghatározáson alapuló szekvencia tipizáló módszer, ahol több, különböző (általában 7) ún. housekeeping gene⁴ („háztartási gén”) belső fragmentjei kerülnek legalább két párhuzamos vizsgálatban szekvenálásra. A módszer az alábbi főbb lépésekből áll:

- DNS izolálás
- háztartási gének kimutatása - PCR reakció
- PCR termék ellenőrzése agaróz-gélelektroforézissel
- PCR termék tisztítása
- az izolált génszakasz belső fragmentjének didedoxi-lánreakcióban történő felszaporítása
- a termék nukleotid-bázissorrendjének meghatározása
- a Szekvencia Típuszám (ST) meghatározása és az eredmények összehasonlítása nemzetközi adatbázisokkal

A háztartási gének, olyan gének, melyek a baktérium életben maradásához feltétlenül szükséges életfolyamatokban résztvevő enzimeket és proteineket kódolnak. A faj minden képviselőjében megvannak, konzervált génszakaszok, tehát filogenetikai összehasonlítás alapjául szolgálhatnak.

3.7.1.1 Az *A. baumannii* MLST vizsgálatához használt háztartási gének és funkcióik

1. *gltA* (citrát-szintáz): folyamatszabályozó enzim, ami a Krebs-ciklus (citromsav-ciklus) első reakcióját katalizálja.
2. *gyrB* (DNS giráz): enyhíti a torziós feszültséget a DNS spirálban.

⁴ housekeeping gene: a sejt valamely alapvető életfunkcióját kódoló gén, mely konstitutív módon minden esetben expresszálódik.

3. *gdhB* (glükóz dehidrogenáz): katalizálja a beta-D-glucose + NAD(P)⁺ \leftrightarrow D-glucono-1,5-lactone + NAD(P)H + H⁺ kémiai reakciót.
4. *recA* (homológ rekombinációs faktor): a recA fehérje központi szerepet játszik a homológ rekombináció során (homológ DNS szakaszok között a genetikai anyag kicserélődése).
5. *cpn60* (60-kDa chaperon): olyan fehérje, ami a sejtet ért stresszhatás következtében expresszálódik.
6. *gpi* (foszfoglükóz izomeráz): a sejten belül a szénhidrátanyagcsere folyamatát katalizálja.
7. *rpoD* (RNS polimeráz szigma faktor): a transzkripció iniciációjának szabályozásában vesz részt.

3.7.1.2 A *P. aeruginosa* MLST vizsgálatához használt háztartási gének és funkcióik

1. *acsA*: A citromsavciklusban szerepet játszó acetyl-coenzim A szintézisében résztvevő Acetyl-coenzim A szintetáz enzim termeléséért felelős génszakasz.
2. *aroE*: az aminosav-transzportban és metabolizmusban szerepet játszó shikimate (sikimát) átalakítását katalizáló Shikimate-dehidrogenáz enzim termeléséért felelős génszakasz.
3. *guaA*: A xantozin-monofoszfátot guanozin-monofoszfáttá átalakító Guanozin-monofoszfát-szintetáz enzim termeléséért felelős génszakasz.
4. *mutL*: A DNS károsodását gátló MutL-protein termeléséért felelő génszakasz.
5. *nuoD*: Az elektron-transzportban szerepet játszó NADH-dehidrogenáz enzim termelését kódoló génszakasz.
6. *ppsA*: A Foszfoenol-piruvát szintetáz termeléséért felelős génszakasz.
7. *trpE*: Antralit-szintetáz komponens kódoló génszakasz. A trp operonnak 5 struktúrgénje van, amelyek három enzim polipeptid láncát kódolják. Az enzimek a triptofán prekursorát, a korizminsavat alakítják át. Az első két gén, a *trpE* és a *trpD* termékei a reakcióút első lépését katalizáló enzim polipeptidjei.

3.7.1.3 A háztartási gének felszaporítása és szekvenálása

A módszer elvégzéséhez első lépésben a vizsgálni kívánt törzsekből DNS-t izoláltam a korábban leírt módszer szerint, majd a kiválasztott génszakaszok amplifikálásához szükséges primerpárokkal (9. sz. táblázat; CURRAN ET AL., 2004; BARTUAL ET AL., 2005) PCR reakciót futtattam.

9. sz. táblázat. Az *Acinetobacter* és a *P. aeruginosa* törzsek MLST vizsgálata során a PCR-hez használt primerek szekvenciája

	Primer	Amplifikáló primerek szekvenciája (5'→3')
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>gltA</i>	F: AATTTACAGTGGCACATTAGGTCC C R: GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG
	<i>gyrB</i>	F: TGAAGGCGGCTTATCTGAGT R: GCTGGGTCTTTTTCCTGACA
	<i>gdhB</i>	F: GCTACTTTTATGCAACAGAGCC R: GTTGAGTTGGCGTATGTTGTG C
	<i>recA</i>	F: CCTGAATCTTCYGGTAAAAC R: GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC
	<i>cpn60</i>	F: GGTGCTCAACTTGTTTCGTGA R: CACCGAAACCAGGAGCTTTA
	<i>gpi</i>	F: GAAATTTCCGGAGCTCACAA R: TCAGGAGCAATACCCCACTC
	<i>rpoD</i>	F: ACCCGTGAAGGTGAAATCAG R: TTCAGCTGGAGCTTTAGCAAT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>acsA</i>	F: ACCTGGTGTACGCCT CGCTGAC R: GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT
	<i>aroE</i>	F: TGGGGC TATGACTGGAAACC R: TAACCCGGTTTTGTGATTCTACA
	<i>guaA</i>	F: CGGCCTCGACGTGTGGATGA R: GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA
	<i>mutL</i>	F: CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG R: CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC
	<i>nuoD</i>	F: ACCGCCACCCGTA CTG R: TCTCGCCATCTTGACCA
	<i>ppsA</i>	F: GGTGCTCGGTCAAGGTAGTGG R: GGGTCTCTTCTTCCGGCTCGTAG
	<i>trpE</i>	F: GCGGCCAGGGTTCGTGAG R: CCCGGCGCTTGTGATGGTT

A PCR reakcióhoz felhasznált reakcióelegy (50 µl végtérfogatra számolva): 5 µl Taq puffer (Thermo Scientific, USA), 1,25 U Dream Taq polimeráz (Thermo Scientific, USA), 4µM dNTP, 1µM forward és reverz primer, 1 µl DNS templát, 32,75 µl nukleázmentes víz.

A PCR reakció az automata Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf, Németország) készülékben zajlott a következő hőprofil alapján: 94°C 2' 30x (94°C 1' 55°C 1' 72°C 2') 72°C 2' 4°C ∞. A folyamat végén a készülék 4°C-ra hűti a PCR terméket, melyet agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. A PCR terméket a korábban leírt módszerrel tisztítottam, majd ismét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem. A korábban ismertetett módon és paraméterek mellett szekvenáló reakciót futtattam a 10. sz. táblázatban található primerek segítségével.

Olyan primerpárokat alkalmaztam, melyek az izolált háztartási gének belső fragmentjeire specifikusak, így segítségükkel lehetővé vált adott bázispár-hosszúságú termék szekvenciájának meghatározása (CURRAN ET AL., 2004; BARTUAL ET AL., 2005).

10. sz. táblázat: Az *Acinetobacter* és a *P. aeruginosa* törzsek szekvenáló vizsgálatához alkalmazott primerek szekvenciája

	Primer	Amplifikáló primerek szekvenciája (5'→3')
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>gltA</i>	F: AATTTACAGTGGCACATTAGGTCC C R: GCAGAGATACCAGCAGAGATACACG
	<i>gyrB</i>	F: TGAAGGCGGCTTATCTGAGT R: GCTGGGTCTTTTTCTGACA
	<i>gdhB</i>	F: ACCACATGCTTTGTTATG R: GTTGGCGTATGTTGTGC
	<i>recA</i>	F: CCTGAATCTTCYGGTAAAAC R: GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC
	<i>cpn60</i>	F: GGTGCTCAACTTGTTCGTGA R: CACCGAAACCAGGAGCTTTA
	<i>gpi</i>	F: GAAATTTCCGGAGCTCACAA R: TCAGGAGCAATACCCCACTC
	<i>rpoD</i>	F: ACCCGTGAAGGTGAAATCAG R: TTCAGCTGGAGCTTTAGCAAT
	<i>acsA</i>	F: GCCACACCTACATCGTCTAT R: GTGGACAACCTCGGCAACCT
	<i>aroE</i>	F: ATGTCACCGTGCCGTTCAAG R: TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>guaA</i>
<i>mutL</i>		F: AGAAGACCGAGTTCGACCAT R: ATGACTTCCTCTATGGCACC
<i>nuoD</i>		F: ACGGCGAGAACGAGGACTAC R: TTCACCTTCACCGACCGCCA
<i>ppsA</i>		F: GGTGACGACGGCAAGCTGTA R: TCCTGTGCCGAAGGCGATAC
<i>trpE</i>		F: TTCAACTTCGGCGACTTCCA R: GGTGTCCATGTTGCCGTTCC

Ezt követően az etanol-precipitáció után kapilláris gélelektroforézis segítségével meghatároztam a felszaporított génszakaszok bázissorrendjét, melyeket a MEGA6 programmal értékeltem.

3.7.1.4 Allélikus profil és szekvencia típus (ST) meghatározás

A fent ismertetett, többlépcsős molekuláris genetikai vizsgálatok eredményeképp két párhuzamos (forward és reverz irányban megállapított) szekvenciát kaptam minden egyes háztartási gén esetében, melyeket MEGA6 program segítségével illesztettem.

Az így nyert fragmentek szekvenciái nemzetközi adatbázissal (www.pubmlst.org) összevethetők, így megállapíthattam az adott lokuszon⁵ található allél⁶ számát, illetve minden egyes észlelt nukleotid különbséghez lokuszonként egy (a korábbiaktól eltérő) allélszámot rendelhettem. A hét génszakasz esetében meghatározott allélok kombinációja alapján megállapítható az adott törzs szekvencia típuszáma (ST).

Az adatbázissal történő összehasonlítás eredményeként az adott törzs ST száma alapján meghatározható a különböző helyekről izolált törzsek közti filogenetikai kapcsolatrendszer.

3.7.2 Pulzáló erőterű gélelektroforézis (PFGE)

A pulzáló erőterű gélelektroforézis olyan kromoszómális RFLP⁷ analízisen alapuló molekuláris tipizálási módszer, amely során a bakteriális genom kis számú, nagy méretű fragmentumra bontva egészében vizsgálható. Az eljárás előnye, hogy szekvenálás nélkül lehet bizonyítani egyes baktériumok klonális eredetét a genomok direkt vizsgálatával.

A restriktív enzim segítségével emésztett DNS-t pulzáló erőterű gélelektroforézis segítségével szétválasztják, majd ezt követően a különböző nagyságú fragmentumok mintázata alapján értékelni lehet a törzseket egymáshoz viszonyítva filogenetikai alapon. Az *in vitro* tenyésztendő baktériumok mind tipizálhatók ezzel a módszerrel.

A vizsgálat az alábbiak szerint zajlott: 24 órás tenyészetből sejtsuszpenziót hoztam létre, melyhez lizozim enzimet adtam a sejtek emésztésének céljából. Ezt követően 3 órán keresztül 37°C-os vízfürdőn inkubáltam a sejteket, majd 1:1 arányban géllal (Seakem agar) kevertem a sejtsuszpenziót, melyet műanyagformába öntöttem és úgynevezett „plug”-okat hoztam létre. A megdermedt „plug”-okat proteináz K oldatba helyeztem, majd egy éjszakán át 50°C-os vízfürdőn inkubáltam. A következő napon átmostam a „plug”-okat, majd pufferbe helyeztem és *SpeI* (Thermo Fisher Scientific, USA) emésztőenzimet adtam hozzá. Összeállítottam a futtató puffert (TBE: 162g TRIS, 27,5g H₃BO₄, 9,5g Na₂ EDTA·xH₂O; thiourea; desztillált víz), illetve futtató gélt öntöttem, melynek zsebeibe megszilárdulása után spatula segítségével belehelyeztem a „plug”-okat. A gélt futtatókádba helyeztem és 25 órán keresztül, 5,8 V-on, 14°C hőmérsékleten futtattam a CHEF DRIII System (Bio-Rad) készülék segítségével. Ezután 30 percen keresztül billegő asztalon etídium-bromidos desztillált vízben megfestettem a gélt, újabb 30 percen keresztül desztillált vízzel átmostam, majd UV fény alatt detektáltam és fotóztam az eredményt. A gélkép kiértékelése a BioRad, Fingerprinting II Informatix (Bio-Rad, USA) szoftver segítségével történt. A kvantitatív különbségek kimutatásához a fragmentmintázatok alapján Dice koefficiens számol

⁵ Lokusz: másnéven génhely. Adott gén, vagy szekvencia kromoszómán, vagy genetikai térképen elfoglalt helye.

⁶ Allél: másnéven génváltozat. Adott lokuszon elhelyezkedő gén variációja.

⁷ Restriction Fragment Length Polymorphism - restriktív fragmentum hossz polimorfizmus

a program majd az UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) algoritmus segítségével klaszteranalízist készít.

Az izolátumaink PFGE profilját összehasonlítottam a Nemzeti Népegészségügyi Központ adatbázisával, ahol azonosság alapján már létező vagy újonnan generált típusszámot kaptak. A DNS-restrikciós minták alapján kategorizáltam a törzseket: 95% homológia felett azonos típusba soroltam két törzset, 85-95% között szorosnak tekintetem a kapcsolatot, 85% felett, ahol a Tenover kritériumok (TENOVER ET AL., 1995) nem teljesülnek, lehetséges kapcsolatot állapítottam meg 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.

Tenover kritériumok (TENOVER ET AL., 1995):

Besorolás	Fragmentszám különbség	Értelmezés
Megkülönböztethetetlen	0	azonos klón
Közeli rokon	2-3	valószínűleg azonos klón
Lehetséges rokon	4-6	lehetséges azonos klón
Különböző	>7	különböző klón

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Az *Acinetobacter* törzsekkel végzett vizsgálatok eredményei

4.1.1 Az *Acinetobacter* törzsek izolálásának és azonosításának eredményei

Az *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó fajok azonosításának céljából 403 magyarországi és 2, unikális mintavételi helyről (Tanzánia, Afrika) származó környezeti mintát dolgoztam fel a 2008-2018 közötti időszakban, melyekből összesen 51, az *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó baktériumtörzset izoláltam és identifikáltam (11-12. sz. táblázatok, 3. sz. melléklet). A környezeti eredetű törzseket törzsgyűjteménybe helyeztem, melyet a SZIE-Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék laboratóriumában tárolok.

A feldolgozott 403 magyarországi mintából 41 mintában mutattam ki összesen 49 esetben az *Acinetobacter* nemzetségbe tartozó fajt (11. sz. táblázat), tehát az acinetobacterek magyarországi, környezeti mintákból kimutatott gyakorisága 12,2% volt. Ezen belül a klinikai jelentőséggel bíró *A. baumannii* fajhoz tartozó törzset a minták ~1%-ában detektáltam. Unikális helyről (Tanzánia) származó, két talajmintából egy-egy *Acinetobacter* fajt sikerült azonosítanom (12. sz. táblázat). A törzsek izolálására vonatkozó részletes adatokat, valamint az azonosított fajok kockázati besorolását a 3. sz. melléklet foglalja össze.

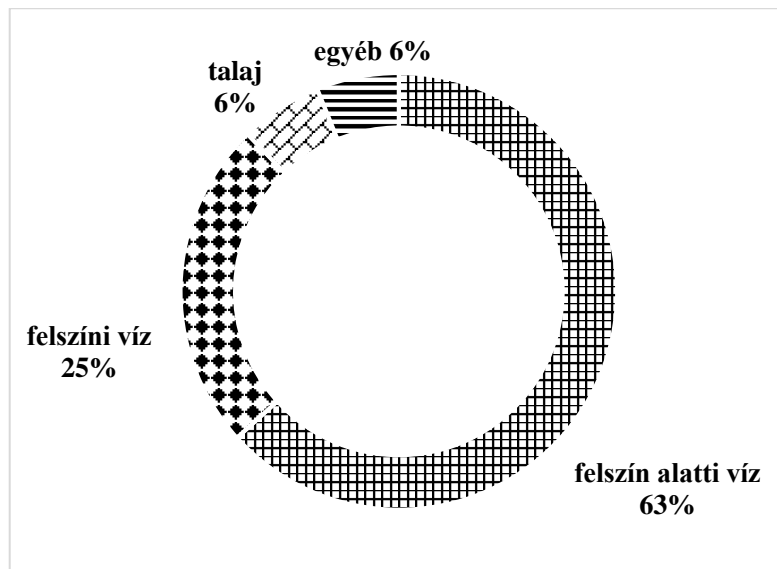
11. sz. táblázat: Az *Acinetobacter* nemzetség izolálása céljából feldolgozott magyarországi, környezeti minták száma, mintavételi közegek szerinti megoszlása, az izolált törzsek száma

	Vizsgált magyarországi minták száma	Minták száma, melyekből kimutattam <i>Acinetobacter</i> törzset	Izolált <i>Acinetobacter</i> törzsek száma
Összesen	403	41	49
felszín alatti víz	341	27	31
felszíni víz	28	8	11
földtani közeg	15	3	3
egyéb	19	3	4

12. sz. táblázat: Az *Acinetobacter* nemzetség izolálása céljából feldolgozott külföldi, környezeti minták száma, mintavételi közegek szerinti megoszlása, az izolált törzsek száma

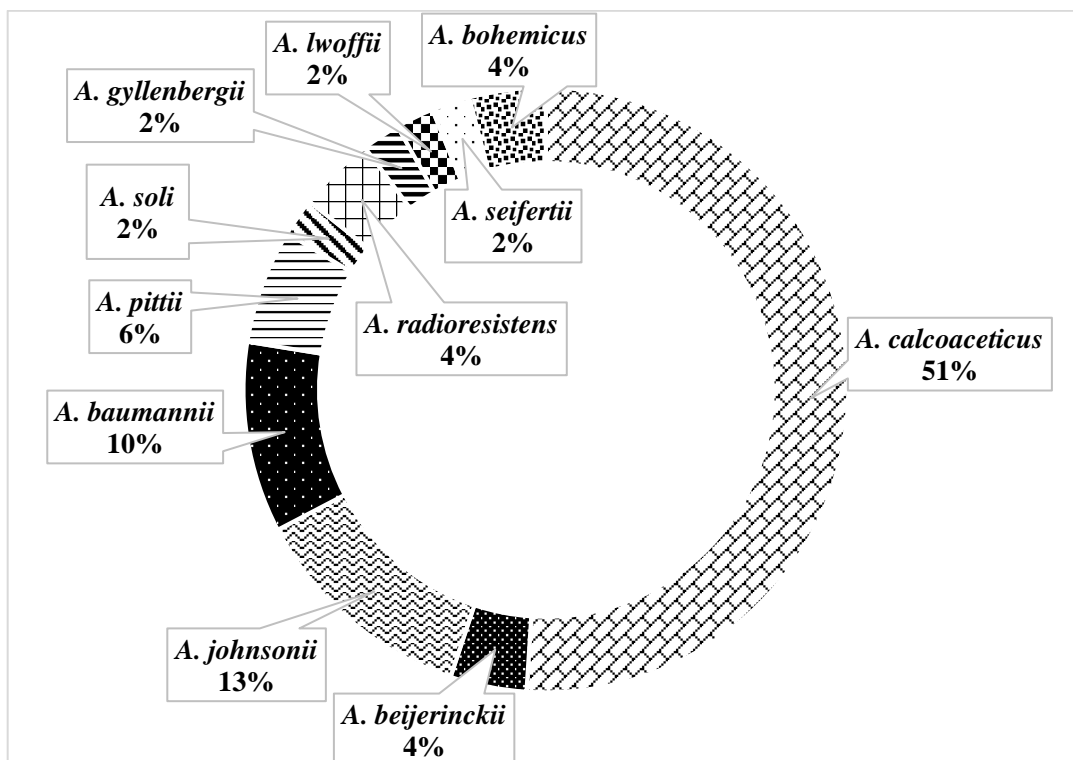
Mintavételi helyszín	Unikális helyről (Tanzánia) származó minták száma	Minták száma, melyekből kimutattam <i>Acinetobacter</i> törzset	Izolált <i>Acinetobacter</i> törzsek száma
földtani közeg	8	2	2

A hazai környezeti izolátumok 63%-a felszín alatti vízmintából, 25%-a felszíni vízmintából, 6%-a talajmintából és 6%-a egyéb (hal, zöldség) mintából származott (13. sz. ábra).



13. sz. ábra: A magyarországi környezeti mintákból izolált és azonosított *Acinetobacter* törzsek százalékos megoszlása a mintavételi közeg szerint (n=49)

A magyarországi mintákból tenyésztett és azonosított törzsek több mint fele (51%) az *A. calcoaceticus* fajhoz tartozott, melyet 13%-kal az *A. johnsonii* faj követett. További 10% az *A. baumannii*, 6% az *A. pittii*, 4-4% az *A. beijerinckii*, *A. bohemicus* és az *A. radioresistens*, illetve 2-2% az *A. soli*, *A. gyllenbergii*, *A. lwoffii* és *A. seifertii* fajokhoz tartozott (14. sz. ábra).



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

A tanzániai talajmintákból egy *A. baumannii* és egy *A. pittii* fajt identifikáltam, összesen tehát 51, *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó fajt azonosítottam.

Munkám során az 51 törzsből hat *A. baumannii* és négy *A. pittii* törzset izoláltam (3. sz. melléklet), vagyis az *Acinetobacter* törzseim 19,6 %-ban az ACB komplex kiemelt humán egészségügyi jelentőséggel bíró fajai közé tartoztak. Az ACB komplexbe tartozó, szintén humán egészségügyi kockázatot jelentő, *Acinetobacter nosocomialis* fajt a környezeti minták vizsgálata során nem detektáltam. A további, izolált és azonosított fajok a nemzetség változatos környezeti feltételek mellett detektálható, kisebb humán egészségügyi jelentőséggel rendelkező (Risk Group 1 és Risk Group 2 besorolású) képviselői voltak. Ezek közül szakirodalmi adatok alapján az *A. beijerinckii*, az *A. johnsonii* és az *A. gyllenbergii* növekvő klinikai jelentőségével lehet számolni (TURTON ET AL., 2010). Az *A. baumannii* fajt, melynek képviselőiből öt törzset sikerült izolálnom hazai felszíni-, és felszín alatti vízmintákból, illetve egy törzset talajeredetű mintából (Tanzánia, Afrika) humán egészségügyi jelentőségére tekintettel kiemelt figyelemmel vizsgáltam a továbbiakban.

Az *Acinetobacter* nemzetség képviselőinek azonosítása során kapott szekvenciákat a nemzetközi „EMBL-EBI” (European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute, UK) és az „NCBI” (National Center for Biotechnology Information, USA) adatbázisokban helyeztem letétbe, ahol az alábbi hivatkozási számokat (accession number) rendelték izolátumaimhoz: EMBL-EBI - *HG810368-HG810404*; NCBI - *MG952608-MG952631*.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY:

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, 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.

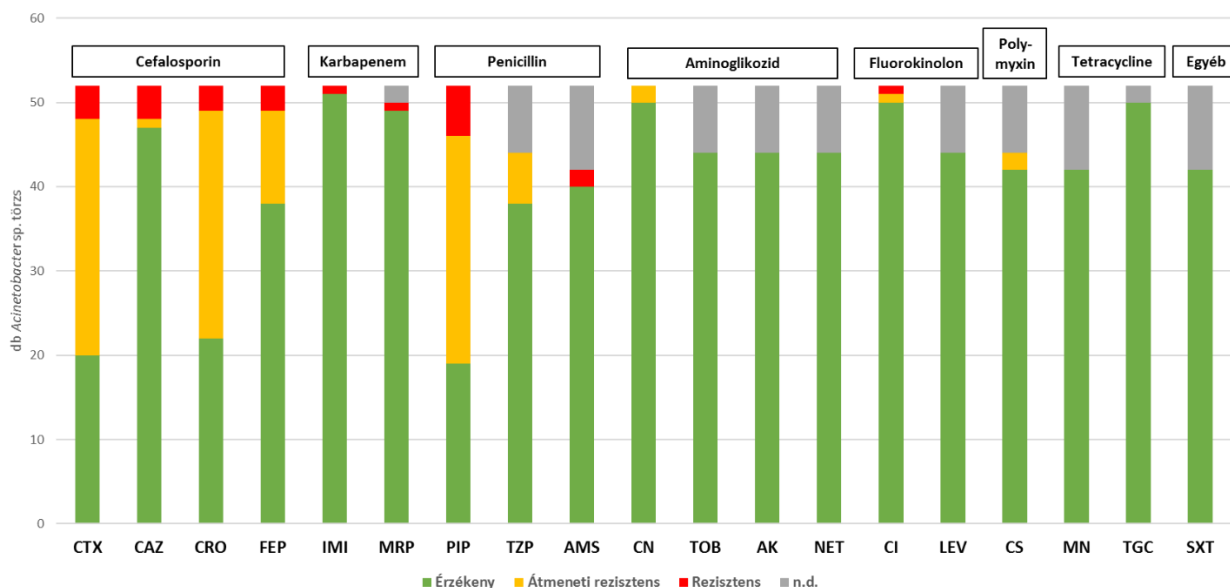
Izolált és azonosított *Acinetobacter* környezeti törzseim körét kiegészítettem az *A. baumannii* ATCC 19606 típus törzsszel, így a továbbiakban összesen 52 izolátumot vizsgáltam antibiotikum rezisztencia, hemolitikus aktivitás és biofilm képző képesség tesztben.

4.1.2 Antibiotikum rezisztencia vizsgálat eredményei

4.1.2.1 MIC teszt

Összesen 52 (51 környezeti és az ATCC 19606 típus törzs), *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó baktériumtörzset vontam vizsgálatba az antibiotikum rezisztencia fenotípusos módszerrel történő meghatározása céljából, melynek eredményeit az 4. sz. mellékletben ismertetem részletesen. 17 hatóanyag, illetve 2, béta-laktamáz gátlóval kombinált hatóanyag került a vizsgálati rendszerbe, nemzetközi ajánlások szerint (lásd: 2. sz. melléklet). A törzsgyűjtemény néhány tagját nem sikerült hosszútávon fenntartani, így a rezisztencia eredmények bizonyos törzsek esetében hiányosak.

A Karbapenemek csoportjába tartozó imipenem és meropenem hatóanyagok, melyeket a klinikai gyakorlatban első választásként alkalmaznak az *A. baumannii* terápiájában, csupán egy esetben, az *A. beijerinckii* faj egyik képviselőjére nézve (T3N6 törzs) voltak hatástalanok. A Cefalosporinok csoportjából vizsgált négy hatóanyag (cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxon, cefepim) esetében 37 törzs mutatott legalább egy készítménnyel szemben rezisztenciát vagy átmeneti rezisztenciát, tehát a Cefalosporinokkal szembeni rezisztencia a környezeti acinetobacterek körében kiterjedtnek tekinthető. A Penicillinek csoportjából a piperacillint, illetve béta-laktamáz gátlóval kiegészített kombinációját és az ampicillin béta-laktamáz gátlóval kiegészített kombinációját vontam a kísérletbe. A piperacillinnel szemben 6 törzs volt rezisztens és 27 törzs mutatott átmeneti rezisztenciát, mely jelzi, hogy a hatóanyaggal szemben a környezeti rezisztencia fokozódására lehet számítani. A piperacillin/tazobaktám esetében 6 törzsnél detektáltam átmeneti rezisztenciát, mely törzsek a piperacillinnel szemben is átmeneti rezisztenciát mutattak. A piperacillinre rezisztens izolátumok érzékenyek bizonyultak a tazobaktámmal kombinált szerre, ami béta-laktamáz enzimek termelésére utalhat. Az ampicillin/szulbaktám két törzssel (*A. beijerinckii* T3N6 és *A. johnsonii* J6) szemben bizonyult hatástalannak. Az Aminoglikozidok közül a gentamicinnel, a tobramicinnel, az amikacinnal és a netilmicinnel szemben vizsgáltam rezisztenciát. Egy *A. calcoaceticus* törzs mutatott átmeneti rezisztenciát a gentamicinnel szemben. A Fluorokinolonok (ciprofloxacin, levofloxacin) közül a ciprofloxacinnal szemben egy-egy esetben rezisztenciát és átmeneti rezisztenciát határoztam meg. A kolisztin vizsgálata során 2 törzs esetében mutattam ki átmeneti rezisztenciát, melyek az *A. beijerinckii* és az *A. calcoaceticus* fajok képviselői voltak. A trimethoprim/szulfamethoxazol és a Tetraciklinekhez tartozó minociklin és tigeziklin hatóanyagokkal szemben minden vizsgált törzs érzékeny volt. A vizsgált hatóanyagokkal szemben rezisztens, átmeneti rezisztens és érzékeny törzsek arányát a 15. sz. ábra mutatja.



15. 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-levofloxacin, CS-kolisztin, MN-minociklin, TGC-tigeciklin, SXT-trimethoprim/sulfamethoxazol; n.d.-nincs adat

Összehasonlítva vizsgálatom eredményeit a 2017-es magyarországi, kórházi adatokkal a Nemzeti Népegészségügyi Központ jelentései alapján (mely része az európai surveillance rendszernek), szembevetve a környezeti törzsek jelentős antibiotikum érzékenysége a kórházi izolátumok nagyfokú rezisztenciájával szemben (http16), mely jelzi, hogy az *A. baumannii* faj antibiotikumoknak való kitettség (expozíció) által kiváltott szelekciós nyomás, illetve rezisztencia gének felvételének lehetősége nélkül jellemzően antibiotikum-érzékeny mikroorganizmusok tekinthetők.

A vizsgálati eredményekből kiemelendők a T3N6 *A. beijerinckii*, a 6/1 és a J6 *A. johnsonii*, környezeti mintákból izolált törzsek, melyek több, a klinikai terápiában első választásba eső (Karbapenem), vagy alternatív kezelésre javasolt (Penicillin, Fluorokinolon, Cefalosporin, Polimixin) hatóanyagcsoport készítményeivel szemben rezisztensnek és átmeneti rezisztensnek bizonyultak, így megfelelnek a multirezisztencia (MAGIORAKOS ET AL., 2011) kritériumainak (4. sz. melléklet).

A T3N6 *A. beijerinckii* törzs rezisztens volt a Karbapenemek csoportjába tartozó imipenemmel és meropenemmel, a Cefalosporinok csoportjába tartozó cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxon és cefepimrel szemben, illetve a Penicillinek csoportjába béta-laktamáz gátlóval kiegészített ampicillinnel szemben. Átmeneti rezisztenciát mutatott továbbá a Penicillinek csoportjába tartozó piperacillinnel és a piperacillin béta-laktamáz gátlóval kiegészített változatával szemben, valamint a Polimixinek csoportjába tartozó kolisztin hatóanyaggal szemben. A 6/1 *A.*

johnsonii izolátum rezisztens volt a Cefalosporinok csoportjába tartozó cefotaxim, ceftazidim és ceftriaxon hatóanyagra, a Penicillinek csoportjába tartozó piperacillinre és a Fluorokinolonok csoportjába tartozó ciprofloxacinnal. Átmeneti rezisztenciát mutatott a Cefalosporinok csoportjába tartozó cefepimmal szemben. A J6 *A. johnsonii* jelölésű törzs rezisztens volt a Cefalosporinok csoportjába tartozó cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxon és cefepimmal szemben, illetve a Penicillinek csoportjába tartozó ampicillin béta-laktamáz gátlóval kiegészített változatával szemben. Átmeneti rezisztenciát mutatott a Fluorokinolonok csoportjába tartozó ciprofloxacinnal.

Az említett baktériumfajok antibiotikum rezisztenciájára vonatkozóan eddig csak klinikai vizsgálatok eredményei álltak rendelkezésre (TURTON ET AL., 2010), mely alapján az *A. beijerinckii* kolisztin (Polimixin) rezisztenciáját emelték ki (a kolisztin egyike az *A. baumannii* alternatív terápiájában végső megoldásként alkalmazható készítményeknek). Ezzel a készítménnyel szemben az általunk vizsgált *A. beijerinckii* törzs átmeneti rezisztenciát mutatott. Ezek alapján feltehető, hogy az *A. beijerinckii* faj egyes képviselői olyan antibiotikum rezisztencia mechanizmusok rezervoárjával rendelkezhetnek, amely akár a klinikai terápiára is hatással lehet. Az *A. beijerinckii* esetében így nélkülözhetetlen feladat a jövőben az antibiotikum rezisztencia mechanizmusának feltárása, a rezisztencia átadhatóságának ellenőrzése.

Az *A. baumannii* faj vizsgálataira, a faj kórházi szerepét tekintve, különös figyelmet fordítottam. A faj kórházi képviselőinek jelentősége főként a körükben kimutatott antibiotikum rezisztenciának tulajdonítható, melynek mértéke az elmúlt 16 évben igen gyorsan emelkedett. Az imipenemmel szemben mutatott rezisztencia 11 év alatt 23,8%-ról 73,9%-ra nőtt az OECD (Organization for Economic Cooperation and Development - Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet) 35 országában, melynek következtében jelenleg a leghatásosabb és ezáltal leggyakrabban utolsó választásként alkalmazott szerekké lépett elő a tigeciklin és a kolisztin (XIE ET AL., 2018). A környezeti *A. baumannii* törzsek egyetlen általam vizsgált antibiotikum esetében sem voltak rezisztensek.

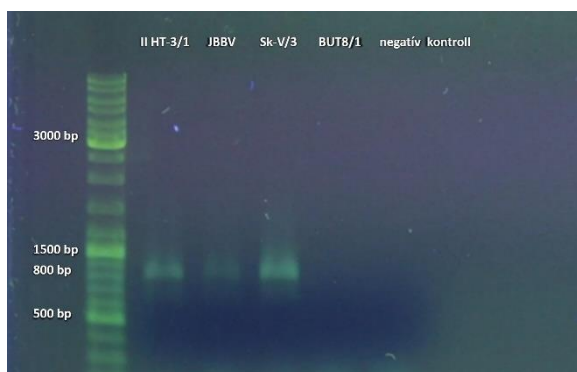
Az antibiotikum rezisztencia fenotípusos vizsgálata során, a környezeti *A. baumannii* törzsek körében átmeneti rezisztenciát tapasztaltam egy-egy törzsnél a cefotaximmal, a ceftriaxonnal és a piperacillinnel szemben. A humán eredetű, ATCC 19606 típusú törzs három Cefalosporin hatóanyaggal és a gentamicinnel szemben átmeneti rezisztenciát mutatott.

A környezeti eredetű *A. baumannii* baktériumtörzsek esetében elenyésző információval rendelkezünk antibiotikum rezisztencia tekintetében, mely alapján eredményeink elsősorban Rafei és mtsai (2015) adataival vannak összhangban, akik szintén a környezeti *A. baumannii* törzsek antibiotikum érzékenységét vizsgálták. 42 izolátumból csupán egy esetben mutattak ki ciprofloxacinnal és doxiciklin rezisztenciát, illetve egy törzs volt rezisztens az imipenemmel és a meropenemmel szemben. Átmeneti rezisztenciát két izolátumnál tapasztaltak a rifampicin

esetében (RAFEI ET AL., 2015). Ezzel ellentétben egy horvát kutatócsoport által talajból izolált, környezeti eredetű *A. baumannii* törzs rezisztens volt a gentamicin, ciprofloxacinnal, levofloxacinnal és trimetoprim/szulfametoxazol hatóanyagokkal szemben (HRENOVIC ET AL., 2014), mely jelzi, hogy a környezeti eredetű *A. baumannii* izolátumok esetében az antibiotikum-rezisztencia profil tekintetében rendkívül nagy heterogenitással kell számolni.

4.1.2.2 A *bla_{OXA-51}*, béta-laktamáz antibiotikum rezisztencia gén vizsgálata

A Karbapenem hidrolizáló enzim(ek) termeléséért felelős (EVANS&AMYES, 2014) *bla_{OXA-51}* génszakasz jelenlétét 7 *A. baumannii* és vele közeli rokonságban álló, 4 *A. pittii* törzs esetében



16. sz. ábra: *A. bla_{OXA-51}* gén (825 bp) PCR termék gélképe. II HT-3/1, JBBV, Sk-V/3 – *A. baumannii*; BUT8/1 – *A. pittii*

molekuláris biológiai módszerrel, polimeráz láncreakció segítségével vizsgáltam. A vizsgálatok során minden *A. baumannii* törzs esetében kimutattam az OXA-51-es típusú, Karbapenem hidrolizáló oxacillináz enzimet kódoló, 825 bázispár hosszúságú génszakaszt, míg az *A. pittii* izolátumokban ugyanez nem volt detektálható (16. sz. ábra). Ezen eredmény a szakirodalomban leírtakat teljes mértékben igazolta (MERKIER&CENTRÓN, 2006). A vizsgálatba vont

törzsek a fenotípusos antibiotikum rezisztencia teszt eredményei szerint mind érzékenyek voltak a Karbapenem hatóanyagokkal szemben, ez alapján feltételezhető, hogy bár génkészletükben megtalálható a rezisztenciáért felelős gén, azonban az adott körülmények között nem fejeződik ki.

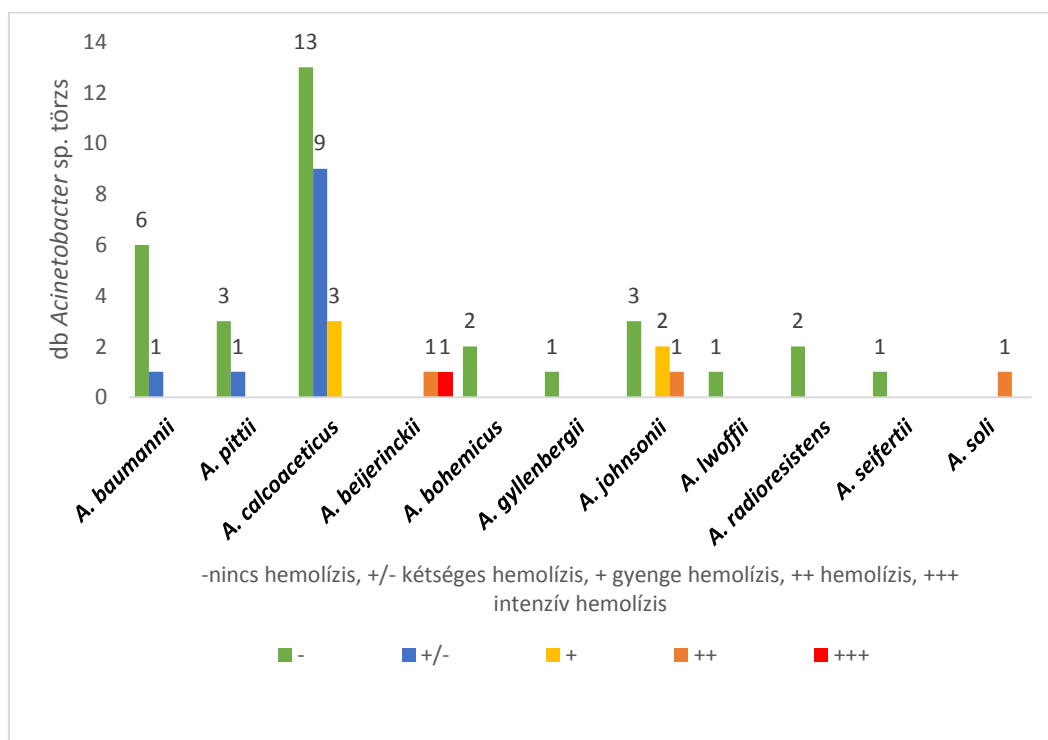
4.1.3 A hemolitikus aktivitás vizsgálatának eredményei

A hemolitikus aktivitást 52 *Acinetobacter* izolátum esetében vizsgáltam (51 saját izolátum és az ATCC19606 típus-törzs). 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 HT-4/2 – *A. soli*) figyelhettem meg. Ezek közül kiemelném a „T3N6” *A. beijerinckii* multirezisztens törzset, mely intenzív béta hemolízist mutatott. További 11 törzsnél a 22 órás leolvasás után kétséges volt a hemolízis mértéke. A vizsgálatba vont törzsek 61,5%-a tehát nem mutatott hemolízisre utaló jelet. A hemolitikus aktivitás vizsgálatának eredményeit az 4.sz. mellékletben és a 17. sz. ábrán ismertetem.

A környezeti *A. baumannii* izolátumok növekedést igen, azonban egyértelmű béta-hemolízist egy esetben sem mutattak, mely összhangban áll azzal a szakirodalmi adattal, miszerint 48, klinikai izolátum hemolitikus aktivitás vizsgálata során egy törzs esetében sem tapasztaltak

béta-hemolízist (STANTON, 2013). Egy másik tanulmányban jóval nagyobb számú, kórházi betegből származó *Acinetobacter* izolátumot (n=370) vontak vizsgálatba, mely során emberi, birka-, marha- és nyúlvérrel kiegészített agaron tesztelték a törzsek hemolitikus aktivitását. Az eredmények azt mutatták, hogy az *A. haemolyticus* törzsek hemolizáltak legnagyobb arányban, míg az *A. baumannii* és *A. Iwoffii* izolátumok csak közepes hemolízisre voltak képesek (FLEISCHER & PRZONDO-MORDARSKA, 1993). Az *A. beijerinckii* és *A. gyllenbergii* fajok leírásánál jellemző tulajdonságként jegyezték le, hogy a két faj típusörzse képes volt hemolízisre más *Acinetobacter* fajokkal szemben (NEMEC ET AL., 2009).

Mivel az *Acinetobacter* nemzetség esetében a megbízhatóan vizsgálható virulencia faktorok köre egyelőre korlátozott és a célzott molekuláris biológiai vizsgálatok az esetek döntő részében csak az *A. baumannii* fajra specifikusak, a virulencia fenotípusos detektálása továbbra is nélkülözhetetlen. A hemolitikus aktivitás ennek egy módszere, mely korlátjai ellenére is képet adhat a környezeti acinetobacterek várható virulenciájáról. Mindezek alapján a hemolitikus aktivitás vizsgálata új tudományos eredménnyel szolgált, melyet az alábbi tézis foglal össze.



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

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY:

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.

Eredményem nemzetközi publikációban adtam közre.

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

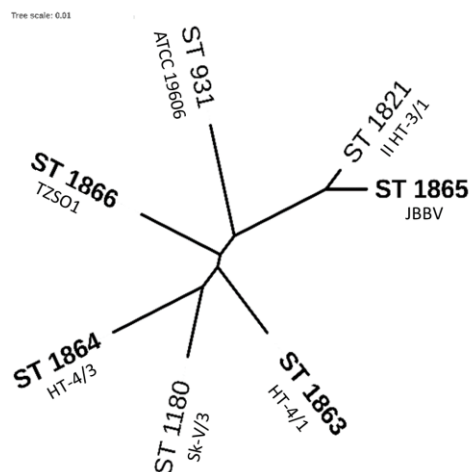
4.1.4 A biofilm képző képesség vizsgálatának eredményei

A biofilm képző képességet – a törzsgyűjtemény fenntartásában adódott nehézségek miatt – 41, *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó izolátumnál vizsgáltam, a méréseket az Anyag és módszer fejezetben ismertetett mikrotiter lemezes módszer segítségével végeztem 24, 48, 72 és 96 óra elteltével végrehajtott leolvasásokkal. Mivel a különböző időpontokban leolvasott eredmények sok esetben nem mutattak összefüggést egymással, ezért a szakirodalomban alkalmazott és elfogadott értékeléseket figyelembe véve, a 48 órás leolvasást tekintettem meghatározónak. A 48 óra elteltével mért eredmények alapján csupán 3 olyan *Acinetobacter* törzset találtam, mely erős biofilm képző képességgel rendelkezett. Ezek közül kiemelném a „TZCO3” *A. pittii* és „TZSO1” *A. baumannii* izolátumokat, melyek minden mérési időpontban, egyenletesen erős biofilm képzést mutattak. Az *A. calcoaceticus* „J4” a 24 és 48 órás mérés során erős, míg a 72 és 96 órás időpontban gyenge és közepes biofilm termelést produkált. Az *A. baumannii* izolátumok, habár a 48 órás mérésben többnyire csak gyenge vagy közepes biofilm képzést mutattak, összességében a többi mérési ponton közepes vagy erős biofilm képzést eredményeztek. Az összes vizsgált faj közül az *A. baumannii* és *A. pittii* fajok voltak a legaktívabbak a biofilm képzés tekintetében, mely összhangban áll a szakirodalom azon megállapításával, miszerint az *A. baumannii* faj mind környezeti, mind klinikai viszonyok között birtokolhatja a biofilm képző képességet (ROCA ET AL., 2012). A biofilm vizsgálat eredményeit a 4. sz. melléklet tartalmazza, a mérés háttéradatait elektronikus melléklet formájában ismertetem. A multirezisztens és intenzív hemolitikus aktivitást is mutató *A. beijerinckii* T3N6 törzs esetében a tapasztalt biofilm képző képesség gyenge volt.

4.1.5 Az MLST módszer eredményei

A Multilokusz Szekvencia Tipizáló Módszer segítségével hat környezeti eredetű *A. baumannii* izolátumot (Sk-V/3, HT-4/1, HT-4/3, II HT 3/1, JBBV, TZSO1) és a faj típus törzset (ATCC 19606) vizsgáltam, illetve az *A. baumannii* közeli rokonának, az *A. pittii* fajnak három képviselőjét (PM 15/3, BUT-8/1, J2) is a kísérletbe vontam. Az *A. baumannii* törzsek esetében meghatározott allélikus profil alapján három törzshöz az adatbázisban már létező ST számot (ATCC 19606 - ST 931, Sk-V/3 - ST 1180, II HT-3/1 - ST 1821) rendeltek. Az Sk-V/3, felszín alatti vízből izolált törzs egy Oroszországból származó izolátummal osztozott azonos ST számon, míg a II HT-3/1 törzshöz, az Egyesült Államokból, állati eredetű mintából származó törzs ST

számát rendelték. A filogenetikai vizsgálat alapján tehát földrajzilag különböző területekről és eltérő időben izolált baktériumtörzsek szoros rokonsági kapcsolata mutatható ki. További négy esetben (HT-4/1, HT-4/3, JBBV, TZSO1, azonosító számuk a pubmlst rendszerben: 3996, 3997, 3998, 3999), újonnan generált ST számot (ST 1863, ST 1864, ST 1865, ST 1866) kaptak az *A. baumannii* törzsek, azaz a vonatkozó szekvencia típust (allélszámok kombinációját) előttem még nem írták le. Az általam izolált és azonosított, környezeti eredetű *A. baumannii* törzsek és az ATCC 19606 típusú törzs szekvencia típusa



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

szerint dendrogramot készítettem (18. sz. ábra), melyen az egymáshoz viszonyított rokonsági kapcsolat figyelhető meg. A legszorosabb kapcsolat a II HT-3/1 – ST 1821, halastóból 2011-ben izolált és a JBBV – ST 1865, tisztított szennyvízből 2013-ban izolált törzs között volt, allélikus profiljuk 50%-ban megegyezett. Az *A. pittii* fajok esetében nem sikerült detektálni a *gpi* gént, így a teljes allélikus profil hiányában nem tudtam ST számot rendelni a törzsekhez. Az MLST vizsgálat eredményei és a törzsekhez tartozó ST számok a 13. sz. táblázatban láthatók.

13. sz. táblázat: Az *Acinetobacter* fajokkal végzett MLST vizsgálat eredményei

Törzs jelölése	Faj	Izolátum forrása	Allélikus profil							Szekvencia típus (ST)	Izolátumok ugyanazzal az ST számmal az MLST adatbázis (www.pubmlst.org) alapján	
			<i>gltA</i>	<i>gyrB</i>	<i>gdhB</i>	<i>recA</i>	<i>cpn60</i>	<i>gpi</i>	<i>rpoD</i>		Izolálás helye	Izolátum forrása
Sk-V/3	<i>A. baumannii</i>	felszín alatti víz	1	33	3	10	1	142	6	1180	Oroszország	n.d.
HT-4/1	<i>A. baumannii</i>	halastó, tisztított szennyvíz	1	12	3	1	4	132	26	1863*	-	-
HT-4/3	<i>A. baumannii</i>	halastó, tisztított szennyvíz	1	33	139	1	36	61	41	1864*	-	-
II HT-3/1	<i>A. baumannii</i>	halastó	1	46	100	12	36	211	6	1821	USA	állati eredetű
JBBV	<i>A. baumannii</i>	tisztított szennyvíz	1	121	40	12	4	211	6	1865*	-	-
TZSO1	<i>A. baumannii</i>	talaj	1	12	59	48	35	200	5	1866*	-	-
ATCC19606	<i>A. baumannii</i>	vizelet	1	10	8	6	1	110	14	931	Hollandia	vizelet
PM15/3	<i>A. pittii</i>	felszín alatti víz	59	151	n.d.	7	83	-	11	-	-	-
BUT-8/1	<i>A. pittii</i>	felszín alatti víz	90	9	7	5	10	-	12	-	-	-
J2	<i>A. pittii</i>	felszín alatti víz	90	9	7	5	10	-	12	-	-	-

* új ST

4.1.6 Az *A. baumannii* törzsek eredményeinek összefoglaló értékelése

Egészségügyi jelentőségére tekintettel az *A. baumannii* izolátumok humán-egészségügyi szempontból jelentős tulajdonságait (virulencia, antibiotikum rezisztencia, biofilmképzés) különös figyelemmel elemeztem az esetleges környezeti kockázatok megállapítása céljából. Az elvégzett vizsgálatok eredményeit a 5. sz. mellékletben foglaltam össze a könnyebb áttekinthetőség és kiértékelhetőség érdekében. Fontosnak tartom azonban kiemelni, hogy több, mint 400 környezeti minta feldolgozása mellett is csupán kis elemszámban (n=6) sikerült azonosítanom az *A. baumannii* faj képviselőit, így statisztikailag hiteles összefüggések megállapítására a különböző vizsgálatokban tapasztalt eredmények között nem volt lehetőségem. Az *A. baumannii* törzsek nem mutattak hemolitikus aktivitást, biofilm képző képességük hasonló volt, a *bla_{OXA-51}* gént minden törzsnél kimutattam és antibiotikum rezisztenciájuk alapján minden esetben antibiotikum érzékeny fenotípust detektáltam. Összességében elmondható, hogy a jelen munka keretében, környezeti mintákból izolált *A. baumannii* törzsek a vizsgálati eredmények alapján nem mutattak humánegészségügyi kockázatra utaló jelet, vagyis a kórházi környezetből jelentett tulajdonságok, mint az antibiotikum multirezisztencia, virulencia stb. (ALMASAUDI, 2018) a vizsgált környezeti törzsek esetében nem mutatkoztak. A jövőben javasolható, hogy antibiotikumokra érzékeny környezeti *A. baumannii* törzsek esetében megvizsgáljuk annak lehetőségét, hogy különböző környezeti hatások (pl. antibiotikumok jelentette szelektív nyomás) milyen módosulásokat eredményeznek a fenotípusos rezisztencia profilban.

4.2 A *P. aeruginosa* törzsekkel végzett vizsgálatok eredményei

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

A környezeti minták feldolgozása a 2008-2018 közötti időszakban zajlott, mely során több mint 200 felszín alatti víz, földtani közeg és komposzt mintát, valamint 92 felszíni vízmintát (6. sz. melléklet) dolgoztam fel Magyar Szabvány (MSZ 21470-77:1988) szerint *P. aeruginosa* izolálás céljából. A szabvány szerint izolált törzsek identifikációját molekuláris biológiai módszerekkel erősítettem meg. A környezeti mintákból összesen 73 törzset izoláltam és identifikáltam (6. sz. melléklet), melyek közül 64 törzs származott felszín alatti víz, földtani közeg vagy komposzt és 9 *P. aeruginosa* izolátum felszíni víz mintából. A környezeti eredetű törzseket elhelyeztem a tanszék, 2003 óta folyamatosan bővülő *P. aeruginosa* törzsgyűjteménybe, melyet fenntartok a SZIE-Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék laboratóriumában.

Vizsgálataim alapján a tanszéken folyó korábbi kutatások eredményeihez képest új tudományos információ, hogy míg a *P. aeruginosa* szénhidrogénnel szennyezett kárhelyeken, felszín alatti vízmintákban gyakran és akár humán-egészségügyi kockázatot jelentő sejt számban

azonosítható [a vizsgált környezeti minták 33,6%-ában detektálták (KASZAB, 2010)], addig az általam vizsgált, **felszíni vízminták** esetében (92 számú minta a 2010-2018 periódusban) a *P. aeruginosa* csupán a felszíni vízminták **5,4%-ában** volt kimutatható. Ugyanazon felszíni minták esetében a *Pseudomonas* nemzetség egyéb képviselői igen nagy diverzitásban voltak jelen (azonosításra került 34 faj, többek között a *Pseudomonas putida*, *P. veronii*, *P. koreensis* és *P. extremorientalis* képviselői), mely alapján kijelenthetjük, hogy **a *Pseudomonas aeruginosa* az általunk vizsgált hazai felszíni víztestekben sem gyakoriságát, sem élősejtszámát (10^0 - 10^1 CFU/ml, g) tekintve nem éri el a talaj-talajvíz rendszerben tapasztalt szintet ($\leq 10^5$ CFU/ml, g).**

Az izolált és azonosított 73 *P. aeruginosa* törzset kiegészítettem a KPS-3 humán eredetű izolátummal, így összesen 74 törzset vontam fenotípusos antibiotikum rezisztencia, hemolitikus aktivitás és a biofilm képző képesség vizsgálatába, melyek részletes eredményeit a további alfejezetekben ismertetem.

4.2.2 Antibiotikum rezisztencia vizsgálat eredményei

4.2.2.1 MIC teszt

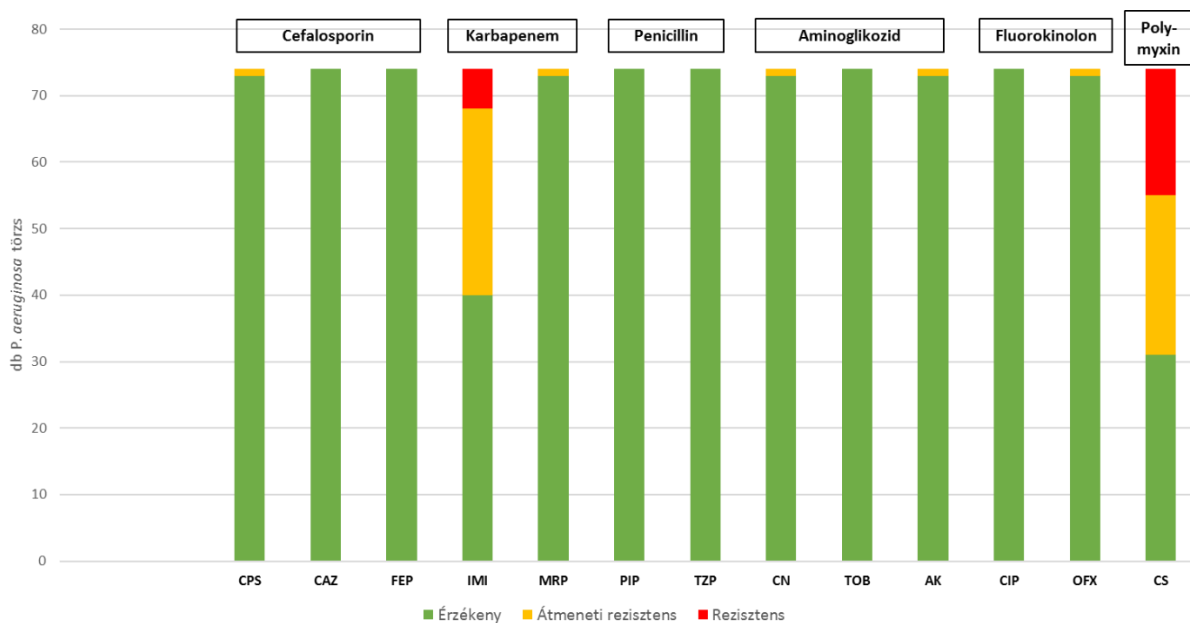
Összesen 74 *P. aeruginosa* törzs (73 környezeti, KPS-3 klinikai törzs) esetében végeztem antibiotikum rezisztencia kvantitatív megállapítására alkalmas fenotípusos tesztet, mely során 6 hatóanyagcsoport (Cefalosporin, Karbapenem, Penicillin, Aminoglikozid, Fluorokinolon, Polimixin) 11 hatóanyagát (ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem, piperacillin, gentamicin, amikacin, tobramicin, ciprofloxacín, ofloxacin, kolisztin) és 2 béta-laktamáz gátlóval kombinált hatóanyagot (cefoperazone/szulbaktám, piperacillin/tazobaktám) vizsgáltam. A 74 törzs rezisztencia tesztjeinek eredményei a 7. sz. mellékletben láthatók. A vizsgált Cefalosporin hatóanyagok közül az egyik, béta-laktamáz gátlóval kombinált szerrel (cefoperazone/szulbaktám) szemben egy törzs (P143) mutatott átmeneti rezisztenciát, az összes többi vizsgált törzs érzékeny volt a hatóanyagcsoport vizsgált hatóanyagaival szemben. A Penicillinek közül a piperacillin és béta-laktamáz gátlóval kombinált változata került a vizsgálatba, minden törzs érzékeny volt velük szemben. A Karbapenem antibiotikumok közül az imipenem és a meropenem hatását vizsgáltam. Az imipenemmel szemben 6 törzs rezisztenciát, további 28 törzs átmeneti rezisztenciát mutatott. A meropenem hatóanyaggal szemben egyetlen törzs mutatott átmeneti rezisztenciát, ami az imipenemre azonban érzékeny volt. A Fluorokinolon hatóanyagok közül (ciprofloxacín, ofloxacin) az ofloxacin esetében detektáltam átmeneti rezisztenciát egy törzsnél (P135), a többi izolátum érzékeny volt mindkét hatóanyaggal szemben. Az Aminoglikozidok közül a gentamicint, az amikacint és a tobramicint vizsgáltam, egy-egy törzs átmeneti rezisztenciát mutatott a gentamicinnel (P146) és az amikacinnal (P134) szemben, a tobramicin esetében azonban minden

törzs érzékeny volt. A kolisztinnel szemben 31 törzs érzékeny volt, míg 24 törzs átmenti rezisztenciát, 19 izolátum pedig rezisztenciát mutatott.

A környezeti eredetű (talaj, felszín alatti víz, komposzt, felszíni víz) *P. aeruginosa* törzsek antibiotikum rezisztenciájáról született korábbi publikációk alapján a ceftazidim 8,3-30%, cefotaxim 38%, ceftriaxon 50%, gentamicin 2,7-28%, imipenem és meropenem 28-33%-ban bizonyult hatástalannak (KASZAB ET AL., 2010; GHOLAMI ET AL., 2017). Ezekkel az eredményekkel összevetve megállapítható, hogy az általam izolált és vizsgált *P. aeruginosa* törzsek antibiotikum rezisztenciája elmaradt a korábban megállapított arányoktól. Rezisztenciát az imipenem és a kolisztin hatóanyaggal szemben mutattam ki, mely hatóanyagok fontos részét képezik a *P. aeruginosa* által okozott fertőzések elsődleges és alternatív kezelésének. A 73 környezeti törzs alapján az imipenem (Karbapenem) és kolisztin (Polimixin) hatóanyagokkal szemben tapasztalt rezisztencia (8,3%, 25,6%) és átmeneti rezisztencia (38,6%, 31,5%) szintje a kiemelt jelentőségű Karbapenem hatóanyag tekintetében elmarad a magyarországi klinikai viszonyok közt a Nemzeti Népegészségügyi Központ által közölt aránytól, mely az imipenem hatóanyag esetében 24% (http18). Mivel azonban a WHO „priority pathogens” listáján az első, „kritikus” kategóriában szerepel a karbapenem-rezisztens *P. aeruginosa* (http15), a hatóanyagcsoporttal szembeni rezisztencia környezeti monitoringja továbbra is indokolt a *P. aeruginosa* faj környezeti kockázatainak megítéléséhez. A kolisztin rezisztencia klinikai kiterjedtségére vonatkozóan nincsenek hazai adatok, nemzetközi források alapján azonban elmondható, hogy az általunk mért környezeti rezisztencia (25,6%) kiemelkedően magasnak számít a klinikai értékekhez képest. Goli és munkatársai nozokomiális törzsek esetében a kolisztin rezisztens izolátumok arányát 2%-ban állapították meg, melyet aggasztó mértékűnek értékelték és kialakulásáért az aktív efflux pumpa túlműködését tették felelőssé (GOLI ET AL., 2016). Az általam megállapított, **kiterjedt környezeti kolisztin rezisztencia ennek fényében környezetbiztonsági szempontból kifejezetten aggasztó jelenség**, okainak feltárása, a közreműködő rezisztencia-mechanizmusok azonosítása pedig mind tudományos, mind a gyakorlati környezetvédelem szempontjából fontos és indokolt feladat.

Multirezisztencia szempontjából elmondható, hogy az általam vizsgált törzsgyűjtemény tagjai között multirezisztens izolátum nem volt. Korábbi vizsgálataink alapján (KASZAB ET AL., 2010) a multirezisztencia nem ismeretlen jelenség a környezetben, ám saját vizsgálati eredményeimmel kiegészítve elmondható, hogy jelenlegi ismereteink szerint a környezeti multirezisztencia szintje nem éri el az európai kórházakból regisztrált, 10,6%-ra tehető arányt (ECDC, 2017).

A kísérletbe vont hatóanyagokkal szemben rezisztens, átmeneti rezisztens és érzékeny törzsek eloszlását a 19. sz. ábra mutatja.

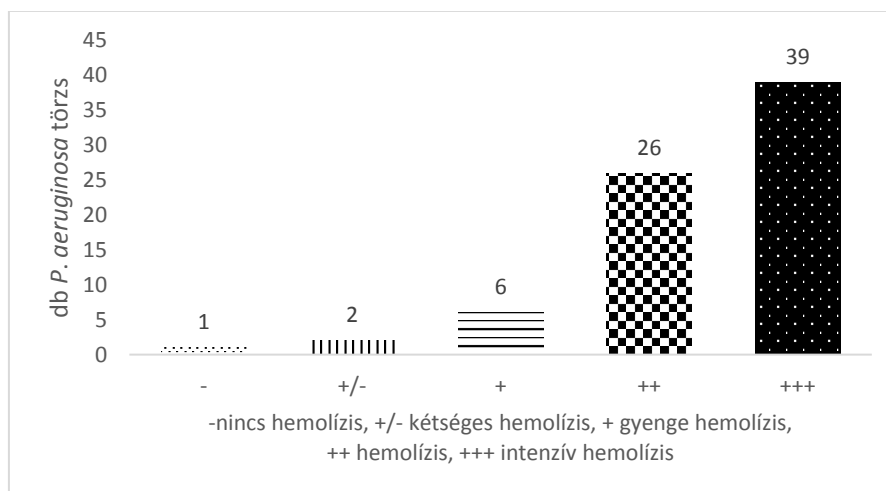


19. sz. ábra: A vizsgált hatóanyagokkal szemben rezisztens, átmeneti rezisztens és érzékeny *Pseudomonas aeruginosa* törzsek száma (n=74)

CPS-cefoperazone/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

4.2.3 A hemolitikus aktivitás vizsgálatának eredményei

A hemolitikus aktivitás vizsgálata során a kísérletbe vont *P. aeruginosa* törzsek közül minden izolátum növekedést mutatott a birkavérrel kiegészített agaron. Különböző mértékű béta hemolízist a P156-os törzs kivételével minden esetben megfigyeltem. 39 törzsnél (az izolátumok 52,7%-ánál) intenzív béta hemolízist (+++) detektáltam. További 26 törzs hemolizált (++) azaz összesen a vizsgált törzsek 87,8%-a mutatott változó intenzitású hemolízist. A többi izolátum gyenge (+) vagy kétséges (-/+) hemolitikus aktivitást mutatott. A hemolitikus aktivitás vizsgálatának eredményei a 7. sz. mellékletben és a 20. sz. ábrán láthatók.

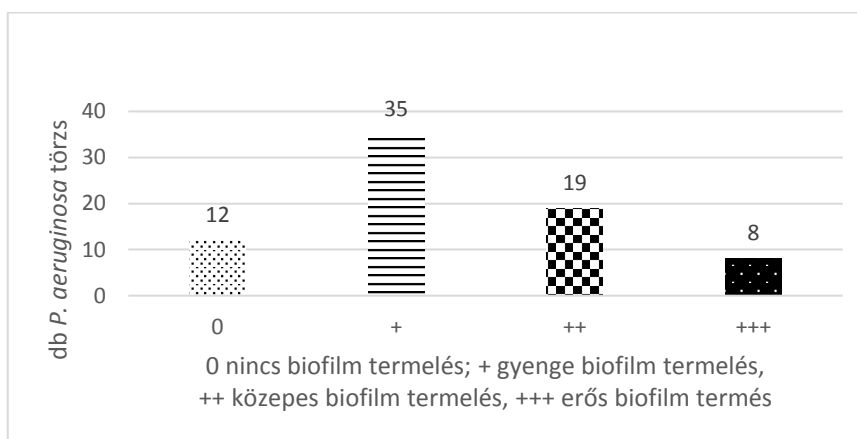


20. sz. ábra: A hemolitikus aktivitás vizsgálat eredményei a kísérletbe vont 74 *P. aeruginosa* törzs esetében

A hemolitikus aktivitás, mint közvetlen virulencia faktor megítélése a *P. aeruginosa* esetében jelenleg kétséges: a hemolizáló törzsek esetében a tényleges virulencia feltételezhető, ám a nem-hemolizáló törzsek esetében sem kizárható, hogy képesek betegség kiváltására. Vizsgálataimat ezért 46 törzs esetében további virulencia faktorok vizsgálatával, valamint *G. mellonella* virulencia teszttel egészítettem ki, melyek bemutatására a 4.2.5.2 alfejezetben térek ki.

4.2.4 A biofilm képző képesség vizsgálatának eredményei

74 *P. aeruginosa* törzs esetében vizsgáltam biofilm képző képességet mikrotiter lemezes módszer segítségével. A különböző inkubációs idők (24h, 48h, 72h, 96h) elteltével mért eredmények igen nagy eltéréseket mutattak. Szakirodalmi ajánlások (DUUREN ET AL., 2017) szerint a 48 órás leolvasást vettem alapul, ahol a vizsgált törzsek 10,8%-a mutatott erős biofilm képzést. A törzsek eloszlását a biofilm termelés erőssége szerint a 21. sz. ábra mutatja be. A P127, P130, P136, P137 és P186 jelölésű törzsek minden mérési pontban erős vagy közepes biofilm képző képességgel rendelkeztek. A mikroplate módszerrel végzett biofilm vizsgálat eredményeit a 7. sz. melléklet tartalmazza, a mérés háttéradatait elektronikus melléklet formájában ismertetem.



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

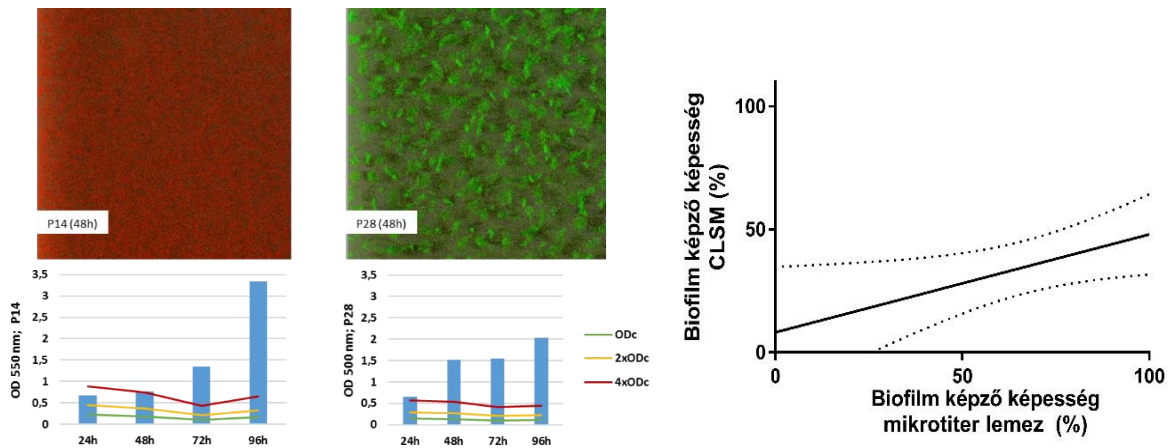
A kutatásom során tapasztalt eredmények alapján a környezeti törzsek 10,8%-a mutatott erős biofilm képzést. A szakirodalom áttekintése alapján elmondható, hogy azonos módszerrel vizsgált, különböző forrásokból származó *P. aeruginosa* izolátumok (állati eredetű n=121, humán eredetű n=81) közül az állati eredetű törzsek 9%-át, míg a humán eredetű törzsek 23,5%-át sorolták erős biofilm képző csoportba (MILIVOJEVIC ET AL., 2018). Ezek alapján az általam vizsgált környezeti törzsek biofilm képző képességük alapján inkább az állati eredetű törzsekkel mutatnak hasonlóságot.

4.2.5 *P. aeruginosa* törzsekkel végzett komplex vizsgálati kör eredményei

A továbbiakban bemutatott egyes vizsgálatokba (biofilm képző képesség, virulencia gének, szerotipizálás, motilitás, virulencia *Galleria mellonella* modellen, MLST, PFGE) 46 *P. aeruginosa* törzset vontam be - a tanszéki, teljes, körülbelül 200 tagot számláló törzsgyűjteményből - különböző antibiotikum rezisztencia profiljuk, származási helyük és idejük szerint. A kiválasztott törzsekből 44 izolátum környezeti eredetű volt (melyből 11 törzs részét képezte az általam izolált 73 törzsnek, 33 további törzset a tanszéken korábban helyeztek a gyűjteménybe), 2 törzs pedig klinikai környezetből származott (ATCC 27853 referenciatörzs és KPS-3 kórházi izolátum). A vizsgálatokba vont törzsek származási adatai és rezisztenciát mutató törzsek jelölése a 8. sz. mellékletben látható. A következőkben bemutatott eredmények alapján megkíséreltem komplex értékelést adni a különböző területekről származó, környezeti eredetű *P. aeruginosa* izolátumokról, melyek segíthetnek a klinikai környezetben kívüli törzsek kockázatának megítélésében.

4.2.5.1 Biofilm képző képesség vizsgálatának eredményei – mikrotiter lemezes módszer és konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével

A 4.2.4 alfejezetben bemutatott, 74 *P. aeruginosa* törzs esetében elvégzett mikrotiter lemezes adhéziós vizsgálat mellett 46 *P. aeruginosa* törzs esetében lehetőségem nyílt a biofilm képző képesség konfokális lézer pásztázó mikroszkóp (CLSM) segítségével történő vizsgálatára is. A 46 törzs mindegyike esetében (tehát a nem általam izolált törzsekre nézve is) én végeztem el a biofilm képző képesség mikrotiter lemezes vizsgálatát, mivel ilyen vizsgálati irány korábban a tanszéken nem volt. A vizsgálati eredményeket a 9. sz. melléklet foglalja össze, illetve a konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készült felvételeket elektronikus mellékletben adom közre). A mikrotiter lemezen a már bemutatott módon és eredménnyel a visszaoldott sejtek denzitását mértem, míg a konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készült képek az izolátumok vizuálisan detektálható élő/holt sejteket, illetve a formálódó biofilm struktúráját ábrázolták. Az eredmények összevetése alapján arra jutottam, hogy a mikrotiter lemezeken kialakuló és a festést követően visszamérhető sejtömeg nem minden esetben jelent biofilm képződést. Néhány esetben csak a planktonikus sejtek felhalmozódását detektáltam biofilm képződésként, mely jelenséget a 22. 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.



22. 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, illetve az egyszempontos varianciaanalízis alapján mutatott korreláció a mikrotiter lemezes módszer és a konfokális lézer pásztázó mikroszkóp között

A két módszer eredményeit statisztikailag is összehasonlítottam a GraphPad Prism (v.7.00) program segítségével, mely során egyszempontos varianciaanalízist (one way ANOVA) futtattam és azt tapasztaltam, hogy szignifikáns a korreláció a két biofilm vizsgálati módszer között (21. sz. ábra), de a szórás lebontva igen nagy. Az adatok részletes elemzése alapján megállapítottam, hogy a mikrotiter módszer fals negatív eredményt nem ad, azaz, ha a mikrotiter lemezen nincs biofilm képződés, akkor vizuálisan is negatív az eredmény. Pozitív irányban azonban több esetben fals pozitív eredményt tapasztaltam (44/14 fals pozitív, azaz 31,8%-ban tévedett a mikrotiter lemezes módszer). A téves detektálások minden esetben, azaz 100%-ban holt planktonikus sejtek felhalmozódásából adódtak. A vizuális értékelés eredményeinek részletes áttekintése alapján megállapítottam, hogy a CLSM esetében a téves pozitív/negatív eredmény lehetősége gyakorlatilag kizárt. **Eredményeim tükrében a jövőben érdemes a biofilm képződés vizsgálatára irányuló mikrotiter lemezes vizsgálatokat és a konfokális lézer pásztázó mikroszkóp módszerét együttesen alkalmazni a megbízható eredmény érdekében.**

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY:

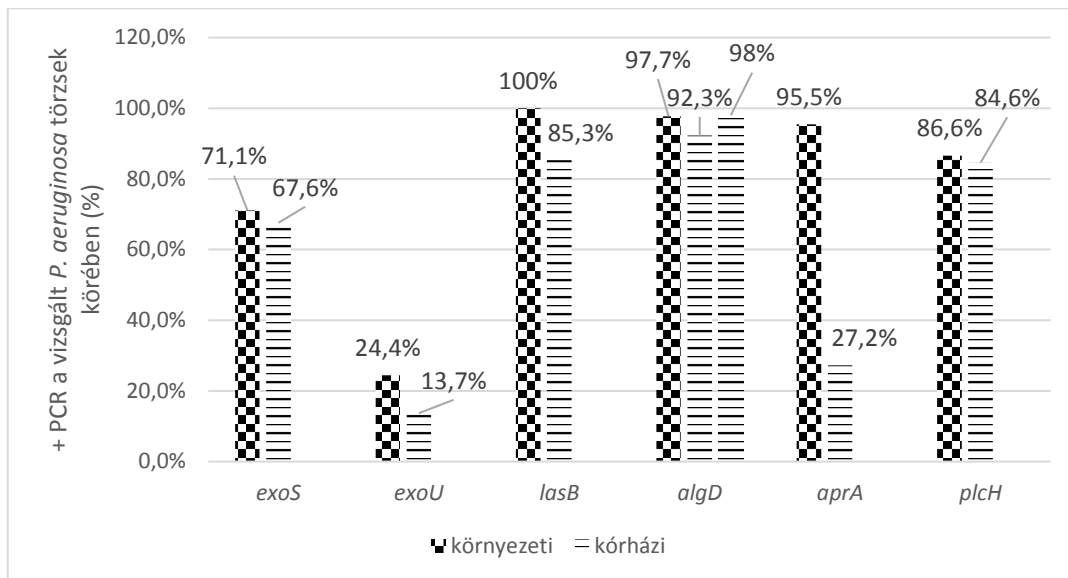
III. tézis: A környezeti *P. aeruginosa* törzsek mikrotiter lemezes módszerrel mért biofilm képző képessége a konfokális lézer pásztázó mikroszkópos felvételek szerint nem minden esetben strukturált biofilm, az esetek 31,8%-ában csupán a holt planktonikus sejtek felhalmozódása.

4.2.5.2 A virulencia gének vizsgálatának eredményei

Munkám során 45 *P. aeruginosa* törzs [a törzsfenntartás során egy izolátum (P77) nem növekedett tovább] esetében vizsgáltam az *exoS*, *exoU* exoenzimek, valamint a *lasB*, *algD*, *aprA* és *plcH* virulenciával összefüggésben lévő gének jelenlétét. A vizsgált gének kimutathatóságának

százalékos aránya a 23. sz. ábrán, a gének kimutatásához alkalmazott PCR termékeiről készült felvételek a 10. sz. mellékletben, a részletes eredmények a 11. sz. mellékletben láthatók.

32 törzsnél (71,1%) detektáltam az *exoS* gént, ami közel azonos (67,6%) a kórházi környezetben kimutatott aránnyal (FAZELI&MOMTAZ, 2014), míg az *exoU* csupán 11 izolátum (24,4%) esetében volt kimutatható, ami valamivel magasabb arányt mutat a klinikai környezetben tapasztaltakkal (13,7%) (FAZELI&MOMTAZ, 2014). A P108 és P135 jelölésű törzseknél egyik gént sem tudtam kimutatni, a két génszakasz egyidejűleg pedig egyetlen törzs genetikai állományában sem volt detektálható, mely összhangban áll Shaver és munkatársai megállapításával, miszerint a két génszakasz klinikai viszonyok között is csupán kivételes esetben detektálható egyszerre a *P. aeruginosa* genomjában (SHAVER&HAUSER, 2004). A *lasB* gén, mely a *P. aeruginosa* elasztáz termelődését kódolja, jelentős szerepet játszik a kolonizációban és infekcióban, szerepét elsősorban a tüdőt érintő fertőzéseknél írták le (TÜMMLER&KIEWITZ, 1999), minden vizsgált környezeti törzsnél (100%) kimutatható volt. Égési sérültek esetében 2018-as adatok alapján a *lasB* gén kimutatási gyakorisága 85,3% (ROSHANI-ASL ET AL., 2018) mely alapján megállapítható, hogy ez a virulenciában igazoltan szerepet játszó gén a környezetben a klinikai gyakoriságot meghaladó arányban detektálható. Míg azonban Roshani és munkatársai összefüggést találtak a *lasB* gén hiánya és a csökkent biofilm képző képesség, valamint az imipenem, piperacillin/tazobaktám érzékenység között, addig én ezeket a fenotípusokat a *lasB* gént hordozó környezeti törzsek körén belül detektáltam. Környezeti viszonyok között tehát a *lasB* gén jelenlétében is változatos biofilm képző és antibiotikum érzékeny fenotípusok jelentkezhetnek, mely a gén környezeti viszonyok közötti szerepének tisztázását igényli a jövőben. Eredményeim alapján az *algD* gén, mely az immunrendszerrel szembeni ellenállásért felelős alginát termelést szabályozza, 44 esetben (97,7%) volt kimutatható, mely gyakorlatilag megegyezik a klinikai viszonyok között mért gyakoriságokkal (92,3-98%) (GEORGESCU ET AL., 2016; TAE ET AL., 2014). Az *algD* expressziója ugyanakkor nagyban függ a környezeti feltételektől (limitált szén, nitrogén, foszfát és oxigén-koncentráció) (BÉATRICE ET AL., 2005), így a gén tényleges környezeti viszonyok közötti kifejeződésének vizsgálata indokolt lehet a jövőben. Az *aprA* génszakasz, mely a komplementrendszer aktiválódását gátló alkalikus proteáz (AprA) termelődéséért felel, 43 izolátumnál (95,5%) volt kimutatható, míg ugyanez az arány kórházi törzseknél mindössze 27,2% volt (HASSUNA, 2016). A jövőben érdemes tisztázni, hogy környezeti feltételek mellett milyen egyéb előnyt jelenthet a génszakasz jelenléte, illetve a génexpresszió. A *plcH* génszakasz 39 *P. aeruginosa* esetében (86,6%) került detektálásra, míg a gén klinikai gyakoriságára vonatkozó arány (84,6%) gyakorlatilag ezzel megegyező (GEORGESCU ET AL., 2016).



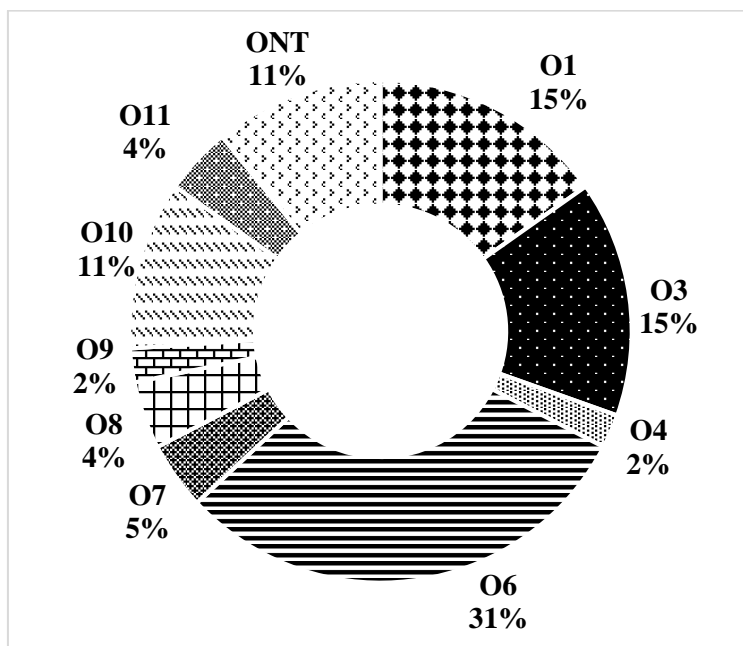
23. sz. ábra: A vizsgált, környezeti *P. aeruginosa* törzsek körében kimutatott virulencia gének százalékos aránya (n=45) és a klinikai környezetben tapasztalt kimutatási arány (FAZELI&MOMTAZ, 2014; ROSHANI-ASL ET AL., 2018; GEORGESCU ET AL., 2016; TAE ET AL., 2014; HASSUNA, 2016)

A *plcH* a hemolitikus aktivitásban szerepet játszó foszfolipáz C kódolásáért felelős, ám eredményeim alapján a génszakasz jelenléte vagy hiánya nem volt szignifikáns összefüggésben a Columbia véragaron fenotípusosan tapasztalt béta-hemolízissel, melynek oka lehet, hogy a szakirodalmi adatok alapján a hemolitikus aktivitásban szerepet játszhatnak egyéb faktorok (ExoU, exotoxin A, elasztáz) is (LEE ET AL., 2006). Ez az eredmény is jelzi, hogy **egy virulencia gén jelenléte, vagy hiánya nem feltétlenül áll összefüggésben a fenotípusosan megnyilvánuló citolitikus hatásokkal.**

A virulencia gének gyakoriságára vonatkozó eredményeim alapján az *algD* és *aprA* génszakaszok jelenléte a környezeti törzsek vonatkozásában általánosnak tekinthető. Ez az eredmény jelzésértékű arra vonatkozóan, hogy egyes humán-egészségügyi kockázatra utaló faktorok a környezeti törzsek esetében akár a klinikai körülmények között tapasztaltnál nagyobb gyakorisággal is detektálhatók, azaz a környezeti izolátumok virulencia arzenálja a klinikai törzsekhez hasonlóan kiterjedt lehet, azonban említést érdemel, hogy klinikai viszonyok közt a vizsgált mintaszám és az egyes osztályok (intenzív, égési sérült stb.) között nagy eltérések lehetnek. Például középfülgyulladásban szenvedő betegekből izolált törzsek (n=28) között az *algD* gén az esetek 75%-ában volt pozitív (ABDULLAH AL-SHWAIKH ET AL., 2017), míg egy intenzív osztályról származó törzsgyűjtemény (n=184) körében folytatott kutatás az *aprA* gént 100%-ban mutatta ki (BRADBURY ET AL., 2010). Égési osztályon végzett vizsgálat eredményeként 14, férfi betegből és 12, női betegből származó izolátum esetében *aprA* gént 4 (28,6%), illetve 3 (25%), míg *algD* gént 2 (14,3%) és 3 (25%) alkalommal azonosítottak (FAZELI&MOMTAZ, 2014).

4.2.5.3 A szerotipizálás eredményei

46 *P. aeruginosa* törzset szerotipizáltam, melynek eredményeként 10 különböző szerocsoportba soroltam vizsgált környezeti izolátumainkat. A környezeti izolátumok körében 31% aránnyal egyértelműen az O6 szerocsoport dominált, azonban dominanciája elmaradt a korábban tengeri környezetben mért 95,8%-os aránytól (BOUHADDIOUI ET AL., 2002). Az O11-et, mint az irodalmi adatok alapján a környezetben szintén elterjedt szerotípust (TASSIOSS ET AL., 1998) mindössze két esetben mutattam ki. Összesen négy, a szakirodalom alapján jelentős, klinikailag is fontos szerotípust találtam a környezeti izolátumok körében (O1-15%, O6-31%, O10-11%, O11-4%) és további 6, a rendelkezésre álló információk alapján klinikailag nem releváns szerotípust azonosítottam (O3, O4, O7, O8, O9). A klinikai környezetben többször azonosított O5 szerotípus (RAVAOARINORO ET AL., 1996; ESTAHBANATI ET AL., 2002) környezeti törzseim körében nem került kimutatásra. A törzsek 11%-a többszöri próbálkozás ellenére sem volt sikerrel tipizálható (ONT). A vizsgált törzsek szerocsoportok szerinti eloszlását a 24. sz. ábrán mutatom be, a részletes eredmények a 11. sz mellékletben láthatók.

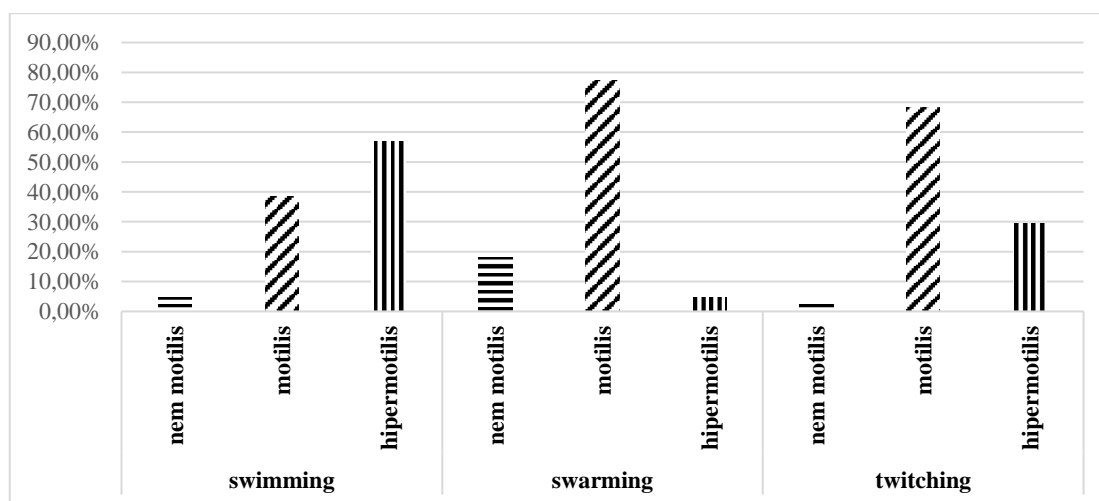


24. sz. ábra: A szerocsoportok előfordulásának százalékos megoszlása a vizsgált környezeti *P. aeruginosa* törzsek körében (n=46)

Az eredmények alapján elmondható, hogy a szakirodalmi adatokkal (LU ET AL., 2014) ellentétben nem találtam összefüggést az *exoU* génszakasz jelenléte és az O11, valamint az *exoU* hiánya és az O6 szerocsoport között, azaz környezeti viszonyok között a szerocsoport és a virulencia génkészlet a klinikai eredményekkel ellentétben nem mutat egyértelmű összefüggést. A környezeti izolátumok számának további növelésével ez az előzetes eredmény a későbbiekben megerősítést nyerhet.

4.2.5.4 A motilitás vizsgálatának eredményei

A motilitást 44 környezeti *P. aeruginosa* izolátummal három kategóriában („swimming, swarming, twitching”) vizsgáltam. A folyékony táplevesben végzett „swimming” kísérlet során 2 törzs nem volt motilis, 17 törzs a „közepesen motilis” kategóriába került, míg a fennmaradó 25 törzs eredményei a „hipermotilis” csoportba tartoztak. A félfolyékony közegben tesztelt „swarming” vizsgálata során 8 törzs nem volt motilis, 34 törzs rendelkezett motilis képességekkel és csupán 2 izolátum került a hipermotilis kategóriába. A szilárd táptalajon végzett „twitching” vizsgálata során 1 törzs volt mozgásra képtelen, 30 izolátum rendelkezett valamilyen motilis képességgel és 13 törzs a hipermotilis csoportba került. Összességében elmondható, hogy a legtöbb törzs (97,7%) szilárd közegben (twitching) mutatott valamilyen mozgást (motilis, hipermotilis), ezt követte a folyékony közegben mozgásra képes törzsek aránya (95,5%), majd a félfolyékony környezetben mutatott motilitás (81,8%). Hipermotilis izolátumokat legnagyobb arányban (56,8%) a swimming során figyeltem meg, ezt követte a twitching, azaz a szilárd táptalajon hipermotilis törzsek száma (29,5%). A félfolyékony közegben csupán az izolátumok 4,5%-a volt képes a kontrollnál dinamikusabb mozgásra. Minden vizsgált törzs legalább egy típusát mutatta a motilitásnak, a P114 jelölésű, komposztból származó izolátum pedig minden motilitás formában hipermotilisnak bizonyult. A különböző szilárdságú közegekben megfigyelt törzsek mozgásának eloszlása és százalékos aránya a 25. sz. ábrán, a részletes eredmények a 11. és 12. mellékletben láthatók.

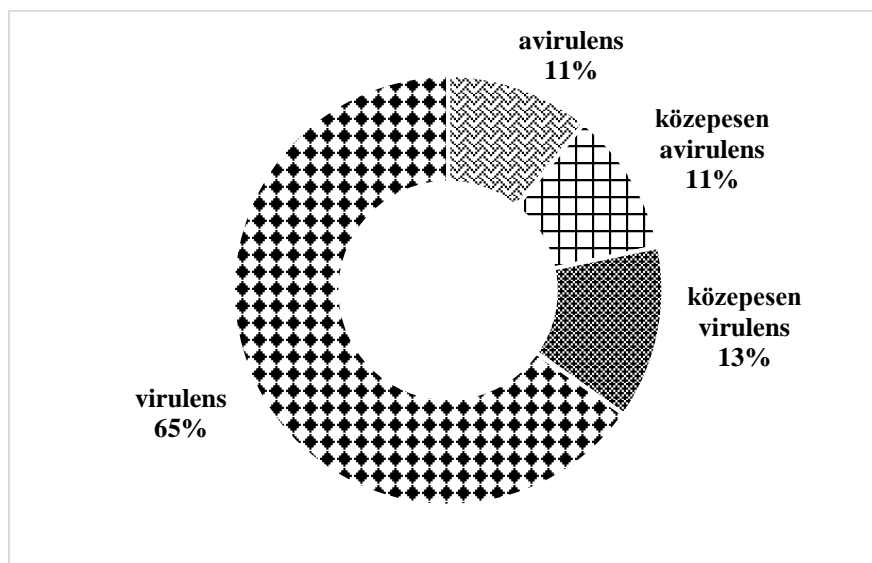


25. sz. ábra: A környezeti *P. aeruginosa* törzsek motilitás vizsgálatának eredményei százalékos eloszlásban (n=44)

Mivel a motilitás vizsgálatoknál a kategóriák kialakításának alapja egy ismert klinikai referencia törzzsel (PA14) való összevetés volt, elmondható, hogy a környezeti törzsek jelentős hányada a vizsgált motilitási formákban elérte, vagy meghaladta a klinikai izolátumra jellemző szintet, azaz a **virulenciával szorosan összefüggő motilitás a környezeti törzsek vonatkozásában is kiterjedt és fenotípusosan igazolt tulajdonságnak tekinthető.**

4.2.5.5 A *Galleria mellonella* nagy viaszmony teszt eredményei

46 *P. aeruginosa* izolátummal végeztem virulencia tesztet a *Galleria mellonella*, nagy viaszmony lárváinak felhasználásával. A vizsgált törzsek 11%-a avirulensnek (0-25% mortalitás), további 11%-a közepesen avirulensnek (25-50% mortalitás), 13%-a közepesen virulensnek (50-75% mortalitás) bizonyult a tesztben, míg 65%-uk a virulens csoportba került az eredmények kiértékelése után, azaz esetükben a tesztorganizmusok 75-100%-át pusztította el 48 óra elteltével (26. sz. ábra). A *G. mellonella* virulencia teszt részletes eredményeit a 11. és 13. sz mellékletben ismertetem.



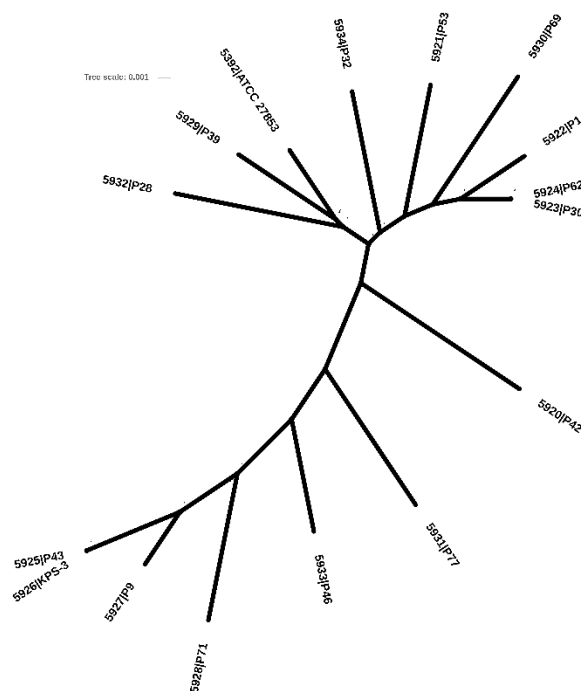
26. sz. ábra: A *G. mellonella* modellszervezeten vizsgált virulencia eredmények megoszlása a *P. aeruginosa* törzsek körében (n=46)

A *G. mellonella* modellen mutatott virulencia szakirodalmi adatok alapján jelentősen eltérhet egyéb, virulenciát vizsgáló tesztorganizmektól, mint például az egér kísérlet vagy a *Caenorhabditis elegans* (fonálféreg) teszt, melyek gazda-specifikus virulencia faktorok kimutatására alkalmasak, mint például a *ybtQ* gén hiánya, ami a sziderofor termeléssel homológ ABC transzporter fehérje a *Yersinia pestis* kórokozóban (CHOI ET AL., 2005). A szakirodalomban jelenleg nincs konszenzus a *G. mellonella* teszt eredményeinek extrapolálhatóságát illetően: egyes források korlátozottan extrapolálhatónak tartják gerincesekre vagy emberi szervezetre nézve (DUBERN ET AL., 2015), más források igazolták az egérikísérletek és a *G. mellonella* teszt közötti pozitív korrelációt (JANDER ET AL., 2000). Eredményeim alapján, valamint az etikai és az állatkísérletekre vonatkozó szempontok figyelembevételével a *G. mellonella* teszt a *P. aeruginosa* ökológiai hatásainak vizsgálatára kétséget kizáróan, a humán egészségügyi hatásokat figyelembe véve pedig korlátozottan, elővizsgálatként alkalmas lehet.

4.2.5.6 Az MLST módszer eredményei

14 környezeti és 2 humán eredetű mintából származó *P. aeruginosa* törzset vontam az MLST vizsgálatokba, melyek különböző antibiotikum rezisztencia profillal rendelkeztek és eltérő földrajzi helyekről származtak. 12 izolátumhoz korábban már adatbázisban szereplő, 4 törzshöz (P14, P32, P39, P46) 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. A CF-es izolátumok földrajzilag igen különböző területekről származtak: Európából az Egyesült Királyság, Hollandia és Franciaország, továbbá Ausztrália és az amerikai földrészről Kanada volt megjelölve származási helyként (lásd 14. sz. táblázat). Az ST szám egyezés szoros genetikai kapcsolatra utal, az azonos ST számmal rendelkező törzsek ugyanazon klónnak tekinthetők, míg az allélikus profil hét számából öt (szigorúbb megkötések szerint hat) egyezése ugyanazon klonális komplexhez tartozást jelez (LIBISCH, 2013). Ezek alapján az azonos ST számmal rendelkező törzsek feltételezhetően hasonló humán- és környezetegészségügyi kockázattal bírnak.

A P30 és P62 törzseink, melyeket két év eltéréssel Magyarország különböző pontjairól, szénhidrogénnel szennyezett mintákból származnak, azonos ST számot kaptak - ugyanazt, melyet korábban CF betegből tenyésztett mintához is hozzárendeltek. A P43 környezeti, és a KPS-3 emberi sebből izolált törzs szintén azonos ST számon osztoztak, ehhez az azonosítóhoz korábban rendelt izolátumok között előfordult CF, víz- és talajmintából izolált *P. aeruginosa* is. Az adatbázisban lévő környezeti és CF mintákhoz köthető törzsek 7,3%-a tartozik az ST 253-as szekvencia típushoz, mely ezzel a leggyakoribb szekvenciatípus ezeken a csoportokon belül és kapcsolatban van a PA14-es klonális komplexszel, ami nagy kockázattal járó, gyakran multirezisztens klónokat foglal magában. Nem azonosítottam ugyanakkor a hazai, klinikai környezetben leírt, négy, multirezisztenciához köthető klonális komplex (CC4, CC11, valamint az ST175 és ST395 őstípushoz köthető klonális vonalak) egyikét sem (LIBISCH ET AL., 2009; LIBISCH, 2013), mely jelzi, hogy a nozokomiális



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

és környezeti törzsek hazai viszonyok között egymástól jól elkülönülő filogenetikai csoportokat alkotnak. Ezzel ellentétben a környezeti és CF eredetű izolátumok között feltételezhető egy szorosabb filogenetikai kapcsolat, melyet igazol, hogy a leggyakoribb környezeti és CF szekvenciatípusok azonosak, globálisan elterjedtek és mindkét csoporton belül nagy gyakorisággal kerülnek kimutatásra. Az MLST vizsgálatok eredményei és a törzseket ábrázoló filogenetikai törzsfá a 14. sz. táblázatban és 27. sz. ábrán láthatók.

14. sz. táblázat: A *P. aeruginosa* törzsekkel végzett MLST vizsgálat eredményei az MLST törzsfán elfoglalt pozíció szerinti sorrendben

Törzs jelölése	Izolátum forrása	Allélikus profil								Szekvencia típus (ST)	Izolátumok ugyanazzal az ST számmal az MLST adatbázis (www.pubmlst.org) alapján	
		acsA	arcE	guaA	mutL	nuoD	ppsA	trpE	Izolálás helye		Izolátum forrása	
P28	talaj	17	2	11	70	3	7	19	251	Egyesült Királyság	CF beteg	
ATCC 27853	emberi vér	28	5	36	3	3	13	7	155	Ausztrália	CF beteg	
P39	felszín alatti víz	39	28	45	3	1	3	7	2593 *	-	-	
P32	felszín alatti víz	16	5	6	2	3	4	60	2598 *	-	-	
P53	felszín alatti víz	11	5	83	2	4	13	7	575	Hollandia	CF beteg	
P69*	felszín alatti víz	6	68	20	11	4	4	7	439	Franciaország	CF beteg	
P14	felszín alatti víz	11	5	26	5	3	40	7	2586 *	-	-	
P30	felszín alatti víz	11	5	11	11	3	27	7	198	Kanada	CF beteg	
P62	felszín alatti víz	11	5	11	11	3	27	7				
P42	talaj	28	88	1	21	3	53	7	521	Hollandia	CF beteg	
P77	felszín alatti víz	6	14	12	11	1	4	20	455	Ausztrália Franciaország	CF beteg víz	
P46	felszín alatti víz	11	17	11	18	3	4	3	2597 *	-	-	
P71	felszín alatti víz	38	8	5	67	2	40	13	971	n.d.	n.d.	
P9	felszín alatti víz	103	8	5	5	1	6	4	377	Ausztrália	CF beteg	
P43	felszín alatti víz	4	4	16	12	1	6	3	253	Ausztrália Franciaország Egyesült Királyság	CF beteg víz talaj	
KPS-3	emberi seb	4	4	16	12	1	6	3				

*ÚJ ST

n.d. - nincs adat

4.2.5.7 A PFGE vizsgálat eredményei

A 44 környezeti törzs PFGE tipizálásának eredményeképpen generált dendrogram a törzsek „ujjlenyomatát” tartalmazó gélképek értékelésével jött létre és a törzsek egymáshoz viszonyított kapcsolatát mutatja be (11. sz melléklet). A Nemzeti Népegészségügyi Központ adatbázisa továbbá lehetőséget adott a környezeti törzsek genetikai „ujjlenyomatának”

összehasonlítására klinikumból azonosított *P. aeruginosa* izolátumokkal. A továbbiakban az OEK szakértő munkatársai által átadott adatok részletes értékelését mutatom be. A PFGE genotipizálási vizsgálatba vont környezeti törzsek pulse-field típusának 40,9%-a nem mutatott kapcsolatot sem egymással, sem az adatbázisban szereplő kórházi izolátumokkal (85% alatti homológia), így a besorolás szerint sporadikus (egyedi) törzseknek számítanak. 3 törzs (P16, P80, P174) PFGE profilja 84-88% homológiát mutatott korábban hazai viszonyok között azonosított klinikai izolátumokéval, azonban ezek az egyezések nem feleltek meg a Tenover-féle kritériumoknak (TENOVER ET AL., 1995). 5 környezeti törzs, a P59, P119, P124, P125 és a P172 85-95% közötti homológiát mutatott magyarországi klinikai izolátumokkal, mely találkozott a Tenover kritériumokkal is, így a törzsek közös eredete feltételezhető. 95% felett egyik környezeti izolátum sem mutatott homológiát kórházi törzsszel, azonban a vizsgált környezeti izolátumaink egymással több alkalommal is 95% felett egyeztek. A P66, P78, P77 és P106-os törzs azonos PFGE típusba tartozott, továbbá a P79 és P46, a P42 és P60, a P113 és P169, a P14 és P18, a P62 és P30, illetve a P119 és P125 szintén egy típusba tartozott. Mindezek alapján elmondható, hogy a PFGE módszer környezeti izolátumok esetében is 100% hatékonysággal alkalmazható tipizálási eljárás, melynek felbontása részletesebb, mint az MLST módszeré.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY:

IV. tézis: A környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek filogenetikai (MLST, PFGE) vizsgálata alapján először mutattam ki Magyarország területéről származó környezeti törzsek és a világ különböző pontjain regisztrált, cisztás fibrózishoz köthető, valamint hazai, nozokomiális fertőzésekből izolált törzsek között rokonsági kapcsolatot.

Az eredményeket nemzetközi publikációban adtam közre.

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

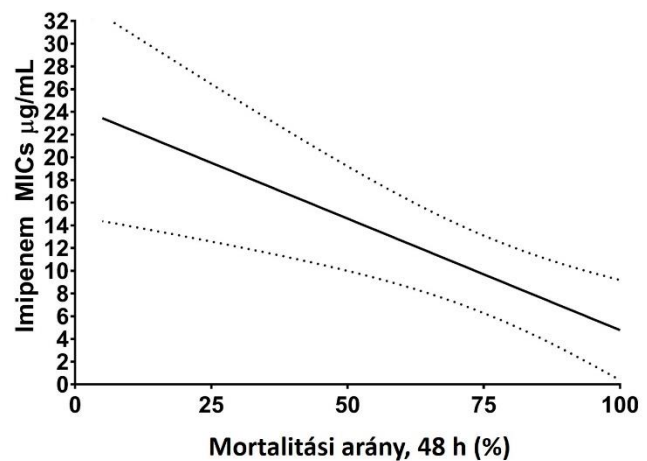
4.2.5.8 *P. aeruginosa* törzsek eredményeinek összehasonlító értékelése

A szakirodalmi adatok áttekintése alapján a környezeti eredetű baktériumtörzsek esetében az antibiotikum rezisztencia, virulencia és biofilm képző képesség tulajdonságok összefüggéseiről jelenleg elenyésző mennyiségű adat áll rendelkezésre. Klinikai viszonyok között is csupán feltevések vannak arra vonatkozóan, hogy az egyes tulajdonságok szabályozása és transzmissziója milyen kapcsolatrendszerben áll (SCHROEDER ET AL., 2017). Munkám során ezért célul tűztem ki az előző fejezetekben ismertetett vizsgálati eredmények komplex, statisztikai alapokon nyugvó értékelését, összevetését. Ehhez 44 környezeti eredetű és 2 klinikai környezetből származó,

referencia törzs vizsgálati eredményeit használtam fel (antibiotikum rezisztencia, hemolitikus aktivitás, biofilm képző képesség, virulencia gének, szerotipizálás, motilitás, virulencia *G. mellonella* modellen, PFGE-11. sz. melléklet). Az alábbi alfejezetekben a bizonyos eredmények közti összefüggéseket szeretném elemezni, melyhez Pearson-féle korrelációs együtthatót is számoltam 95%-os konfidencia intervallum mellett a GraphPad Prism (v.7.00) program segítségével.

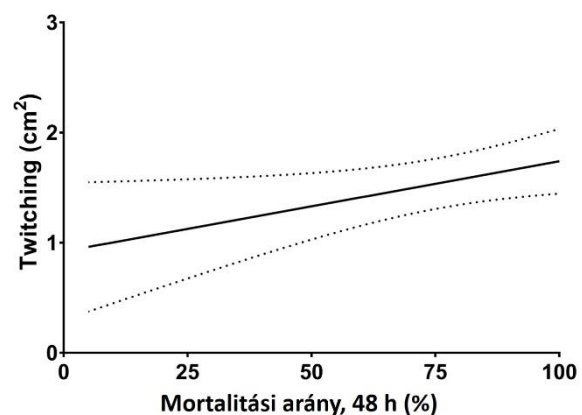
4.2.5.8.1 Az antibiotikum rezisztencia és a *Galleria mellonella* testben mutatott virulencia összefüggései (n=46)

A statisztikai értékelés alapján a környezeti törzsek öt különböző antibiotikummal szembeni (gentamicin, imipenem, cefepim, ceftazidim, cefoperazone-szulbaktám) rezisztenciája mutatott szignifikáns, negatív előjelű (inverz) korrelációt a *G. mellonella* test során tapasztalt virulenciával. Tehát a magasabb minimális gátló koncentráció (fokozódó rezisztencia), alacsonyabb letalitáshoz vezetett az *in vivo* kísérlet során (28. sz. ábra). Az antibiotikum rezisztencia és a virulencia közötti pozitív



28. sz. ábra: A vizsgált *P. aeruginosa* törzsek imipenemmel szemben mutatott rezisztenciája és a *G. mellonella* testben mutatott virulencia közti összefüggés

(NEIDIG ET AL., 2013) és negatív (BARTOLI ET AL., 2015) előjelű összefüggésekről korábban egyaránt születettek publikációk, de a klinikai törzsek esetében a negatív előjelű kapcsolatot túlhaladottnak tartják, hiszen a noszokomiális törzsek evolúciós fejlődésének iránya nem ezt igazolja (SCHROEDER ET AL., 2017; AL DAWODEYAH ET AL., 2018). A saját eredményeim alapján **a környezeti törzsek esetében még mindig fennáll a negatív korreláció ezen vizsgált paraméterek közt**, mely feltehetően annak tulajdonítható, hogy a környezeti törzsek esetében a virulencia megtartásának nincs közvetlen evolúciós előnye, bár az ehhez szükséges virulenciával összefüggő génkészlet a környezeti izolátumok esetében is adott. A jövőben a



29. sz. ábra: A motilitás vizsgálat során mutatott twitching mozgás és a *G. mellonella* test során mutatott virulencia közti összefüggés

teljes genom szekvenálás és annak eredményei, valamint génexpressziós kísérletek adhatnak pontosabb választ a felmerülő kérdésekre.

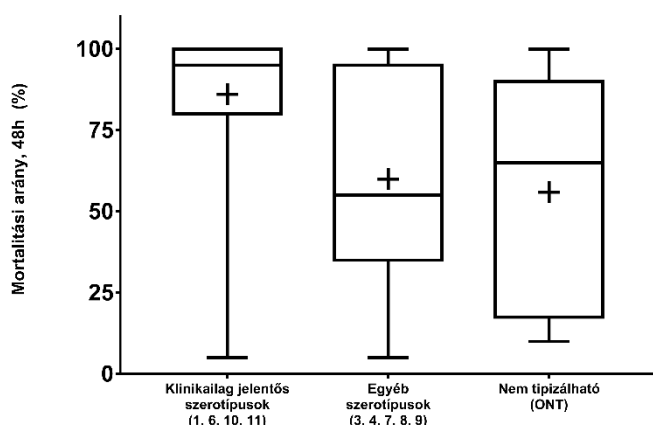
4.2.5.8.2 A motilitási formák és a *Galleria mellonella* tesztben mutatott virulencia összefüggései (n=46)

A motilitás vizsgálatára vonatkozó eredmények közül a twitching, vagyis a IV. típusú pilusok által mediált mozgás mutatott szignifikáns, pozitív korrelációt a *G. mellonella* modellben vizsgált virulenciával összefüggésben (29. sz. ábra), azaz a twitching szempontjából hipermotilis törzsek virulenciája nagyobb volt. Megállapítottam továbbá, hogy a vizsgált motilitási formák (swimming, swarming, twitching) bármelyikében mutatott mozgás képessége a vizsgált baktériumtörzsek esetében növelte a tesztorganizet pusztulásának arányát az alkalmazott virulencia tesztben, ami azt jelenti, hogy twitching mozgásforma invázióban játszott szerepét részben akár helyettesíteni tudja a swimming vagy a swarming mozgásformák esetében jelentkező motilitás, hipermotilitás. Ezt igazolja az is, hogy a hipermotilitás képessége egy esetet kivéve (P14) teljesen hiányzott az alkalmazott virulencia modellben avirulens törzsekből.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY:

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

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



30. sz. ábra: A szerotípusok közti kapcsolat és a *G. mellonella* tesztorganizeten mutatott mortalitás aránya

A szerotípusok közti kapcsolat és a *G. mellonella* tesztorganizeten mutatott mortalitás aránya a 30. sz. ábrán látható. A klinikumban releváns szerotípusokhoz (O1, O6, O10, O11) tartozó törzsek átlagosan magasabb pusztulási arányt okoztak a vizsgált tesztorganizetre nézve, mint az egyéb szerotípusokhoz (O3, O4, O7, O8, O9) tartozó vagy a nem szerotipizálható (ONT) izolátumok. 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 igazolnak: az O1 szerotípusú környezeti törzsek 95-100%-ában okozták a lárvák pusztulását 48 óra után egy kivétellel: a hipermotilitást nem mutató, szintén az O1 szerocsoportba tartozó P28 izolátum nem bizonyult virulensnek.

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

A 46 törzs esetében vizsgált virulencia gének (*lasB*, *algD*, *aprA*, *plcH*, *exoS*, *exoU*) és a hemolitikus aktivitás megjelenése, azaz **egy adott törzs virulenciájának megítélésére általánosan használt virulencia faktorok jelenléte vagy hiánya a részletes statisztikai elemzés alapján nem mutatott összefüggést a *G. mellonella* tesztben kapott mortalitási eredményekkel.** Az egyetlen statisztikailag igazolt kivételt ez alól az a virulencia profil képezte, amikor az *exoS* és az *exoU* gén egyidejűleg hiányzott egy törzsből (P108, P135 környezeti izolátumok). Ezekben az esetekben az alkalmazott virulencia modellben szignifikánsan alacsonyabb volt a letalitási arány, mint az egyéb genotípusoknál. Ezen eredmény kiegészítést adhat a Miyata és munkatársai (2003) által publikált megállapításokhoz az *exoS* *P. aeruginosa* patogenitásában betöltött szerepét illetően *G. mellonella* tesztben. A tanulmány szerint csupán az *ExoT* és *ExoU* termelődése játszik szerepet a nagy viaszmosy lárvák pusztulásában, azonban a kutatásban nem vizsgáltak olyan törzset, mely hordozta az *exoS* génszakaszt. **A környezeti törzsek vizsgálata során tehát új tudományos eredmény, hogy az *exoU* hiányában akkor kevésbé virulensek a törzsek, ha egyidejűleg az *exoS* sincs jelen adott izolátum genomjában.** A mindkét virulencia gén hiányát mutató törzsek alacsony számát figyelembe véve, további vizsgálatok szükségesek az eredmények megerősítésére.

Az *exoU*-t nélkülöző virulencia mintázatok főként az O6 és O3 szerocsoportokhoz tartoztak a környezeti törzseknél, ami összhangban van Lu és munkatársai megállapításaival (2014). Sikerült azonosítanom egy, a tudomány számára új profillal rendelkező környezeti *P. aeruginosa* törzset is (P71 jelölésű izolátum): *exoU* gént hordozó, O1 szerotípusú izolátumról tudomásom szerint eddig nem számoltak be (FAURE ET AL., 2003).

A *G. mellonella* teszt és a részletes, virulencia faktorok megállapítását célzó molekuláris biológiai vizsgálatok alapján összefoglalóan elmondható, hogy 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), vizsgálataim szerint nem helytálló. Eredményeim a Lee és munkatársai által tett megállapításokat támasztják alá, miszerint egy adott

P. aeruginosa törzs patogenitásához köthető gén jelenléte, vagy hiánya nem elvárt és nem is jelzésértékű egy másik törzs patogenitásának megítélésében (LEE ET AL., 2006).

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY:

VI. tézis: Először mutattam ki klinikai és környezeti törzsek esetében az *exoU* gént O1 szerocsoportba tartozó *P. aeruginosa* izolátumnál, mely Debrecenből, szénhidrogénnel szennyezett felszín alatti víz mintából származik.

Eredményeimet nemzetközi publikációban adtam közre.

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

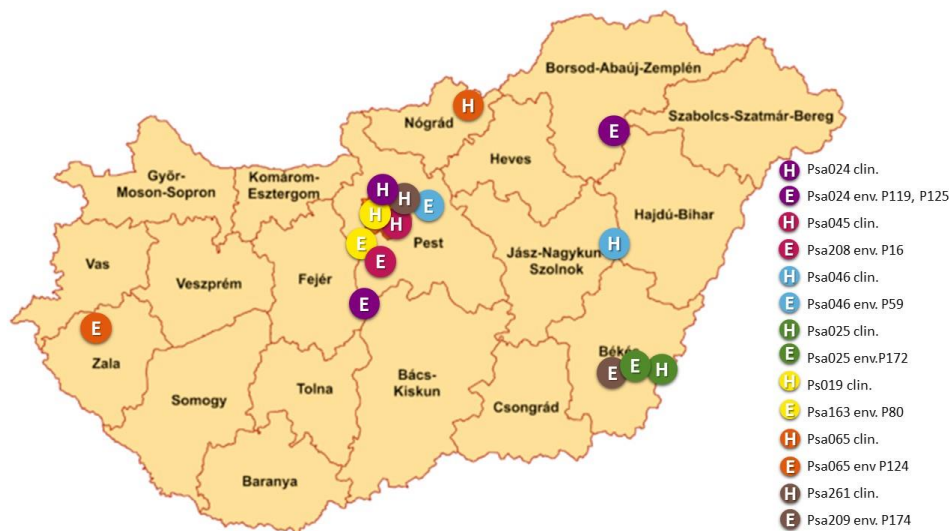
4.2.5.8.5 A környezeti *P. aeruginosa* törzsek jellemzése a PFGE alapján felállított filogenetikai fa és különböző vizsgálati irányok szerint (n=46)

Az eredmények szerint a *G. mellonella* tesztben virulens és antibiotikum rezisztens törzsek véletlenszerűen helyezkedtek el a PFGE alapján felállított filogenetikai fán. 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 (11. sz. melléklet). A PFGE alapján azonos klónba tartozó környezeti törzsek rendelkezhetnek különböző *exoS/exoU* profillal, biofilm képző képességgel, hemolitikus aktivitással vagy motilitási tulajdonságokkal, illetve tartozhatnak különböző szerotípusba. Kivétel volt a P30 és P62, melyek azonos szerotípusba (O3) tartoztak, azonos virulencia gén profilt mutattak és egyikük sem hemolizált a véragaron.

Tokajian és munkatársai szerint (TOKAJIAN ET AL. 2012) a kórházi *P. aeruginosa* törzsek által mutatott PFGE típusok, vagy egyéb tulajdonságok, mint a virulencia vagy az antibiotikum rezisztencia nem mutatnak hasonlóságot a faj környezeti képviselői által mutatott jellemzőkkel. Ennek ellenére a PFGE módszer ígéretes lehet egymáshoz földrajzilag közelebb lévő (pl. azonos kórhelyről származó környezeti izolátumok) genetikai változásainak nyomon követésére. Mint ismeretes, a PFGE módszerrel tetten érhető egy adott baktériumtörzs esetében a mutáció, delécio, vagy inszercio jelensége, mely változások komoly hatást gyakorolnak a fenotípusosan megjelenő kifejeződésére. A jövőben céлом földrajzilag lehatárolt helyszínen az összefüggések feltérképezése a PFGE típus, a környezetben mérhető szennyező anyagok és az olyan, humán-egészségügyi jelentőséggel bíró tulajdonságok, mint a virulencia és az antibiotikum rezisztencia között. A PFGE módszerrel alapuló adatelemzés új megvilágításba helyezheti a jövőben nem csak a klinikai, hanem a természeti környezet vagy akár szennyezett területek kockázatbecslését is.

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

Az adatok feldolgozása során kitértem azoknak a törzseknek a részletes értékelésére is, melyek a PFGE vizsgálatok alapján az OEK adatbázisában szereplő, klinikai izolátumokkal közeli rokonságot mutattak. Az adatok részletes áttekintése alapján megállapítható, hogy a klinikai izolátumokhoz közeli, vagy velük azonos pulsed-field típusba sorolt környezeti törzsek (P59, P119, P124, P125 és a P172) egyéb tulajdonságokban is hasonlítottak. Hipermotilitást mutattak a swimming és legalább motilisak voltak a swarming, illetve a twitching mozgásformák vizsgálatakor. Eredetüket tekintve, Magyarországon belül, igen különböző helyekről származtak mind a klinikai, mind a velük rokonságban álló környezeti törzsek, a földrajzi eredet alapján még az azonos PFGE típusba tartozó törzsek között sincs összefüggés (31. sz. ábra).



31. sz. ábra: A PFGE alapján rokon (85-95% homológia), magyarországi kórházakból izolált és környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek földrajzi elhelyezkedése; H-hospital/kórházi izolátum, E-environmental/környezeti izolátum

A pulsed-field típus egyezést mutató öt környezeti törzs származásáról elmondható, hogy a P59 komposzt mintából, a P172 szénhidrogénnel szennyezett talajvízből, míg a P119, P124 és P125 három, különböző olajfinomító szennyvizéből került kitenyésztésre. Mind az öt környezeti törzs virulens volt a *G. mellonella* tesztben (80-100% mortalitás), és egyikük sem volt rezisztens a vizsgált antibiotikum hatóanyagokkal szemben. Az OEK adatbázisában szereplő, klinikai törzsek esetében antibiotikum rezisztenciára vonatkozó eredményekkel sajnos nem rendelkezünk, így nyitva marad az a kérdés, hogy az adott PFGE ujjlenyomattal rendelkező környezeti és klinikai izolátumok antibiotikum rezisztencia tulajdonságait illetően milyen fokú egyezést mutatnak. Megállapítható ugyanakkor, hogy a human patogén, **klinikai törzsekkel egyező környezeti**

izolátumok esetében a virulencia mind genotípus, mind fenotípus alapján igazolt. A virulencia gén profiljuk, hemolitikus aktivitásuk és biofilm képző képességük eltért, bár mindegyikük birtokolta a *lasB* gént, vagy az *exoS/exoU* génszakaszok egyikét. A nem szerotipizálható P124-en kívül az O6 és O10-es szerocsoportokhoz tartoztak – mindkét szerocsoport klinikai jelentőségét szakirodalmi források igazolják.

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

Az alkalmazott genotipizálási módszerek kapcsán elmondható, hogy bár a PFGE módszer tekintendő etalonnak, ez a módszer azonban szakirodalmi források alapján nem alkalmas a *P. aeruginosa* izolátumok közötti klonális kapcsolatok feltárására; a regionális és interregionális kapcsolatrendszer feltárására inkább az MLST alkalmazása terjedt el (LIBISCH, 2013). Munkám során lehetőség nyílt 14 környezeti és 2 klinikai izolátum esetében mindkét vizsgálati módszert alkalmazni. Saját tapasztalatok alapján az ST szám egyezés egyben a pulsed-field típusok szoros kapcsolatát is jelezheti [P43, KPS-3 törzsek: ST 253 (MLST) és Psa216-Psa223 (PFGE) valamint P30, P62 törzsek: ST 198 (MLST) és Psa229 (PFGE)] ám fordítva ez a megállapítás nem igaz: a pulsed-field típus egyezés nem jelzi a klonális kapcsolatok szorosságát. Mindezek alapján a környezeti törzsek genotipizálása esetében – a szakirodalmi ajánlásokkal összhangban – földrajzilag eltérő származású, diverz eredetű törzsek klonális kapcsolatrendszerének feltárására az MLST, azonos területről származó izolátumok genetikai változásainak nyomon követésére pedig a diszkriminatívabb PFGE módszer javasolható.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNY:

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.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Doktori munkám során az elvégzett kutatások eredményei alapján megállapítható, hogy a klinikai viszonyok között kiemelt jelentőséggel bíró *Acinetobacter baumannii* és *Pseudomonas aeruginosa* fajok tekintetében hiánypótló adatok születtek e fajok környezeti (talaj, felszín alatti víz, felszíni víz) elterjedtségéről, valamint környezetvédelmi és környezetegészségügyi szempontból fontos (környezeti elterjedtség, virulencia, rezisztencia, biofilm képzés, filogenetikai kapcsolatok) tulajdonságaikról.

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. Mivel azonban a globális klímaváltozás váratlan hatásokat eredményezhet a környezeti elemek mikrobiológiai állapotában is, ezért a továbbiakban is célszerű az általam vizsgált mikroszervezetek folyamatos környezeti monitoringja, talaj, felszín alatti és felszíni vizek esetében egyaránt. A klinikai jelentőségű *A. baumannii* faj környezeti képviselőivel végzett vizsgálatok eredményeként elmondható, hogy bár minden vizsgált törzsben jelen volt a *bla_{OXA-51}* karbapenem hidrolizáló enzim termeléséért felelős génszakasz, 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, egy ismeretlen eredetű orosz és egy amerikai, állati eredetű mintából származó törzsszel, mely nem nyújt elég információt az *A. baumannii* környezeti törzsek rokonsági kapcsolatainak feltárásához. Az adatbázis bővítése nélkülözhetetlen feladat a jövőben, melyhez nagyban hozzájárulhat a környezeti törzsek azonosítása és potenciális forrásaik felderítése.

Az *Acinetobacter* nemzetség egyéb fajaira vonatkozóan megállapítottam, hogy 403 minta vizsgálata alapján magyarországi viszonyok között az *Acinetobacter* fajok közül 11 különböző species izolálható. A nemzetség környezetben leggyakrabban kimutatott faja az *A. calcoaceticus*. 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 tudomásom szerint először jelentettem multirezisztens és egyben hemolitikus aktivitással (feltételezett virulenciával) bíró törzset, mely jelzi, hogy a növekvő jelentőségű, adott esetben többszörösen rezisztens patogén mikroszervezetek rezervoárjai nem csupán a kórházak, hanem a külső környezet is lehet. Ahogyan a szakirodalmi

áttekintésben bemutatott 2. sz. ábra is jelzi, a kórházi és környezeti törzsek közt az átjárás fennáll, bizonyos útvonalakon (szennyvíz, személyzet, látogatók stb.) keresztül folyamatos az áramlás, így a különböző környezetekhez adaptálódott törzsek keveredhetnek egymással, lehetőséget kínálva genetikai sokszínűségük horizontális géntranszferrel történő növelésére.

Az *Acinetobacter* sp. törzseknél a virulencia fenotípusos kimutatására alkalmazott hemolitikus aktivitáson kívül virulenciát érintő egyéb vizsgálatot a hiányos szakirodalmi háttér miatt nem végeztem. Feltételezhető ugyanakkor, hogy az *Acinetobacter* fajoknál a *Pseudomonas*-okhoz hasonlóan összetett rendszer állhat a virulencia hátterében, melynek feltérképezése a jövő feladata.

A *P. aeruginosa* esetében munkám eredményeként ismereteket szerezhettünk a faj eddig kevésbé vizsgált szerepéről felszíni vizekben. Megállapítottam, hogy kimutatási gyakorisága felszíni vízben 5,4%, mely jelentősen elmarad a korábban földtani közegben és felszín alatti vízben mért gyakoriságtól. A *Pseudomonas* nemzetség egyéb, tenyészthető képviselőinek felszíni vizekben mért gyakoriságát figyelembe véve megállapítható, hogy a *P. aeruginosa* faj feltehetően nem a nemzetség domináns képviselője felszíni vizekben. Összesen négy, a szakirodalom alapján klinikailag is jelentős szerotípust jegyeztem a környezeti izolátumok körében (O1-15%, O6-31%, O10-11%, O11-4%) és további 6, a rendelkezésre álló információk alapján klinikailag nem releváns szerotípusba sorolható törzset azonosítottam (O3, O4, O7, O8, O9, ONT). Leggyakoribbnak az O6 szerotípus bizonyult.

Munkám eredményeként megállapításra került, hogy a *P. aeruginosa* esetében a környezeti antibiotikum rezisztencia a klinikai viszonyokhoz hasonlóan elsősorban az egyik vizsgált Karbapenem hatóanyag (imipenem), valamint a kolisztin esetében kiterjedt: a vizsgált törzsek 8,33% és 25,67%-a rezisztenciát, míg 38,88% és 32,43% átmeneti rezisztenciát mutatott. Ez az arány a kolisztin esetében jelentősen meghaladja a klinikai viszonyok között jellemző szintet, mely indokoltá teszi a környezeti kolisztin rezisztencia okainak és mechanizmusainak részletesebb feltárását a jövőben. A Karbapenem rezisztencia környezeti nyomon követése kiemelt klinikai jelentőségére tekintettel szintén indokolt.

A *P. aeruginosa* biofilm képző képességének megállapítását célzó, mikrotiter lemez módszerrel végrehajtott vizsgálatokat lehetőségem volt kiegészíteni konfokális lézer pásztázó mikroszkópos felvételekkel, melyek alapján felülvizsgáltam a mikrotiter lemezes módszer eredményeinek megbízhatóságát. Megállapítottam, hogy a mikrotiter lemezen mért adhéziós képesség több esetben csupán a holt planktonikus sejtek felhalmozódását takarja. Ennek tükrében érdemes a biofilm képződés vizsgálatára alkalmazott mikroplate módszert csupán előkísérletként alkalmazni, a vizsgálat szerint „jó” biofilm képző képességgel rendelkező törzseket további tesztek alá vonni, melynek szerves részét kell, hogy képezze a vizuális értékelés.

A virulenciára vonatkozó eredményeim alapján sikeresen kiegészítettem a környezeti *P. aeruginosa*-ra vonatkozó eddigi ismereteket. Megállapítottam, hogy a *lasB*, *algD* és *aprA* génszakaszok jelenléte a vizsgált környezeti törzsek vonatkozásában általánosnak tekinthető, detektálási arányuk pedig adott esetben meghaladhatja a klinikai körülmények között jellemző szintet. 32 törzsnél (71,11%) detektáltam a szakirodalomban (FLEISZIG ET AL., 1997) az invazív jelleggel társított *exoS* gént, míg a citotoxicitással összefüggésbe hozott *exoU* 11 izolátum (24,44%) esetében volt kimutatható. Ismertté vált *exoS/exoU* génszakaszokat egyaránt nélkülöző környezeti genotípus. Megállapítottam, hogy a *G. mellonella* vizsgálati rendszerben mutatott virulenciával a 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. Ez a megállapítás is jelzi, hogy egy virulencia gén jelenléte, vagy hiánya nem feltétlenül áll kapcsolatban a fenotípusosan megnyilvánuló citolitikus hatásokkal, melyekben szerepet játszhatnak egyéb faktorok is.

Összefoglalva megállapítható, hogy az a feltevés, miszerint 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), vizsgálataim szerint nem helytálló. Eredményeim alapján statisztikailag is igazolást nyert, hogy a virulencia gének jelenléte és hiánya nem mutat szignifikáns összefüggést a fenotípusosan is megnyilvánuló virulencia eredményeivel; **a *P. aeruginosa* faj esetében olyan komplex interakciók zajlanak le a virulencia fenotípusos kifejeződése során, melyre egy önkényesen kiragadott virulencia faktor jelenlétéből, vagy hiányából nem következtethetünk.** A virulencia faktorok folyamatos vizsgálata kiemelt feladat a jövőben is, hiszen az éghajlati és környezeti változásokkal az egyes faktorok/gének megnyilvánulása, a génkészlet összetétele is új irányt vehet, aminek nyomon követése hiánypótló adatokkal szolgálhat. Jelen eredmények nagyban hozzájárulhatnak egy átfogó adatbázis kialakításához.

Filogenetikai vizsgálatokkal megállapítottam, hogy a vizsgált környezeti *P. aeruginosa* törzsek MLST profiljuk alapján cisztás fibrózisból származó izolátumokkal mutatnak rokonságot, míg a PFGE típusok alapján hazai, klinikai fertőzésekben 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.

Munkám során 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 az általam vizsgált környezeti eredetű *P. aeruginosa* törzsek döntő hányada (78%) az alkalmazott tesztszervezetre nézve közepesen virulens, illetve virulens volt. Az O1 szerotípushoz tartozó törzsek, melyek a klinikai adatok alapján súlyosabb kimenetelű fertőzéseket okoznak (LU ET AL., 2014) a *G. mellonella* teszt eredményei alapján is kifejezett virulenciával jellemezhetők: egy avirulens törzs kivételével (P28) a tesztszervezetek 95-100%-ában okoztak pusztulást 48 óra kontaktidő után.

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 tesztszervezet esetében kialakult fertőzés kimenetelében (letalitás) is jelentőséggel bír.

Igazoltam, hogy az antibiotikum rezisztencia több, klinikailag releváns hatóanyag (gentamicin, imipenem, cefepim, ceftazidim, cefoperazone-szulbaktám) esetében is szignifikánsan csökkenti a *G. mellonella* tesztszervezetre gyakorolt virulenciát, mely megállapítás az ellentmondásos szakirodalmi információkat figyelembe véve a környezeti törzsek vonatkozásában a tudomány számára új adat, azonban megerősítése és feltárása további vizsgálatokat igényel.

Mivel a *G. mellonella* teszt eredményei egyes vélemények alapján korlátozottan extrapolálhatók gerincesekre vagy emberi szervezetre, a tapasztalt eredmények nem jelzik az adott baktériumtörzs közvetlen humán-egészségügyi vonatkozásait, ám mindenképp figyelemfelhívó jellegűek és hozzájárulhatnak a környezeti *P. aeruginosa* izolátumok környezetbiztonsági, környezetegészségügyi jelentőségének szigorúbb megítéléséhez.

Napjaink globális klímaváltozási folyamatai olyan átalakulásokat idéznek elő a mikrobiális ökoszisztémában, melyek felmérésére jelenleg még nincsenek hatékony eszközeink. Feltehető azonban, hogy az alkalmazkodni képes mikroszervezetek között a ma tapasztaltnál nagyobb

arányban fognak megjelenni opportunistá mikroorganizmusok a magyarországi éghajlati viszonyok között is. Munkám e folyamat monitorozásának kezdeti lépéseit tette meg két olyan, kiemelt jelentőséggel bíró opportunistá patogén mikroszervezet esetében, mint a *Pseudomonas aeruginosa* és az *Acinetobacter baumannii*, továbbá felhívtam a figyelmet a növekvő jelentőségű mikroszervezetek környezeti monitoringjának szükségességére, melyet igazol, hogy egy általam izolált *A. beijerinckii* törzs multirezisztens fenotípussal volt jellemezhető. A környezeti monitoring vizsgálatok folytatásával, a filogenetikai és virulenciára, antibiotikum rezisztenciára irányuló tesztek végrehajtásával hasznos háttér adatok nyerhetők a kutató közösség és a döntéshozók számára, mely alapján a növekvő jelentőségű biológiai ágensek megítélésében aktuális és helyes döntések, szabályozások hozhatók.

Vizsgálatai 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 kitétele a magyar jogszabályokban, ajánlott a nemzetség, különös tekintettel az *A. baumannii* faj jogszabályba való beemelése, szigorúbb megítélése a jövőben, főképp az ivóvízminőség és a mikrobiális készítmények engedélyezésének tekintetében.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Doktori kutatásom során céлом volt az ubikviter baktériumokként általánosan elterjedt és a kórházi környezetben nozokomiális fertőzések kiváltásával, illetve antibiotikum rezisztenciájukkal problémát okozó *Acinetobacter* nemzetség és *Pseudomonas aeruginosa* faj környezeti képviselőinek vizsgálata és megítélése környezetbiztonsági szempontból. A szakirodalomban számos információt találunk klinikai törzsekről, ugyanakkor környezeti izolátumokkal kapcsolatban jóval kevesebb tanulmány áll rendelkezésre, a kórházi és környezeti törzsek eredményeinek összehasonlítására pedig csupán néhány esetben találunk példát. Munkám eredményeként azt az általános hipotézist igyekeztem megerősíteni, vagy cáfolni, miszerint a klinikai körülményekhez adaptálódott multirezisztens, virulens törzsekkel szemben a környezetben előforduló izolátumok nem jelentenek kockázatot környezet- és humánegészségügyi szempontból.

Felszíni, felszín alatti víz- és talajminták feldolgozása során 51, *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó törzset és 73 *P. aeruginosa* izolátumot azonosítottam. Ezen törzsekkel antibiotikum rezisztencia, hemolitikus aktivitás és biofilm képző képesség vizsgálatát végeztem el. Az *Acinetobacter baumannii* faj képviselőit és a *P. aeruginosa* fajhoz tartozó egyes izolátumokat – e fajok kórházi jelentőségére tekintettel – kiemelt figyelemmel kísértem és filogenetikai vizsgálat (MLST) alá is vontam. Az újonnan és korábban izolált, környezeti (n=44) és klinikai (n=2) *P. aeruginosa* törzsekből létrehoztam egy 46 tagból álló csoportot, melynek tagjaival további vizsgálatokat végeztem meghatározott céljaim teljesítésére. A biofilm képző képesség vizsgálatát kiegészítettem konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készített képek értékelésével, polimeráz láncreakció segítségével különböző virulencia gének jelenlétét mutattam ki, szerotipizáltam a törzseket, motilitás vizsgálatokat végeztem folyékony, félfolyékony és szilárd közegben, illetve nagy viaszmosly modellen (*Galleria mellonella*) is meghatároztam a fenotípusos virulenciát. A filogenetikai vizsgálatok közül a multilokusz szekvencia tipizáló módszer (MLST) és a pulzáló erőterű gélelektroforézis (PFGE) segítségével határoztam meg rokonsági kapcsolatokat a környezeti, illetve az adatbázisokban található kórházi izolátumok között.

Munkám eredményeként megállapítottam, hogy a környezeti törzsek is rendelkezhetnek kórházi társaikhoz hasonlóan antibiotikum multirezisztenciával – az *Acinetobacter beijerinckii* fajról először jelentettem ilyen tulajdonságot. Ez alapján elmondható, hogy környezetbiztonsági szempontból az *Acinetobacter* nemzetség olyan faja jelenthet kockázatot (rezisztencia mechanizmusok birtoklása), melyet a szakirodalomban fellelhető adatok alapján elenyésző humán-egészségügyi jelentőséggel társítottak.

A *P. aeruginosa* faj környezeti képviselőinél jelentős (akár a klinikai viszonyokat meghaladó) arányban mutattam ki különböző virulencia faktorokat, melyek ugyan nem minden esetben társíthatók közvetlen humán-egészségügyi kockázattal, azonban jól reprezentálják e tulajdonságok elterjedtségét az ökológiai környezetben. Hat virulencia gént (*exoS*, *exoU*, *lasB*, *algD*, *aprA*, *plcH*) határoztam meg 46 *P. aeruginosa* törzsnél, melyek közül az *exoS* 71% míg az *exoU* 24%-ban volt jelen. A további négy gén az izolátumok 87-100%-ban volt detektálható, mely adott esetben a klinikai viszonyok közt mérhető gyakoriságnál jelentősen nagyobb arányt jelentett. A *Galleria mellonella* tesztben a *P. aeruginosa* izolátumok 65%-a virulensnek, míg további 13%-a közepesen virulensnek bizonyult, mely alapján alátámasztható, hogy a környezeti törzsek virulenciája nem korlátozódik a kapcsolódó gének birtoklására, hanem fenotípusosan is megnyilvánul. A szerotipizálás eredményeként 10 különböző szerocsoportot határoztam meg, melyből a szakirodalom alapján klinikailag fontos csoporthoz a környezeti izolátumok közel kétharmada tartozott az alábbiak szerint: O1-15%, O6-31%, O10-11%, O11-4%. További hat, a rendelkezésre álló információk alapján klinikailag nem releváns szerotípust is kimutattam a környezeti törzsek között (O3, O4, O7, O8, O9, ONT). Eredményeim alapján igazolást nyert, hogy környezeti viszonyok között a klinikaiakhoz hasonlóan az O1 szerotípus bizonyult a leginkább virulensnek, ám biztonságos, avirulens szerotípust nem sikerült egyértelműen megállapítanom.

Az MLST vizsgálatok eredményei szerint 14 környezeti *P. aeruginosa* törzs szekvenciatípusa közül 9 egyezett a pubmlst adatbázisában szereplő, cisztás fibrózisban szenvedő betegből származó izolátum ST számával, mely jelzi, hogy a cisztás fibrózisban közreműködő törzseknek a környezet is rezervoárja lehet. A hazai kórházakból jelentett, klinikai jelentőségű szekvencia típusok azonban a környezetben nem kerültek kimutatásra. A PFGE vizsgálatok alapján kapott eredményeket összevetve a Nemzeti Népegészségügyi Központ adatbázisával, megállapítottam, hogy 5 esetben igen szoros kapcsolat feltételezhető a környezeti törzsek és az ország különböző pontjairól izolált kórházi törzsek között, így a kisebb számú (n=14) MLST adatok kibővítésével további, akár klonális egyezéseket találhatunk a kórházi és környezeti törzsek viszonyában.

Munkám során kitértem annak megítélésére, hogy létezik-e jelenleg az általam vizsgált paraméterek között olyan tulajdonság, mely alapján egy környezeti izolátum környezeti és humán-egészségügyi biztonsága/kockázata megítélhető. Statisztikai elemzéssel kiegészített értékeléssel megállapítottam, hogy egy-egy tulajdonság, vagy virulencia gén vizsgálata alapján nem lehet környezet- vagy humánegészségügyi szempontból egyértelműen megítélni egy adott, környezetben található baktériumtörzsnél való kitértség kockázatait. Mint vizsgálataim is igazolják, az egyes tulajdonságok és azok kombinációja véletlenszerűen jelenhet meg éppúgy a környezeti, mint a klinikai törzseknél, megjelenésük és/vagy hiányuk pedig nem hozható

egyértelmű összefüggésbe a fenotípusosan megjelenő tulajdonságokkal. A mobilis genetikai elemek lehetővé teszik továbbá a környezeti törzsek gyors adaptációját és változását, mely folyamatok révén a környezeti izolátumok tényleges humán-egészségügyi kockázata is folyamatosan módosulhat. A filogenetikai vizsgálatok eredményei egyértelműen rávilágítanak arra, hogy a környezeti és a kórházi törzsek közt adott esetben igen szoros rokonsági kapcsolatok állhatnak fenn, mely alapján a környezeti izolátumok biztonságának megítélése nem szabad, hogy eltérjen a klinikai viszonyok között azonosított törzsekétől.

7. ENGLISH SUMMARY

The aim of my research was to investigate and evaluate environmental safety issues of the environmental strains belonging to the genus *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* species that are ubiquitous, cause nosocomial infections and have antibiotic-resistant strains in clinical environment. Various information is available in the scientific literature on clinical strains, however, studies on environmental isolates are very limited. Comparative examinations between clinical and environmental strains rarely occur. Based on the current working hypothesis, environmental and clinical strains are remarkably different regarding their multidrug resistance and virulence traits. The main aim of my work was to examine this hypothesis and to determine the actual differences between environmental or human health risk concerns of environmental and clinical isolates.

During the experimental period, surface, subsurface water, and soil samples were collected. 51 *Acinetobacter* and 73 *Pseudomonas aeruginosa* strains were isolated. Using this strain collection, antibiotic resistance, haemolytic activity, and biofilm forming ability examinations were performed. Isolates belonging to clinically important *Acinetobacter baumannii* species and some of the chosen *P. aeruginosa* strains were phylogenetically investigated with Multilocus Sequence Typing method. To reach my goals I wanted to make further examinations, so I created a 46-member group of *P. aeruginosa* from previously and newly isolated environmental (n=44) and clinical (n=2) strains. With these strains, the biofilm forming ability test was performed in microtiter plates along with confocal laser scanning microscope imaging, different virulence genes were detected by PCR, and virulence investigations were performed in *Galleria mellonella* infection model. Isolates were classified in serotypes, and a comprehensive motility assay was performed in fluids, semi-solid and solid surfaces. Multilocus Sequence Typing and Pulsed-field Gel Electrophoresis were used to determine the phylogenetic relationships between environmental and clinical strains.

The obtained results confirmed that environmental strains can possess antibiotic multidrug-resistance such as their clinical counterparts – multidrug-resistant feature was firstly reported about a haemolytic (presumably virulent) strain of species *Acinetobacter beijerinckii*. Based on these findings a species of the genus *Acinetobacter* associated with minimal human health concern can possess an environmental safety issue.

A significant number of different virulence factors were detected among environmental *P. aeruginosa* strains, sometimes in a higher proportion than the case of isolates from clinical environment. These virulence traits are not necessarily associated with a direct human health risk however, they represent the spread of these properties in the ecological environment, too. 6

virulence genes (*exoS*, *exoU*, *lasB*, *algD*, *aprA*, *plcH*) were checked in 46 *P. aeruginosa* isolates, of which 71% possessed *exoS* and 24% *exoU* and the other 4 genes were detected in 87-100%. In some cases, these proportions mean higher frequencies than rates reported in clinical settings. The virulence investigations on environmental *P. aeruginosa* revealed that 65% of the examined strains were virulent and further 13% were middle virulent in *Galleria mellonella* test, which confirmed that virulence of environmental strains manifests phenotypically and is not limited to the possession of the relevant genes. Our environmental strains belonged to 10 different serotypes, of which 4 has clinical importance with a detection rate as follows: O1: 15%, O6: 31%, O10: 11%, O11: 4%. Further isolates were serotyped as O3, O4, O7, O8, O9, and ONT (not typable). Our results confirmed that O1 serotype was the most virulent among environmental strains just like among clinical ones. Avirulent, i.e. safe serotype was not clearly detected.

Based on results of MLST, 9 out of 14 environmental isolates matched STs originated from cystic fibrosis patients, which means that infections of patients with cystic fibrosis are theoretically related to environmental reservoirs. At the same time, STs reported from Hungarian hospitals with clinical relevance were not detected among environmental strains. In the PFGE examination we revealed that based on the database of the National Center for Epidemiology 5 environmental strains of *P. aeruginosa* have a close phylogenetic relationship with nosocomial strains isolated from Hungarian hospitals of different locations. It is assumed that with the extension of the current environmental MLST database (n=14), even clonal matches can be found among clinical and environmental isolates.

During my experiment, I evaluated the human and environmental health concerns of environmental strains based on the correlation of their examined parameters. The evaluation was supplemented with statistical analysis and led to the conclusion that, based on the presence or absence of a virulence gene, we cannot evaluate any environmental *Pseudomonas aeruginosa* strain as safe. As our results revealed, different properties such as biofilm forming ability, motility, virulence, antibiotic resistance and their combinations can appear randomly among the environmental and clinical isolates. The presence or absence of the examined properties cannot be clearly connected with phenotypically manifested features. Furthermore, mobile genetic elements may allow quick adaptation among environmental strains, and the real human health concerns of environmental strains may change continuously. The phylogenetic examinations shed light on the potential relationships between environmental and clinical strains, which means the judgement of environmental and clinical strains should be evaluated on the same way.

1. SZ. MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK.

- ABDOLLAHI, S., RASOOLI, I., GARGARI, S. L. M. (2018): The role of TonB-dependent copper receptor in virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Infection, Genetics and Evolution*, 60:181–190.
- ABDULLAH AL-SHWAIKH, R. M., ABDULLAH AL-SHWAIKH, A. M., ALARNAWTEE, A. F. (2017): Nucleotide sequences of the *Pseudomonas aeruginosa algD* gene isolated from Iraqi patients with otitis media. *Current Research in Microbiology and Biotechnology*. 5(3): 1062-1070.
- ACUNA-ASKAR, K., ENGLANDE, A.J., HU, C., JIN, G. (2000): Methyl tertiary-butyl ether (MTBE) biodegradation in batch and continuous upflow fixed biofilm reactors. *Water Science and Technology*, 42(5-6): 153–161.
- 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.
- ALA'ALDEEN, D. A. A., WOOLDRIDGE, K. G. (2012): Bacterial pathogenicity. in: *Medical Microbiology*, 18th edition, eds: Greenwood, D., Slack, R. C. B., Barer, M., Irving, W. L., Churchill Livingstone, 2012. pp. 156–167.
- ALCOCK, S. R. (1977): Acute otitis externa in divers working in the North Sea: a microbiological survey of seven saturation dives. *Journal of Hygiene*, 78:395–409.
- AL DAWODEYAH, H. Y., OBEIDAT, N., ABU-QATOUSEH, L. F., SHEHABI, A. A. (2018): Antimicrobial resistance and putative virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with respiratory tract infection. *Germs*, 8: 31–40.
- ALHAZMI, A. (2015): *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. *International Journal of Biology*. 7(2): 44–67.
- ALMASAUDI, S. B. (2018): *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi Journal of Biological Science*, 25:586–596.
- AMINA, M., AHMED, B. (2017): *Pseudomonas* Motility and Antibiotics Resistance. *Journal of Bioengineer and Biomedical Sciences*, 7:220.
- AMINOV, R.I. (2011): Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 2(158): 1–19.
- ASADOLLAHI, P., AKBARI, M., SOROUGH, S., TAHERIKALANI, M., ASADOLLAHI, K., SAYEHMIRI, K., MALEKI, A., MALEKI, M. H., KARIMI, P., EMANEINI, M. (2012): Antimicrobial resistance patterns and their encoding genes among *Acinetobacter baumannii* strains isolated from burned patients. *Burns*, 38: 1198–1203.
- ASADPOUR, L. (2018): Antibacterial Resistance, Biofilm Forming Ability, and Virulence Potential of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Patients in Northern of Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, In Press. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.01.018>
- BADAMCHI, 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.
- BAQUERO, F., MARTINEZ, J-L., CANTON, R. (2008): Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19: 260–265.
- BARTOLI, C., LAMICHHANE, J.R., BERGE, O., VARVARO, L., MORRIS, C.E. (2015): Mutability in *Pseudomonas viridiflava* as a programmed balance between antibiotic resistance and pathogenicity. *Molecular Plant Pathology*, 16: 860–869.
- 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.

- BASSETTI, M., GINOCCHIO, F., MIKULSKA, M. (2011): New treatment options against gram-negative organisms. *Critical Care*, 15(2): 215.
- BASSETTI, M., CARNELUTTI, A., PEGHIN, M. (2017): Patient specific risk stratification for antimicrobial resistance and possible treatment strategies in gram-negative bacterial infections. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 15(1):55–65.
- BASSETTI, M., VENA, A., CROXATTO, A., RIGHI, E., GUERY, B. (2018): How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*, 7: 212–527.
- BAUMANN, P. (1968): Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water. *Journal of Bacteriology*, 96(1): 39–42.
- BENIE, C. K., DADIÉ, A., GUESSENND, N., N'QBESSO-KOUADIO, N. A., KOUAME, N. D., N'GOLO, D. C., AKA, S., DAKO, E., DJE, K. M., DOSSO, M. (2017): Characterization of virulence potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine meat, fresh fish, and smoked fish. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 7 (1):55–64.
- BERGOGNE-BEREZIN, E., TOWNER, K. J. (1996): *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2): 148–165.
- BEVERIDGE, T. J. (1999): Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, 181:4725–4733.
- BÉATRICE, J., MAUD, P., STÉPHANE, A., FRANÇOIS, C., FRÉDÉRIC, G., BENOIT, G., HUSSON, M-O. (2005): Relative expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes analyzed by a real time RT-PCR method during lung infection in rats. *FEMS Microbiology Letters*, 243: 271–278.
- BILLINGS, N., MILLAN, M. R., CALDARA, M., RUSCONI, R., TARASOVA, Y., STOCKER, R., RIBBECK, K. (2013): The extracellular matrix component Psl provides fast - acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens*, 9(8):e1003526.
- BOTZENHART, K., DÖRING, G. (1993): Ecology and Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. in: *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen eds: Campa, M., Bendinelli, M., Friedman, H. Springer Science+Business Media, LLC, New York. pp 1–18.
- BOUHADDIUI, B., SLAMA, K. B., GHARBI, S., BOUDABOUS, A. (2002): Epidemiology of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Annals of Microbiology*, 52:3, 223–235.
- BRADBURY, R. S., RODDAM, L. F., MERRITT, A., REID, D. W., CHAMPION, A. C. (2010): Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*. 59: 881-890.
- BROSSARD, K. A., CAMPAGNARI, A. A. (2012): The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infection Immunology*, 80:228–233.
- BURRELL, C. J., HOWARD, C. R., MURPHY, F. A. (2017): Pathogenesis of virus infections. in: Fenner and White's Medical Virology, 5th edition. Academic Press, 2016, Texas, USA.
- CANN, A. J. (2016): Pathogenesis, in: Principles of Molecular Virology, 6th edition, Academic Press, USA. 318 p.
- CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION– U.S DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (2013): Antibiotic Resistance Threats in the United States.
- CHAERUN, S.K., TAZAKI, K., ASADA, R., KOGURE, K. (2004): Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environment International*, 30: 911–922.
- CHAPMAN, J. (2015): Microstructures of Biofilm. In: Kanematsu, H. & Barry, D. M. (ed.): Biofilm and Materials Science. Springer International Publishing Switzerland, Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London, 196 p., 35–43. p.
- CHATTERJEE, P., DAVIS, E., YU, F., JAMES, S., WILDSCHUTTE, J.H., WIEGMANN, D.D., SHERMAN, D.H., MCKAY, R.M., LIPUMA, J.J., WILDSCHUTTE, H. (2017): Environmental *Pseudomonas*

- inhibit cystic fibrosis patient-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environmental Microbiology*, 83(2): e02701–16.
- CHOI, C. H., LEE, E. Y., LEE, Y. C., PARK, T. I., KIM, H. J., HYUN, S. H., KIM, S. A., LEE, S. K., LEE, J. C. (2005): Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cellular Microbiology*, 7: 1127–1138.
- 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.
- COLVIN, K.M., IRIE, Y., TART, C.S., URBANO, R., WHITNEY, J.C., RYDER, C., HOWELL, P.L., WOZNAK, D.J., PARSEK, M.R (2011): The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental Microbiology*, 14(8):1913–1928.
- 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.
- DE PASCALE, G., MONTINI, L., PENNISI, M., BERNINI, V., MAVIGLIA, R., BELLO, G., SPANU, T., TUMBARELLO, M., ANTONELLI, M. (2014): High dose tigeciklin in critically ill patients with severe infections due to multidrug-resistant bacteria. *Critical Care*, 18(3):R90.
- DEZIEL, E., COMEAU, Y., VILLEMUR, R. (2001): Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *Journal of Bacteriology*, 183:1195e204
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.363>
- DUBERN, J.F., CIGANA, C., DE SIMONE, M., LAZENBY, J., JUHAS, M., SCHWAGER, S., BIANCONI, I., DÖRING, G., EBERL, L., WILLIAMS, P., BRAGONZI, A., CÂMARA, M. (2015): Integrated whole-genome screening for *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes using multiple disease models reveals that pathogenicity is host specific. *Environmental Microbiology*, 17: 4379–4393.
- 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.
- ECDC - EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (2017): Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm, ECDC 2017. p.100.
- ELLNER, P. D., STOESEL, C. J., DRAKEFORD, E., VASI, F. (1966): A new culture medium for medical bacteriology. *American Journal of Clinical Pathology*. 45(4):502–504.
- EL ZOWALATY, M. E., AL THANI, A. A., WEBSTER, T. J., EL ZOWALATY, A. E., SCHWEIZER, H. P., NASRALLAH, G. K., MAREI, H. E., ASHOUR, H. M. (2015): *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiology*. 10(10):1683–1706.
- ERDEM, G., LEBER, A. (2018): 149 - *Acinetobacter* Species. Long, S. S., Prober, C. G., Fischer, M. (eds.): Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition), ISBN 9780323401814, Elsevier, 2018, p. 851–853.
- ESTAHBANATI, H. K., KASHANI, P. P., GHANAATPISHEH, F. (2002): Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns*, 28: 340–348.

- EUCAST - "THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org>."
- EVANS, B. A., AMYES, S. G. B. (2014): OXA Beta-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2): 241–263.
- FACKLAM, R. (2002): What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4): 613–630.
- FADHIL, L., AL-MARZOQI, A. H., ZAHRAA, M. A., SHALAN, A. A. (2016): Molecular and phenotypic study of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various clinical origins by PCR: profiles of genes and toxins. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 7: 590–598.
- FALAGAS, M. E., KARAGEORGOPOULOS, D. E. (2008): Pandrug Resistance (PDR), Extensive Drug Resistance (XDR), and Multidrug Resistance (MDR) among Gram-Negative Bacilli: Need for International Harmonization in Terminology. *Clinical Infectious Disease*. 46(7): 1121–1122.
- FALKOW, S. (1997): What is a Pathogen? *ASM News, Features*, 63(7): 359–365.
- FARMER, J. J., III, R. A. WEINSTEIN, C. H. ZIERDT, AND C. D. BROKOPP (1982): Hospital outbreaks caused by *Pseudomonas aeruginosa*: importance of sero-group O11. *Journal of Clinical Microbiology*, 16:266–270.
- FAURE, K., SHIMABUKURO, D., AJAYI, T., ALLMOND, L.R., SAWA, T. (2003): O-Antigen Serotypes and Type III Secretory Toxins in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology* 41(5):2158–2160.
- FAZELI, N., MOMTAZ, H. (2014): Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 16 (10):e15722
- FELFÖLDI, T. (2013): A mikrobák rendszerezésének alapelvei. in: Bevezetés a prokarióták világába, szerk.: Márialigeti Károly. Eötvös Loránd Tudományegyetem, 2013. p. 597.
- FISHBAIN, J., PELEG, A. Y. (2010): Treatment of *Acinetobacter* infections. *Clinical Infection Disease*, 51(1):79–84.
- FLEISCHER, M., PRZONDO-MORDARSKA, A. (1993): Hemolytic properties of bacteria from the genus *Acinetobacter*. *Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia*, 45(3):311–315.
- FLEISZIG, S.M.J., WIENER-KRONISH, J.P., MYAZAKI, H., VALLAS, V., MOSTOV, K.E. (1997): *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infection Immunology*, 65:579–586.
- FOURNIER, P. E., RICHET, H. (2006): The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clinical Infection Disease*, 42:692–699.
- GADDY, J. A. (2009): Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiology*, 4: 273–278.
- GADDY, J. A., TOMARAS, A. P., ACTIS, L. A. (2009): The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infection Immunology*, 77:3150–3160.
- GARNACHO-MONTERO, J., DIMOPOULOS, G., POULAKOU, G., AKOVA, M., CISNEROS, J., DE WAELE, J., PETROSILLO, N., SEIFERT, H., TIMSIT, J.F., VILA, J., ZAHAR, J.R., BASSETTI, M. (2015): Task force on management and prevention of *Acinetobacter baumannii* infections in the ICU. *Intensive Care Medicine*, 41(12):2057–2075.
- GAYNES, R., EDWARDS J. R., NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM (2005): Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clinical Infectious Disease*. 41(6): 848–854.
- GEORGESCU M., GEHORGHE, I., CURUTIU, C., LAZAR, V., BLEOTU, C., CHIFIRIUC, M-C. (2016): Virulence and resistance features of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from chronic leg ulcers. *BMC infectious Disease*, 16(Suppl 1): 92.

- GERNER-SMIDT, P., TJERNBERG, I., URSING, J. (1991): Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 277–282.
- GESSARD, C. (1882): Sur les colorations bleue et verte des linges à pansements. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De l'Académie des Sciences*, 94: 636–638.
- GHOLAMI, S., TABATABAEI, M., SOHRABI, N. (2017): Comparison of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in human and environmental isolates. *Microbial Pathogenesis*, 109:94–98.
- GIAMARELLOU, H., ANTONIADOU, A., KANELLAKOPOULOU, K. (2008): *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32(2):106–119.
- GOLI, H.R., NAHAEI, M.R., REZAEI, M.A., HASANI, A., KAFIL, H.S., AGHAZADEH, M. (2016): Emergence of colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Tabriz hospitals, Iran. *Iran J Microbiol.* 8(1): 62–69.
- GROSSO-BECERRA, M-V., SANTOS_MEDELLÍN, C., GONZALEZ-VALDEZ, A., MÉNDEZ, J-L., DELGADO, G., MORALES-ESPINOSA, R., SERVÍN-GONZÁLEZ, L., ALCARAZ, L-D., SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (2014): *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics*, 15:318.
- HAGHI, F., ZEIGHAMI, H., MONAZAMI, A., TOUTOUCHI, F., NAZARALIAN, S., NADERI, G. (2018): Diversity of virulence genes in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *Microbial Pathogenesis*, 115:251–256.
- HALÁSZ, L., FÖLDI, L. (2014): Környezetbiztonság. Egyetemi jegyzet, Nemzeti Közzolgálati Egyetem, Hadtudományi és Honvédtisztképző Kar. Budapest. 141 p.
- HANKÓ, M., FÖLDI, L., (2009): Életterünk környezetbiztonsági kérdései. *Hadmérnök*. IV. évf. 4. szám
- HASSUNA, N.A. (2016): Molecular detection of the virulent *exoU* genotype of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infected surgical incisions. *Surgical Infections*, 17(5): 610–614.
- HAUSER, A. R., RELLO, J. (2003): *Severe Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa*. Springer Science+Business Media, LLC New York, p. 236.
- HENRIQUES, I. S., ALVES, A., SAAVEDRA, M.J., MONTFORTS, M. H. M. M., CORREIA, A. (2012): Environmental antibiotic resistance: new insights from culture-independent approaches. In: Keen, P.L. & Montforts M. H. M. M. (ed.): *Antimicrobial resistance in the environment*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 602 p., p.123–148.
- HIGGINS, P.G., HRENOVIC, J., SEIFERT, H., DEKIC, S. (2018): Characterization of *Acinetobacter baumannii* from water and sludge line of secondary wastewater treatment plant. *Water Research*, 140:261–267.
- HOWARD, A., O'DONOGHUE, M., FEENEY, A., SLEATOR, R. D. (2012): *Acinetobacter baumannii*, an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*, 3(3): 243–250.
- HRENOVIC, J., DURN, G., GOIC-BARISIC, I., KOVACIC, A. (2014): Occurrence of an Environmental *Acinetobacter baumannii* Strain Similar to a Clinical Isolate in Paleosol from Croatia. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9):2860–2866.
- IGLEWSKI, B. H. (1996): *Pseudomonas*. in: *Medical Microbiology* 4th edition (ed: Baron, S.). University of Texas Medical Branch at Galveston; ISBN-10: 0-9631172-1-1
- ISENBERG, H. D. (1988): Pathogenicity and Virulence: Another View. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(1): 40–53.
- ISLAM, F., YASMEEN, T., ALI, Q., ALI, S., ARIF, M. S., HUSSAIN, S., RIZVI, H. (2014): Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104: 285–293.
- JANDER, G., RAHME, L.G., AUSUBEL, F.M. (2000): Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *Journal of Bacteriology*, 182: 3843–3845.

- JELLISON, T.K., MCKINNON, P.S., RYBAK, M.J. (2001): Epidemiology, resistance, and outcomes of *Acinetobacter baumannii* bacteraemia treated with imipenem-cilastatin or ampicillin-sulbactam. *Pharmacotherapy*, 21(2):142.
- JAWAD, A., HAWKEY, P. M., HERITAGE, J., SNELLING, A.M. (1994): Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter spp.*, and comparison with herellea agar and Holton's agar. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(10): 2353–2358.
- KARAGEORGOPOULOS, D. E., KELESIDIS, T., KELESIDIS, I., FALAGAS. M. E. (2008): Tigeciklin for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62:1 45–55.
- KAREEM, S. M., AL-KADMY, I. M. S., AL-KAABI, M. H., AZIZ, S. N., AHMAD, M (2017): *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced by the combined presence of virulence factors genes phospholipase C (plcN) and elastase (lasB). *Microbial Pathogenesis*, 110:568–572.
- KASZAB, E., KRISZT, B., ATZÉL, B., SZABÓ, G., SZABÓ, I., HARKAI, P., SZOBOSZLAY, S. (2010): The Occurrence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* on Hydrocarbon-Contaminated Sites. *Environmental Microbiology*, 59:37–45.
- KASZAB, E. (2010): A *Pseudomonas aeruginosa* környezetbiztonsági jelentősége antropogén hatás alatt álló közegekben, Doktori értekezés. Szent István Egyetem, Gödöllő. p.107.
- KASZAB, E., SZOBOSZLAY, S., DOBOLYI, S., HÁHN, J., PÉK, N., KRISZT, B. (2011): Antibiotic resistance profiles and virulence markers of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from composts. *Bioresource Technology*, 102(2):1543–1548.
- KEARNS, D. B. (2011): A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Review Microbiology*, 8(9): 634–644.
- KHATTAB, M. A., NOUR, M. S., ELSHESHTAWY, N. M. (2015): Genetic identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes among different isolates. *Journal of Microbiol Biochemical Technology*, 7: 274–277.
- KOMA, D., HASUMI, F., YAMAMOTO, E., OHTA, T., CHUNG, S., KUBO, M. (2001): Biodegradation of Long-Chain n-Paraffins from Waste Oil of Car Engine by *Acinetobacter sp.* *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(1): 94–96.
- KRALL, R., SCHMIDT, G., AKTORIES, K., BARBIERI, J. T. (2000): *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein, *Infection and Immunity*, 68(10): 6066–6068.
- KUMARI, A. M. S., ROURAY, A., YADAV, D., MADHAVAN, R. (2013): Imipenem resistance and biofilm production in *Acinetobacter*. *Drug Invention Today*, 5: 256–258.
- LAMBERT, P. A. (2002): Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine Supplement* 41(95).
- 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.
- LEE, V. T., SMITH, R. S., TUMMLER, B. L. S. (2005): Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the type III secretion system in vitro and during infection. *Infection and Immunity*, 73: 1695–1705.
- LEE, D.G., URBACH, J.M., WU, G., LIBERATI, N.T., FEINBAUM, R.L., MIYATA, S., DIGGINS, L.T., HE, J., SAUCIER, M., DÉZIEL, E., FRIEDMAN, L., LI, L., GRILLS, G., MONTGOMERY, K., KUCHERLAPATI, R., RAHME, L.G., AUSUBEL, F.M. (2006): Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biology*, 7(10): R90.

- LIBISCH B., BALOGH B., FÜZI M. (2009): Identification of two multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clonal lineages with a countrywide distribution in Hungary. *Current Microbiology*, 58(2): 111–116.
- LIBISCH B. (2013): Molecular typing methods for the Genus *Pseudomonas*. In: de Filippis, I., McKee, M.L. (eds.): Molecular typing in bacterial infections. Springer Science+Business Media, New York, USA. 482 p., 404–429. pp.
- LIN H-H, HUANG S-P, TENG H-C, JI D-D, CHEN Y-S. (2006): Presence of the *exoU* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is correlated with cytotoxicity in MDCK cells but not with colonization in BALB/c mice. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:4596–4597.
- LIN, J., HUANG, S., ZHANG, Q. (2002): Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes Infection*, 4:325–331.
- LIN, M-F., LAN, C-Y. (2014): Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases*, 2(12): 787–814.
- LIU, C-G, YANG, X., LAI, Y., LU, H-G., ZENG, W-M., GENG, G., YANG, F-S. (2016): Imazamox microbial degradation by common clinical bacteria: *Acinetobacter baumannii* IB5 isolated from black soil in China shows high potency. *Journal of Integrative Agriculture*, 15(8): 1798–1807.
- LIU, Q., LI, X., LI, W., DU, X., HE, J-Q., TAO, C., FENG, Y. (2015): Influence of carbapenem resistance on mortality of patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection: a meta-analysis. *Scientific Reports*. 5:11715
- LIU, Y., LI, C., HUANG, L., HE, Y., ZHAO, T., HAN, B., JIA, X. (2017): Combination of a crude oil-degrading bacterial consortium under the guidance of strain tolerance and a pilot-scale degradation test. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 25:1838–1846.
- LIU, Y-M., LEE, Y-T., KUO, S-C., CHEN, T-L., LIU, C-P., LIU, C-E. (2017): Comparison between bacteremia caused by *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis*. *Journal of microbiology, Immunology and Infection*, 50:62–67.
- LONGO, F., VUOTTO, C., DONELLI, G. (2014): Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiology*, 37(2):119–127.
- LOSONCZY, GY. (2001): A klinikai epidemiológia alapjai. A nosocomialis fertőzések járványtana. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 1027 p.
- 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., ROUOBY, J-J. (2014): *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. *Critical Care*, 18:R17.
- MA, L., JACKSON, K. D., LANDRY, R. M., PARSEK, M. R., WOZNAK, D. J. (2006): Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* conditional *psl* variants reveals roles for the *psl* polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of Bacteriology*, 188(23):8213–8221.
- MACGOWAN, A., MACNAUGHTON, E. (2017): Antibiotic resistance. *Prevention and Control of Infection*. 45:10.
- 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.
- MANAGAKI, S., MURATA, T., TAKADA, H., TUYEN, B. C., CHIEM, N. H. (2007): Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta. *Environmental Science Technology*, 41(23): 8004–8010.

- MARÍN, M., PEDREGOSA, A., RIOS, S., ORTIZ, M. L., LABORDA, F. (1995): Biodegradation of diesel and heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5: its possible applications on bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 35(1-3): 269–285.
- MARTIN, M. S., SANTOS, I. C., CARLTON JR, D. D., STIGLER-GRANADOS, P., HILDENBRAND, Z. L., SCHUG, K. A. (2018): Characterization of bacterial diversity in contaminated groundwater using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Science of the Total Environment*, 622-623:1562–1571.
- MATZ, C. (2011): Competition, Communication, Cooperation: Molecular Crosstalk in Multi-species Biofilms. In: Flemming, H.C., Wingender, J., Szewzyk, U. (ed.): *Biofilm Highlights*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Springer Heidelberg Dordrecht London New York, 243 p., 29–40. p.
- MAYO, M. S., W. L. COOK, R. L. SCHLITZER, M. A. WARD, L. A. WILSON, AND D. G. AHEARN (1986): Antibiograms, serotypes, and plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* associated with corneal ulcers and contact lens wear. *Journal of Clinical Microbiology*, 24: 372–376.
- MCCARTY, S., WOODS, E., PERCIVAL, S. L. (2014): Biofilms: Concept to Reality. In: Percival, S. L., Williams, D. W., Randle, J., Cooper, T. (ed.): *Biofilms in Infection Prevention and Control*. Academic Press, San Diego, USA, 396 p., 143–164. p.
- MCFARLAND, J. (1907): Nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 14: 1176–1178.
- 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.
- MILIVOJEVIC, D., SUMONJA, N., MEDIC, S., PAVIC, A., MORIC, I., VASILJEVIC, B., SENEROVIC, L., NIKODINOVIC-RUNIC, J. (2018): Biofilm-forming ability and infection potential of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animals and humans. *Pathogens and Disease*, 76(4):1–14.
- MISHRA, S., SARMA, P. M., LAL, B.(2004): Crude oil degradation efficiency of a recombinant *Acinetobacter baumannii* strain and its survival in crude oil-contaminated soil microcosm. *FEMS Microbiology Letters*, 235: 323–331.
- MITOV, I., TANYA, S., BOYKA, M. (2010): Prevalence of virulence genes among bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41:588–595.
- MIYATA, S., CASEY, M., FRANK, D.W., AUSUBEL, F.M., DRENKARD, E. (2003): Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 71: 2404–2413.
- MONTAÑA, S., PALOMBARANI, S., CARULLA, M., KUNST, A., RODRIGUEZ, C. H., NASTRO, M., VAY, C., RAMIREZ, M. S., ALMUZARA, M. (2018): First case of bacteraemia due to *Acinetobacter schindleri* harbouring blaNDM-1 in an immunocompromised patient. *New Microbes and New Infections*, 21:28–30.
- MOORE, N. M., FLAWS, M. L. (2011): *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clinical Laboratory Science*, 24:1.
- MORROW, B. J., PILLAR, C. M., DEANE, J., SAHM, D. F., LYNCH, A. S., FLAMM, R. K., PETERSON, J., DAVIES, T. A. (2013): Activities of carbapenem and comparator agents against contemporary US *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the CAPITAL surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(4): 412–416.
- MULAMATTATHIL, S.G., BEZUIDENHOUT, C., MBEWE, M., ATEBA, C.N. (2014): Isolation of environmental bacteria from surface and drinking water in Mafikeng, South Africa, and characterization using their antibiotic resistance profiles. *Journal of Pathogens*, Article ID: 371208

- MUNOZ-PRICE, L. S., WEINSTEIN, R. A. (2008): *Acinetobacter* infections. *The New England Journal of Medicine*, 358: 1271–1281.
- NAGY, T. (2001): Biztonság és biztonságtudomány, Magyar Biztonságtudományi Társaság, 2001.
- NEDELJKOVIĆ, N. S., TIODOROVIĆ, B., KOCIĆ, B., CIRIĆ, V., MILOJKOVIĆ, M., WAISI, H. (2015): *Pseudomonas aeruginosa* serotypes and resistance to antibiotics from wound swabs. *Vojnosanit Pregled*, 72(11):996–1003.
- NEIDIG, A., YEUNG, A.T., ROSAY, T., TETTMANN, B., STREMPER, N., RUEGER, M., LESOUHAITIER, O., OVERHAGE, J. (2013): TypA is involved in virulence, antimicrobial resistance and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiology*, 13: 77.
- NEMEC, A., MUSILEK, M., MAIXNEROVA, M., DE BAERE, T., VAN DER REIJDEN, T., VANECHOUTTE, M., DIJKSHOORN, L. (2009): *Acinetobacter beijerinckii* sp nov and *Acinetobacter gyllenbergii* sp nov., haemolytic organisms isolated from humans. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 59: 118–124.
- NEMEC, A., KRIZOVA, L., MAIXNEROVA, M., VAN DER REIJDEN, T.J., DESCHAGHT, P., PASSET, V., VANECHOUTTE, M., BRISSE, S., DIJKSHOORN, L. (2011): Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Research in Microbiology*, 162(4):393–404.
- NIU, C., CLEMMER, K. M., BONOMO, R. A., RATHER, P. N. (2008): Isolation and characterization of an auto-inducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*, 190: 3386–3392.
- NKEM, B. M., HALIMON, N., YUSOFF, F., JOHARI, W. L. W., ZAKARIA, M. P., MEDIPALLY, S. R., KANNAN, N. (2016): Isolation, identification and diesel-oil biodegradation capacities of indigenous hydrocarbon-degrading strains of *Cellulosimicrobium cellulans* and *Acinetobacter baumannii* from tarball at Terengganubeach, Malaysia. *Marine Pollution Bulletin*, 107: 261–268.
- OSTROFF, R. M., VASIL, A. I., VASIL, M. L. (1990): Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 172:5915–5923.
- PALLERONI, N. J. (2010): The *Pseudomonas* story. *Environmental Microbiology*, 12(6): 1377–1383.
- PÁSZTI, J., JÁNVÁRI, L., TÓTH, Á. (2011): Multirezisztens *Acinetobacter baumannii* klinikai izolátumok molekuláris epidemiológiai vizsgálata. *Mikrobiológiai Közlevél*, XI(1):3–12.
- PEIX, A., RAMÍREZ-BAHENA, M-H., VELÁZQUEZ, E. (2018): The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: an update. *Infection, Genetics and Evolution*, 57: 106–116.
- PELEG, A. Y., SEIFERT, H., PATERSON, D. L. (2008): *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Review*, 21:538–582.
- PHROMMANICH, S., SUANJIT, S., UPATHAM, S., GRAMS, S. V., KRUAETRACHUE, M., POKETHITIYOOK, P., KORGE, G., HOFMANN, A. (2009): Quantitative detection of the oil-degrading bacterium *Acinetobacter* sp. strain MUB1 by hybridization probe based real-time PCR. *Microbiological Research*, 164: 486–492.
- POI, G., SHAHSAVARI, E., ABURTO-MEDINA, A., MOK, P. C., BALL, A. S. (2018): Large scale treatment of total petroleum-hydrocarbon contaminated groundwater using bioaugmentation. *Journal of Environmental Management*, 214: 157–163.
- 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.
- RADÓ, J. (2014): *Acinetobacter* fajok környezetbiztonsági vizsgálata. Diplomadolgozat, Szent István Egyetem, Gödöllő, 52 p.

- RAFEI, R., HAMZE, M., PAILHORIÈS, H., EVEILLARD, M., MARSOLLIER, L., JOLY-GUILLOU, M-L., DABOUSSI, F., KEMPF, M. (2015): Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Applied Environmental Microbiology*, 81(7): 2359–2367.
- RAVAOARINORO, M., MOHAPATRA, S., SHORE, J., RAWAL, S., OMRI, A., YAGHI, J., ORIOL, F. (1996): Serotyping clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to infection site antibiotic susceptibility and beta-lactamase production. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 7:65–68.
- ROCA, I., ESPINAL, P., VILA-FARRES, X., VILA, J. (2012): The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Frontiers in Microbiology*, 3:148.
- ROSHANI-ASL, RASHIDI, N., SHOKOOHIZADEH, L., ZAREI, J. (2018): Relationship among antibiotic resistance, biofilm formation and *lasB* gene in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Clinical Laboratory*, 64(9): 1477–1484.
- ROJO F. (2010): Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiology Review*, 34(5):658–684.
- RUMBO-FEAL, S., GOMEZ, M. J., GAYOSO, C., ÁLVAREZ-FRAGA, L., CARBAI, M. P., ARANSAY, A. M., RODRIGUEZ-EZPELETA, N., FULLAONDO, A., VALLE, J., TOMAS, M., BOU, G., POZA, M. (2013): Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. *PLoS One*, 8: e72968
- SANTAJIT, S., INDRAWATTANA, N. (2016): Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*. 8:475067.
- SARMAH, A. K., MEYER, M. T., BOXALL, A. B. A. (2006): A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65: 725–759.
- SATO, Y., UNNO, Y., KAWAKAMI, S., UBAGAI, T., ONO, Y. (2017): Virulence characteristics of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates vary with the expression levels of omps. *Journal of Medical Microbiology*, 66: 203–212.
- SAWA, T., SHIMIZU, M., MORIYAMA, K., WIENER-KRONISH (2014): Association between *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. *Critical Care*, 18:668.
- SCHROEDER, M., BROOKS, B.D., BROOKS, A.E. (2017): The complex relationship between virulence and antibiotic resistance. *Genes (Basel)*, 8(1):39.
- SEBENY, P. J., RIDDLE, M. S., PETERSEN, K. (2008): *Acinetobacter baumannii* skin and soft-tissue infection associated with war trauma. *Clinical Infection Diseases*, 47:444–449.
- SHAVER, C. M., HAUSER, A. R. (2004): Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS and ExoT to virulence in the lung. *Infection and Immunity*, 72(12):6969–6977.
- SILVA-FILHO, L.V.F., FERREIRA, F.A., REIS, F.J.C., BRITTO, M.C.A.M., LEVY, C.E., CLARK, O., RIBEIRO, J.D. (2013): *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 39(4): 495–512.
- SMANI, Y., MCCONNELL, M. J., PACHON, J. (2012): Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. *PLoS One*, 7:e33073.
- SMOLYAKOV, R., BORER, A., RIESENBERG, K., SCHLAEFFER, F., ALKAN, M., PORATH, A., RIMAR, D., ALMOG, Y., GILAD, J. (2003): Nosocomial multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection: risk factors and outcome with ampicillin-sulbactam treatment. *Journal of Hospital Infection*, 54(1):32.
- SPIERS, A. J., BUCKLING, A., RAINEY P. B. (2000): The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology*, 2345–2350.
- 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.

- STANTON, A. R. (2013): Assessment of motility and hemolytic activity in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from University of Kentucky hospital, Lexington, KY. Online Theses and Dissertations. p. 134.
- 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.
- SUTHERLAND, I. W. (2001): Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147: 3–9.
- SZOBOSZLAY, S. (2003): Katonai tevékenységek során a talajba és a talajvízbe kerülő szénhidrogén szennyezések kármentesítésének környezetbiztonsági követelményei. PhD értekezés, Zrínyi Miklós Nemzetvédelmi Egyetem. 122 p.
- TAAE, S.R., KHANSARINEJAD, B., ABTAHI, H., NAJAFIMOSLEH, M., GHAZNAVI-RAD, E. (2014): Detection of *algD*, *oprL* and *exoA* genes by new specific primers as an efficient, rapid and accurate procedure for direct diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* strains in clinical samples. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(10): e 13583.
- 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.
- TASSIOS, P., GENNIMATA, V., MANIATIS, A. N., FOCK, C., LEGAKIS, N. J. (1998): Emergence of multidrug resistance in ubiquitous and dominant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O11. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:4, 897–901.
- TATMAN-OTKUN, M., GÜRCAN, S., OZER, B., SHOKRYLANBARAN, N. (2004): Annual trends in antibiotic resistance of nosocomial *Acinetobacter baumannii* strains and the effect of synergistic antibiotic combinations. *New Microbiology*, 27(1):21.
- 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.
- TOKAJIAN, S., TIMANI, R., ISSA, N., ARAJ, G. (2012): Molecular characterization, multiple drug resistance and virulence determinants of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Lebanon. *British Microbiology Research Journal*, 2: 243–250.
- TOMARAS, A. P., FLAGLER, M. J. , DORSEY, C. W., GADDY, J. A., ACTIS, L. A. (2008): Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology*, 154: 3398–3409.
- TOWNER, K. (2006): The Genus *Acinetobacter*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Stackebrandt, E. (eds): *The Prokaryotes*. Springer, New York, USA, 1188 p.
- TOWNER, K.J. (2009): *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection*, 73: 355–363.
- TUON, F. F., ROCHA, J. L., MERLINI, A. B. (2015): Combined therapy for multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection – is there evidence outside the laboratory? *Journal of Medical Microbiology*, 64:951–959.
- TURTON, J. F., KAUFMANN, M. E., GILL, M. J., PIKE, R., SCOTT, P. T., FISHBAIN, J. (2006): Comparison of *Acinetobacter baumannii* isolates from the United Kingdom and the United States that were associated with repatriated casualties of the Iraq conflict. *Journal of Clinical Microbiology*, 44:2630–2634.
- TURTON, J. F., SHAH, J., OZONGWU, C., PIKE, R. (2010): Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: Evidence for emerging species. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4): 1445–1449.
- VAN DUUREN, J.B.J.H., MÜSKEN, M., KARGE, B., TOMASCH, J., WITTMANN, C., HÄUSSLER, S., BRÖNSTRUP, M. (2017): Use of single-frequency impedance spectroscopy to characterize

- the growth dynamics of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 7(1):5223.
- VIJAYASHREE, P. J., SMILINE, G. A. S., PARAMASIVAM, A. (2018): In silico analysis of virulence genes in an emerging dental pathogen *A. baumannii* and related species. *Archives of Oral Biology*, 94:93–98.
- WEI, Q., MA, L. Z. (2013): Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 20983–21005.
- WISPLINGHOFF, H., PAULUS, T., LUGENHEIM, M., STEFANIK, D., HIGGINS, P. G., EDMOND, M. B., WENZEL, R., SEIFERT, H. (2012): Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *Journal of Infection*, 64:282–290.
- WONG, C. Y., MAYRHOFER, G., HEUZENROEDER, M. W., ATKINSON, H. M., QUINN, D. M., FLOWER, R. L. (1996): Measurement of virulence of aeromonads using a suckling mouse model of infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 15(4): 223–241.
- WOODS, D. E., CRYZ, S. J., FRIEDMAN, R. L., IGLEWSKI, B. H. (1982): Contribution of toxin A and elastase to virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infections of rats. *Infection and Immunity*, 36:1223–1228.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2004): Laboratory Biosafety Manual. Third edition. WHO, Geneva. 186 p.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2015): Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. WHO, Geneva. 28p.
- WRIGHT, G. D. (2010): Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Current Opinion in Microbiology*, 13: 589–594.
- XIE, R., ZHANG, X. D., ZHAO, Q., PENG, B., ZHENG, J. (2018): Analysis of global prevalence of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* infections disclosed a faster increase in OECD countries. *Emerging Microbes and Infections*, 7:31.
- YOKOTA, S., NOGUCHI, H. (1994): Epitopes for human monoclonal antibodies and serotyping antisera against the O-specific polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* O11. *Carbohydrate Research*, 261:57–66.
- 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.
- YU, D., YONG, Y-C., LIU, C., FANG, Y., BAI, L., DONG, S. (2017): New applications of genetically modified *Pseudomonas aeruginosa* for toxicity detection in water. *Chemosphere*. 184:106–111.
- ZANNONI, D. (1989): The respiratory chains of pathogenic pseudomonads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 975:299–316.
- ZAVASCKI, A. P., GOLDANI, L. Z., CAO, G., SUPERTI, S. V., LUTZ, L., BARTH, A. L., RAMOS, F., BONIATTI, M. M., NATION, R. L., LI, J. (2008): Pharmacokinetics of intravenous Polymyxin B in critically ill patients. *Clinical Infection Diseases*, 47:1298–1304.
- ZHANG, Q., JIA, A., WAN, Y., LIU, H., WANG, K., PENG, H., DONG, Z., HU, J. (2014): Occurrences of three classes of antibiotics in a natural river basin: association with antibiotic-resistant *Escherichia coli*. *Environmental Science Technology*, 48(24):14317–14325.
- ZHAO, F., LI, P., GUO, C., SHI, R-J., ZHANG, Y. (2018): Bioaugmentation of oil reservoir indigenous *Pseudomonas aeruginosa* to enhance oil recovery through in-situ biosurfactant production without air injection. *Bioresource Technology*, 251:295–302.
- ZIMBLER, D. L., PENWELL, W. F., GADDY, J. A., MENKE, S. M., TOMARAS, A. P., CONNERLY, P. L., ACTIS, L. A. (2009): Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Biometals*, 22: 23–32.

DIRECTIVE 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. Official Journal of the European Communities, L 262/21, 17.10.2000

MSZ 21464: 1998. Mintavétel felszín alatti vizekből

MSZ 5667-4:1995. Mintavétel a természetes és mesterséges tavakból

MSZ 21470-1:1998. Környezetvédelmi talajvizsgálat. Mintavétel

MSZ 21470-77:1988. Környezetvédelmi talajvizsgálatok. Mikrobiológiai vizsgálatok

Internetes hivatkozások

http1: <https://www.epa.gov/aboutepa/our-mission-and-what-we-do>

http2: https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/eea_en

http3: <https://www.greenpeace.org/hungary/hu/rolunk/>

http4: <https://www.worldwildlife.org/about/history>

http5: <https://www.unenvironment.org/about-un-environment>

http6: <https://www.thegef.org/our-work>

http7: http://www.ipcc.ch/news_and_events/docs/factsheets/FS_what_ipcc.pdf

http8: <http://www.who.int/about/what-we-do/en/>

http9: <http://www.medical-labs.net/wp-content/uploads/2014/03/ABeta-Hemolysis-BAlpha-Hemolysis-CGamma.jpg>

http10: <https://www.biosafety.be/node/295>

http11: <https://www.baua.de/DE/Angebote/Rechtstexte-und-Technische-Regeln/Regelwerk/TRBA/TRBA-466.html>

http12: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=469>

http13: <http://www.bacterio.net/acetobacter.html>

http14: <https://www.dsmz.de/catalogues/catalogue-microorganisms.html#searchResult>

http15: <http://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

http16: <http://oek.hu/oek.web?nid=666&pid=11>

http17: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=286>

http18: <http://www.oek.hu/oek.web?nid=666&pid=10>

2. SZ. MELLÉKLET: Az antibiotikum rezisztencia fenotípusos vizsgálatához kiválasztott hatóanyagok listája, a nemzetközi ajánlások szerint

Acinetobacter baumannii

	EARS-NET/ EUCAST*	ECDC	NCCLS	MAGIORAKOS*	SAJÁT VIZSGÁLATOK
CEFALOSPORINOK					
cefepim			X	X	X
ceftazidim			X	X	X
cefotaxim			X	X	X
ceftriaxon			X	X	X
KARBAPENEMEK					
doripenem	X	X		X	
imipenem	X	X	X	X	X
meropenem	X	X	X	X	X
PENICILLINEK					
ampicillin-szulfaktám			X	X	X
mezlocillin			X		
piperacillin			X		X
piperacillin-tazobaktám			X	X	X
tikarcillin			X		
tikarcillin-klavulánsav			X	X	
AMINOGLIKOZIDOK					
amikacin	X	X	X	X	X
gentamicin	X	X	X	X	X
netilmicin	X	X		X	X
tobramicin	X	X	X	X	X
FLUOROKINOLONOK					
ciprofloxacín	X	X	X	X	X
gatifloxacín			X		
levofloxacín	X	X	X	X	X
POLIMIXINEK					
kolisztin	X	X			X
polimixin B				X	
TETRACIKLINEK					
tetraciklin			X	X	
doxiciklin			X	X	
minociklin			X	X	X
tigeciklin***					X
EGYÉB					
trimetoprim- szulfametoxazol	X	X	X	X	X

EARS-NET – European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

*EUCAST, 2017

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control

NCCLS/CLSI – National Committee for Clinical Laboratory Standards/ Clinical and Laboratory Standards Institute

**MAGIORAKOS ET AL., 2011

***KARAGEORGOPOULOS ET AL., 2008

Pseudomonas aeruginosa

	EARS-NET/ EUCAST*	ECDC	NCCLS	MAGIORAKOS**	NNK	SAJÁT VIZSGÁLAT
CEFALOSPORINOK						
cefepim	X	X	X	X	X	X
ceftazidim	X	X	X	X	X	X
ceftazidim- avibaktám		X				
ceftolozan- tazobaktám		X				
cefoperazone-szulb.			X			X
KARBAPENEMEK						
doripenem	X	X		X		
imipenem	X	X	X	X	X	X
meropenem	X	X	X	X	X	X
PENICILLINEK						
piperacillin	X	X	X			X
piperacillin- tazobaktám	X	X	X	X	X	X
tikarcillin	X	X	X			
tikarcillin- klavulánsav	X	X		X		
mezlocillin			X			
AMINOGLIKOZIDOK						
amikacin	X	X	X	X	X	X
gentamicin	X	X	X	X	X	X
netilmicin	X	X	X	X		
tobramicin	X	X	X	X	X	X
FLUOROKINOLONOK						
ciprofloxacin	X	X	X	X	X	X
levofloxacin	X	X	X	X		
lomefloxacin vagy ofloxacin			X			X
norfloxacin			X			
MONOBAKTÁMOK						
aztreonam	X	X	X	X		
POLIMIXINEK						
kolisztin	X	X		X		X
polimixin B				X		
EGYÉB						
foszfomicin				X		

EARS-NET – European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

*EUCAST, 2017

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control

NCCLS/CLSI – National Committee for Clinical Laboratory Standards/ Clinical and Laboratory Standards Institute

**MAGIORAKOS ET AL., 2011

NNK – Nemzeti Népegészségügyi Központ, Magyarország

A doktori dolgozat során vizsgálatba vont antibiotikum hatóanyagok csoportosítása hatóanyagcsoportok szerint

Antibiotikumok csoportosítása		
Hatóanyagcsoport	Hatóanyag	
Béta-laktámok	Cefalosporinok	cefoperazone/szulbaktám
		cefotaxim
		ceftazidim
		ceftriaxon
		cefepim
	Karbapenemek	imipenem
		meropenem
	Penicillinek	piperacillin
		piperacillin/tazobaktám
ampicillin/szulbaktám		
Aminoglikozidok	gentamicin	
	tobramicin	
	amikacin	
	netilmicin	
Fluorokinolonok	ciprofloxacín	
	levofloxacín	
	ofloxacín	
Polimixinek	kolisztin	
Tetraciklinek	minociklin	
	tigeciklin	
Egyéb	trimethoprim/ szulfamethoxazol	

3. SZ. MELLÉKLET: A kutatás során, az *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó fajok izolálásának céljából vett és feldolgozott környezeti minták, illetve a mintákból származó *Acinetobacter* törzsek

Mintavételi helyszín	Mintavétel ideje	Minta jellege	Minták száma	Izolált <i>Acinetobacter</i> törzsek
Tiszaújváros	2008.11.19	felszín alatti víz	2	TN6
Tiszaújváros	2009.03.04	felszín alatti víz	3	T3N6
Zalaegerszeg	2009.05.28	felszín alatti víz	4	Z4N3, Z4SZ2
Pétfürdő	2010.04.30	földtani közeg	3	PT2/2, PT3/6
Pétfürdő	2010.05.03	földtani közeg	3	PT3/9
Kunhegyes	2010.11.15	felszín alatti víz	4	
Siklós	2010.11.02	felszín alatti víz	3	
Siklós	2010.11.30	felszín alatti víz	3	
Szigetszentmiklós	2011.02.07	felszíni víz	3	
Siklós	2011.02.08	felszín alatti víz	3	
Balassagyarmat	2011.02.22	felszín alatti víz	3	
Miskolc	2011.03.08	felszín alatti víz	4	
Kunhegyes	2011.03.28	felszín alatti víz	4	
Siklós	2011.03.29	felszín alatti víz	3	
Siklós	2011.04.12	felszín alatti víz	3	
Varsád	2011.04.25	felszíni víz	3	
Polgár	2011.04.28	felszín alatti víz	7	
Zalaegerszeg	2011.05.03	felszín alatti víz	6	
Miskolc	2011.06.07	felszín alatti víz	3	
Siklós	2011.06.21	felszín alatti víz	3	Sk-V/3
Vác	2011.06.22	felszín alatti víz	7	1/2, 5/06/4
Siklós	2011.06.27	felszín alatti víz	3	
Polgár	2011.07.05	felszín alatti víz	4	PM5, PM7, PM13
Siklós	2011.07.12	felszín alatti víz	3	
Békéscsaba	2011.07.26	felszín alatti víz	5	
Hőgyész	2011.08.01	felszíni víz	1	HT-4/1, HT-4/3
Varsád	2011.08.05	felszíni víz	3	II HT-3/1
Hőgyész	2011.08.05	felszíni víz	1	II HT-4/2
Monor	2011.08.02	felszíni víz	2	
Polgár	2011.08.09	felszín alatti víz	4	PM7/3, PM15/3
Orosháza	2011.08.24	felszín alatti víz	6	
Dunavarsány	2011.09.20	felszín alatti víz	6	DM-5/1
Vác	2011.09.20	felszín alatti víz	8	
Polgár	2011.09.27	felszín alatti víz	4	
Miskolc	2011.09.27	felszín alatti víz	3	
Siklós	2011.10.04	felszín alatti víz	3	
Bugyi	2011.10.04	felszín alatti víz	4	BUT-8/1
Baracska	2011.10.18	földtani közeg	3	
Polgár	2011.10.25	felszín alatti víz	4	
Miskolc	2011.10.25	felszín alatti víz	3	
Siklós	2011.11.02	felszín alatti víz	2	
Kunhegyes	2011.11.15	felszín alatti víz	4	
Debrecen	2011.11.15	felszín alatti víz	2	
Bugyi	2011.11.22	felszín alatti víz	4	
Balassagyarmat	2011.11.29	felszín alatti víz	2	
Siklós	2011.12.06	felszín alatti víz	2	
Bugyi	2011.12.13	felszín alatti víz	4	
Miskolc	2012.01.17	felszín alatti víz	3	
Bugyi	2012.01.24	felszín alatti víz	4	
Siklós	2012.01.21	felszín alatti víz	2	
Kunhegyes	2012.02.07	felszín alatti víz	4	
Siklós	2012.02.20	felszín alatti víz	2	ST-2
Bugyi	2012.02.28	felszín alatti víz	4	
Bábolna	2012.03.01	felszín alatti víz	2	
Balassagyarmat	2012.03.06	felszín alatti víz	3	
Siklós	2012.03.19	felszín alatti víz	2	
Bugyi	2012.03.27	felszín alatti víz	4	

Mintavételi helyszín	Mintavétel ideje	Minta jellege	Minták száma	Izolált <i>Acinetobacter</i> törzsek
Bugyi	2012.04.10	felszín alatti víz	4	
Zalaegerszeg	2012.04.17	felszín alatti víz	6	
Siklós	2012.04.24	felszín alatti víz	2	
Miskolc	2012.05.15	felszín alatti víz	3	
Polgár	2012.05.15	felszín alatti víz	5	
Siklós	2012.05.29	felszín alatti víz	2	Sk-V
Vác	2012.06.12	felszín alatti víz	9	5/06, 22, 24, 42
Siklós	2012.06.26	felszín alatti víz	2	
Miskolc	2012.07.20	felszín alatti víz	3	
Siklós	2012.07.24	felszín alatti víz	2	
Bugyi	2012.08.13	felszín alatti víz	4	
Siklós	2012.08.21	felszín alatti víz	2	
Békéscsaba	2012.09.07	felszín alatti víz	5	
Baracska	2012.09.11	földtani közeg	6	
Baracska	2012.09.11	felszín alatti víz	6	
Siklós	2012.09.18	felszín alatti víz	2	J3, J6
Siklós	2012.10.10	felszín alatti víz	2	
Ebes	2012.10.16	felszín alatti víz	4	
Vác	2012.10.24	felszín alatti víz	9	
Siklós	2012.11.06	felszín alatti víz	2	J5, J7
Füzesabony	2012.11.13	felszín alatti víz	4	J4
Miskolc	2012.11.26	felszín alatti víz	3	
Polgár	2012.11.26	felszín alatti víz	5	
Baja	2012.11.27	felszín alatti víz	9	
Bugyi	2013.02.04	felszín alatti víz	4	
Miskolc	2013.04.12	felszín alatti víz	7	
Marcali	2013.05.15	felszín alatti víz	2	J2
Varsád	2013.06.27	felszíni víz	4	6/1, 6/2
Kölesd	2013.06.27	felszíni víz	1	SV/1
Baja	2013.07.01	felszín alatti víz	13	
Miskolc	2013.07.02	felszín alatti víz	7	
Siklós	2013.07.09	felszín alatti víz	2	
Marcali	2013.07.16	felszín alatti víz	2	
Dunavarsány	2013.08.06	felszín alatti víz	4	
Bugyi	2013.08.13	felszín alatti víz	4	
Siklós	2013.08.27	felszín alatti víz	2	
Sármellék	2013.09.03	felszín alatti víz	4	
Békéscsaba	2013.09.10	felszín alatti víz	5	
Miskolc	2013.09.17	felszín alatti víz	7	
Siklós	2013.09.24	felszín alatti víz	2	
Siklós	2013.10.31	felszín alatti víz	2	ST-2/1
Marcali	2013.11.05	felszín alatti víz	2	MT-6, FK-3/0, FK-3/1
Hatvan	2013.11.15	szennyvíz	3	
Jászberény	2013.11.15	szennyvíz	3	JBBV
Beled	2014.01.21	felszín alatti víz	2	BLT-11
Varsád	2015.01.30	felszíni víz	4	
Gödöllő	2016.04.14	reték, sárgarépa, zeller	5	R kenet, R10 ⁶
Gödöllő	2016.04.21	reték, sárgarépa, zeller	5	
Balatonszepezd	2017.03.19	felszíni víz	1	B136
Varsád	2017.03.23	felszíni víz	3	HF13, HF35
Hajdúszoboszló	2017.04.05	felszíni víz	2	HF67
Marcali	2017.05.08	halfekély (ponty)	3	MF4

	Vizsgált magyarországi minták száma	Minták száma, melyekből kimutattam <i>Acinetobacter</i> törzset	Izolált <i>Acinetobacter</i> törzsek száma
Összesen	403	41	49
felszín alatti víz	341	27	31
felszíni víz	28	8	11
földtani közeg	15	3	3
egyéb	19	3	4

Unikális helyről származó minták

Mintavételi helyszín	Mintavétel ideje	Minta jellege	Minták száma	Izolált <i>Acinetobacter</i> törzsek
Arusha, Tanzánia	2014.01.28	földtani közeg	4	TZCO3
Selous, Tanzánia	2014.02.01	földtani közeg	4	TZSO1

A kutatás során izolált, identifikált, valamint vizsgálatba vont (antibiotikum rezisztencia, hemolitikus, aktivitás, biofilm képző képesség) *Acinetobacter* nemzetséghez tartozó törzsek izolálási és azonosítási adatai

Törzs jele	Faj	Risk group ⁸	Mintavétel időpontja	Mintavétel helye	Minta jellege	%-os hasonlóság a legközelebbi rokon faj típus törzs 16S rDNS szekvenciájával (bp)
1 Sk-V/3	<i>A. baumannii</i>	2	2011.06.21	Siklós	felszín alatti víz	99,62% (1321)
2 HT-4/1	<i>A. baumannii</i>	2	2011.08.01	Högyész	felszíni víz	100% (596)
3 HT-4/3	<i>A. baumannii</i>	2	2011.08.01	Högyész	felszíni víz	99,66% (595)
4 II HT-3/1	<i>A. baumannii</i>	2	2011.08.05	Varsád	felszíni víz	99,68% (630)
5 JBBV	<i>A. baumannii</i>	2	2013.11.15	Jászberény	felszíni víz	99,38% (604)
6 TZSO1	<i>A. baumannii</i>	2	2014.02.01	Selous, Tanzánia	földtani közeg	98,59% (659)
7 PM 15/3	<i>A. pittii</i>	2	2011.08.09	Polgár	felszín alatti víz	99,85% (1368)
8 BUT-8/1	<i>A. pittii</i>	2	2011.10.04	Bugyi	felszín alatti víz	99,72% (652)
9 J2	<i>A. pittii</i>	2	2013.05.15	Marcali	felszín alatti víz	99,73% (751)
10 TZCO3	<i>A. pittii</i>	2	2014.01.28	Arusha, Tanzánia	földtani közeg	100% (659)
11 TN6	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2008.11.19	Tiszaújváros	felszín alatti víz	98,63% (660)
12 1/2	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2011.06.22	Vác	felszín alatti víz	99,7% (1321)
13 5/06/4	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2011.06.22	Vác	felszín alatti víz	99,62% (1326)
14 PM 5	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2011.07.05	Polgár	felszín alatti víz	100% (1314)
15 PM 7	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2011.07.05	Polgár	felszín alatti víz	99,85% (1321)
16 PM 13	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2011.07.05	Polgár	felszín alatti víz	99,7% (1323)
17 PM 7/3	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2011.08.09	Polgár	felszín alatti víz	100% (1377)
18 DM-5/1	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2011.09.20	Dunavarsány	felszín alatti víz	100% (664)
19 Sk-V	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2012.05.29	Siklós	felszín alatti víz	99,84% (623)
20 5/06	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2012.06.12	Vác	felszín alatti víz	99,85% (647)
21 22	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2012.06.12	Vác	felszín alatti víz	100% (623)
22 24	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2012.06.12	Vác	felszín alatti víz	100% (678)
23 42	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2012.06.12	Vác	felszín alatti víz	99,69% (650)
24 J5	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2012.11.06	Siklós	felszín alatti víz	100% (642)
25 J7	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2012.11.06	Siklós	felszín alatti víz	100% (717)
26 J4	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2012.11.13	Füzesabony	felszín alatti víz	99,18 (732)
27 ST-2/1	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2013.10.31	Siklós	felszín alatti víz	99,91% (621)
28 FK-3/0	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2013.11.05	Marcali	felszín alatti víz	100% (632)
29 BLT-11	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2014.01.21	Beled	felszín alatti víz	100% (569)
30 SV/1	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2013.06.27	Kölesd	felszíni víz	100% (666)
31 PT 2/2	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2010.04.30	Pétfürdő	földtani közeg	100% (451)
32 PT 3/6	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2010.04.30	Pétfürdő	földtani közeg	99,38% (482)
33 PT 3/9	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2010.05.03	Pétfürdő	földtani közeg	99,76% (461)
34 R kenet	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2016.04.14	Gödöllő	zöldség	99,85% (623)
35 R 10^0	<i>A. calcoaceticus</i>	2	2016.04.14	Gödöllő	zöldség	100% (636)
36 T3N6	<i>A. beijerinckii</i>	2	2009.03.04	Tiszaújváros	felszín alatti víz	99,69% (651)
37 Z4N3	<i>A. beijerinckii</i>	2	2009.05.28	Zalaegerszeg	felszín alatti víz	99,43% (666)
38 HF67	<i>A. bohemicus</i>	1	2017.04.05	Hajdúszoboszló	felszíni víz	99,85% (617)
39 MF4	<i>A. bohemicus</i>	1	2017.05.08	Marcali	halfekély	99,74% (407)

Acinetobacter calcoaceticus-baumannii komplex

⁸ TRBA

Törzs jele	Faj	Risk group ⁹	Mintavétel időpontja	Mintavétel helye	Minta jellege	%-os hasonlóság a legközelebbi rokon faj 16S rDNS szekvenciájával (bp)	
40	6/2	<i>A. gyllenbergii</i>	2	2013.06.27	Varsád	felszíni víz	99,47% (711)
41	Z4SZ2	<i>A. johnsonii</i>	2	2009.05.28	Zalaegerszeg	felszín alatti víz	98,64% (665)
42	ST-2	<i>A. johnsonii</i>	2	2012.02.20	Siklós	felszín alatti víz	98,36% (611)
43	J6	<i>A. johnsonii</i>	2	2012.09.18	Siklós	felszín alatti víz	98,82% (768)
44	MT-6	<i>A. johnsonii</i>	2	2013.11.05	Marcali	felszín alatti víz	99,72% (616)
45	FK-3/1	<i>A. johnsonii</i>	2	2013.11.05	Marcali	felszín alatti víz	99,53% (620)
46	6/1	<i>A. johnsonii</i>	2	2013.06.27	Varsád	felszíni víz	97,91% (526)
47	HF13	<i>A. lwoffii</i>	2	2017.03.23	Varsád	felszíni víz	97,93% (516)
48	J3	<i>A. radioresistens</i>	1	2012.09.18	Siklós	felszín alatti víz	99,74% (769)
49	B136	<i>A. radioresistens</i>	1	2017.03.19	Balatonszepezd	felszíni víz	99,8% (487)
50	HF35	<i>A. seifertii</i>	2	2017.03.23	Varsád	felszíni víz	98,63% (485)
51	II HT-4/2	<i>A. soli</i>	2	2011.08.05	Högyész	felszíni víz	100% (609)

⁹ TRBA

4.SZ. MELLÉKLET: Az *Acinetobacter* törzsek antibiotikum rezisztencia, hemolitikus aktivitás és biofilm képző képesség vizsgálatának eredményei

Törzs jele	Faj	Törzs izolálási mintájának jellege	MIC teszt (µg/mL)																		Biofilm képző képesség																
			Béta-laktám									Aminoglikozid				Fluorokinolon		Polimixín	Tetraciklin						Egyéb												
			Cefalosporin				Karbapenem		Penicillin																												
			cefotaxim	ceftazidim	ceftriaxon	cefepim	imipenem	meropenem	piperacillin	piperacillin/tazob.	ampicillin/szulbaktám	gentamicin	tobramicin	amikacin	netilmicin	ciprofloxacín	levofloxacín	kolisztin	minociklin	tigeciklin	trimetoprim/sulfamet.	CTX	CAZ	CRO	FEP	IMI	MRP	PIP	TZP	AMS	CN	TOB	AK	NET	CI	LEV	CS
1	Sk-V/3	<i>A. baumannii</i>	FAV	8	3	12	2	0.19	0.25	16	8	2	1.5	1.5	2	0.75	0.19	0.38	1	0.125	0.094	0.125	+/-	++	++	+++	++										
2	HT-4/1	<i>A. baumannii</i>	FV	4	3	8	1.5	0.125	0.125	0.094	1	1.5	0.5	1	2	0.5	0.012	0.19	1.5	0.094	<0.016	0.047	-	++	++	+++	+++										
3	HT-4/3	<i>A. baumannii</i>	FV	0.75	2	0.75	2	<0.002	0.19	16	8	1.5	<0.016	1.5	2	0.5	0.094	0.25	1.5	0.064	0.047	0.125	-	+++	+	+++	++										
4	II HT- 3/1	<i>A. baumannii</i>	FV	8	6	3	8	0.19	0.125	24	4	1.5	0.5	0.75	1.5	0.38	0.064	0.19	0.75	0.094	0.047	0.094	-	++	+	++	++										
5	JBBV	<i>A. baumannii</i>	FV	8	3	6	3	1	0.094	8	4	2	2	0.75	1.5	0.5	0.25	0.125	1.5	0.094	0.25	0.125	-	++	+	+	++										
6	TZSO1	<i>A. baumannii</i>	FK	12	3	8	3	1	0.094	12	4	3	2	1.5	2	0.75	0.38	0.19	1	0.064	0.25	0.19	-	++	+++	+++	+++										
7	ATCC 19606	<i>A. baumannii</i>	seb	16	4	12	16	1	0.38	16	8	1.5	12	4	12	24	0.75	0.5	1	0.064	0.5	6	-	++	+	+++	+++										
8	PM 15/3	<i>A. pittii</i>	FAV	12	2	12	2	0.19	0.25	32	12	2	1	1	2	1	0.19	0.25	1	0.125	0.064	0.064	+/-	++	++	++	+++										
9	BUT-8/1	<i>A. pittii</i>	FAV	12	3	8	4	1	0.38	24	6	1.5	0.75	0.5	1.5	0.5	0.25	0.19	1.5	0.125	0.125	0.064	-	++	++	+++	+++										
10	J2	<i>A. pittii</i>	FAV	16	4	12	6	1	0.25	24	8	1.5	1.5	0.5	1.5	0.38	0.25	0.25	1	0.125	0.064	0.125	-	++	+	+++	+++										
11	TZCO3	<i>A. pittii</i>	FK	12	3	8	4	0.75	0.38	24	16	2	0.5	0.5	1	0.38	0.19	0.25	0.75	0.094	0.19	0.047	-	+++	+++	+++	+++										
12	TN6	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	24	6	48	16	0.19	0.25	24	n.d.	n.d.	1	n.d.	n.d.	n.d.	0.38	n.d.	n.d.	n.d.	0.023	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.										
13	1/2	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	16	8	48	4	0.19	0.25	32	n.d.	n.d.	0.75	n.d.	n.d.	n.d.	0.094	n.d.	n.d.	n.d.	0.032	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.										
14	5/06/4	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	24	6	24	6	0.125	0.25	48	n.d.	n.d.	3	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	n.d.	n.d.	n.d.	0.032	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.										
15	PM 5	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	24	6	48	6	0.19	0.19	>256	n.d.	n.d.	1	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	n.d.	n.d.	n.d.	0.047	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.										
16	PM 7	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	16	8	16	4	0.25	0.25	64	n.d.	n.d.	2	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	n.d.	n.d.	n.d.	0.047	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.										
17	PM 13	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	24	6	32	4	0.19	0.38	>256	16	2	0.75	1	1.5	0.25	0.19	0.19	1	0.064	0.032	0.064	-	+++	+	++	+++										
18	PM 7/3	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	12	4	24	2	0.125	0.25	16	n.d.	n.d.	1	n.d.	n.d.	n.d.	0.125	n.d.	n.d.	n.d.	0.047	n.d.	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.										
19	DM-5/1	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	24	4	16	12	0.5	0.25	24	32	2	2	0.75	1.5	0.38	0.5	0.25	1	0.047	0.094	0.125	-	0	0	0	+										

Törzs jele	Faj	Törzs izolálási mintájának jellege	MIC teszt (µg/mL)																			Biofilm képző képesség					
			Béta-laktám									Aminoglikozid				Fluorokinolon		Polimixín	Tetracikline		Egyéb						
			Cefalosporin				Karbapenem		Penicillin			gentamicin	tobramicin	amikacin	netilmicin	ciprofloxacín	levofloxacín		kolisztin	minociklin		tigeciklin	trimethoprim/sulfamet.	Hemolízis (24 h)			
			CTX	CAZ	CRO	FEP	IMI	MRP	PIP	TZP	AMS							CN			TOB				AK	NET	CI
20	Sk-V	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	16	6	12	8	0.5	0.19	32	12	3	1	0.5	1	0.25	0.38	0.25	1	0.064	0.094	0.094	+/-	+	+	+	+
21	5/06	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	48	8	32	16	0.75	0.38	32	16	2	1	0.5	1	0.19	0.38	0.25	1	0.094	0.094	0.125	+/-	+	+	+	0
22	22	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	12	4	16	8	0.5	0.19	32	12	2	0.5	0.5	1.5	0.5	0.38	0.25	1.5	0.125	0.125	0.19	+	+	+	+	+
23	24	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	24	4	24	8	0.5	0.25	32	24	2	1.5	0.75	1	0.5	0.38	0.25	1.5	0.064	0.094	0.125	+/-	0	0	0	0
24	42	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	32	8	16	12	0.75	0.38	32	24	2	0.75	0.75	1	0.5	0.5	0.38	1.5	0.094	0.125	0.19	+/-	+	+	+	0
25	J5	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	24	6	16	16	0.75	0.5	32	16	2	0.75	0.5	1	0.5	0.5	0.25	1.5	0.047	0.0646	0.094	-	+	+	+	0
26	J7	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	32	4	24	12	1	0.25	32	16	2	0.5	1	1.5	0.5	0.75	0.25	1.5	0.094	0.125	0.125	+/-	0	+	0	0
27	J4	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	32	8	16	16	0.75	0.38	24	12	2	1	1	1	0.5	0.38	0.19	0.75	0.094	0.094	0.125	-	+++	+++	+	++
28	ST-2/1	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	16	6	16	8	0.25	0.5	32	32*	2	1	0.75	1	0.038	0.38	0.19	1.5	0.094	0.25	0.047	+/-	0	0	0	0
29	FK-3/0	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	6	3	6	4	0.25	0.25	12	6	1.5	4	0.75	2	1.5	0.25	0.19	1	<0.016	0.125	0.125	+	+	+	+	+
30	BLT-11	<i>A. calcoaceticus</i>	FAV	8	4	12	12	0.5	0.25	24	16	1.5	1	0.75	1.5	0.75	0.38	0.25	3	0.094	0.5	0.047	-	0	0	0	0
31	SV/1	<i>A. calcoaceticus</i>	FV	32	4	16	8	1	0.19	24	8	2	8	0.75	1.5	0.5	0.5	0.25	1	0.094	0.064	0.094	+/-	0	+	+	0
32	PT 2/2	<i>A. calcoaceticus</i>	FK	16	4	32	3	0.125	0.38	24	n.d.	n.d.	1	n.d.	n.d.	n.d.	0.25	n.d.	n.d.	n.d.	0.032	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
33	PT 3/6	<i>A. calcoaceticus</i>	FK	12	4	24	4	0.125	0.25	32	6	1.5	1.5	0.75	1.5	0.75	0.19	0.38	1	0.064	0.047	0.064	+/-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
34	PT 3/9	<i>A. calcoaceticus</i>	FK	8	3	16	2	0.125	0.25	32	n.d.	n.d.	0.38	n.d.	n.d.	n.d.	0.19	n.d.	n.d.	n.d.	0.047	n.d.	+/-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
35	R kenet	<i>A. calcoaceticus</i>	Z	12	2	6	3	0.38	n.d.	12	6	n.d.	0.5	0.5	1	0.38	0.19	0.19	1.5	n.d.	n.d.	n.d.	-	+	+	0	0
36	R 10^0	<i>A. calcoaceticus</i>	Z	12	1.5	12	4	0.25	n.d.	24	12	n.d.	0.19	0.25	0.75	0.38	0.25	0.19	1	n.d.	n.d.	n.d.	-	0	0	0	0
37	T3N6	<i>A. beijerinckii</i>	FAV	>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	+++	+	+	0	+
38	Z4N3	<i>A. beijerinckii</i>	FAV	1.5	3	4	1.5	0.094	0.75	12	0.023	0.5	0.19	0.19	0.38	0.094	0.125	0.125	0.75	0.047	0.094	0.012	++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Törzs jele	Faj	Törzs izolálási mintájának jellege	MIC teszt (µg/mL)																		Hemolízis (24 h)	Biofilm képző képesség					
			Béta-laktám									Aminoglikozid				Fluorokinolon		Polimixín	Tetracikline			Egyéb	24h	48h	72h	96h	
			Cefalosporin				Karbapenem		Penicillin			gentamicin	tobramicin	amikacin	netilmicin	ciprofloxacín	levofloxacín	kolisztin	minociklin	tigeciklin		trimethoprim/sulfamet.					
			CTX	CAZ	CRO	FEP	IMI	MRP	PIP	TZP	AMS																CN
39	HF67	<i>A. bohemicus</i>	FV	4	3	3	0.75	0.094	0.094	4	1.5	0.75	0.094	0.094	0.125	0.094	0.064	0.125	0.75	0.032	0.064	0.016	-	0	0	0	0
40	MF4	<i>A. bohemicus</i>	H	4	1.5	1.5	0.5	0.094	0.032	2	<0.016	0.38	0.094	0.125	0.125	0.125	0.047	0.064	0.5	<0.016	0.047	0.012	-	0	0	0	0
41	6/2	<i>A. gyllenbergii</i>	FV	128	128	24	32	0.75	0.064	>256	0.064	1.5	0.125	0.19	0.125	0.064	0.38	0.064	1	<0.016	0.023	0.032	-	+	0	0	+
42	Z4S22	<i>A. johnsonii</i>	FAV	6	12	3	8	0.125	0.19	8	4	0.5	0.5	0.5	0.25	0.047	0.125	0.75	<0.016	<0.016	0.047	++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
43	ST-2	<i>A. johnsonii</i>	FAV	8	8	1.5	16	0.75	0.38	24	<0.016	0.5	0.75	0.75	0.19	0.125	0.094	0.75	0.016	0.047	0.125	-	++	++	++	+	
44	J6	<i>A. johnsonii</i>	FAV	>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	-	+	0	0	+
45	MT-6	<i>A. johnsonii</i>	FAV	3	4	1	6	0.38	0.19	3	1.5	2	0.032	0.064	0.094	0.032	0.125	0.047	0.38	<0.016	0.047	0.023	+	0	0	0	0
46	FK-3/1	<i>A. johnsonii</i>	FAV	2	3	0.38	1.5	0.125	0.094	2	3	0.019	0.38	1	1	0.25	0.094	0.125	0.38	<0.016	0.064	0.023	+	0	0	0	0
47	6/1	<i>A. johnsonii</i>	FV	>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	-	+	0	+	0
48	HF13	<i>A. lwoffii</i>	FV	2	4	3	1	0.047	0.047	4	<0.016	0.19	0.032	0.023	0.064	0.047	0.047	0.047	0.5	<0.016	0.023	0.004	-	0	0	0	0
49	J3	<i>A. radioresistens</i>	FAV	1	0.5	1.5	0.5	3	0.094	>256	6	1.5	1	0.5	1.5	0.19	0.094	0.19	1	0.047	0.032	0.125	-	+	0	0	+
50	B136	<i>A. radioresistens</i>	FV	1.5	0.75	3	0.25	0.19	0.19	12	0.016	0.75	0.25	0.38	0.75	0.19	0.094	0.19	1	0.023	0.064	0.047	-	+	0	0	0
51	HF35	<i>A. seifertii</i>	FV	0.75	0.75	0.75	0.125	0.125	0.008	0.125	0.032	0.032	0.023	0.064	0.064	0.047	0.047	0.094	0.5	0.047	0.094	1	-	+	0	0	0
52	II HT-4/2	<i>A. soli</i>	FV	3	1.5	2	4	0.064	0.125	>256	0.38	1	0.25	1	2	0.5	0.032	0.064	1.5	0.047	<0.016	0.016	++	++	++	++	++

Jelmagyarázat

Minta jellege	Antibiotikum rezisztencia kategória besorolása	Hemolízis	Biofilm képző képesség
FAV – felszín alatti víz, FV – felszíni víz, FK – földtani közeg, Z – zöldség, H – hal	érzékeny	+/- kétséges hemolízis	0 nincs biofilm képző képesség
	átmeneti rezisztens	+ gyenge hemolízis	+ gyenge biofilm képző képesség
	rezisztens	++ hemolízis +++ intenzív hemolízis	++ közepes biofilm képző képesség +++ erős biofilm képző képesség

6. SZ. MELLÉKLET:

A kutatás során, *P. aeruginosa* izolálás céljából 2010 és 2018 között vett és feldolgozott felszíni vízminták és az izolált törzsek

Mintavételi helyszín	Mintavétel ideje	Minta jellege	Minták száma	Izolált <i>P. aeruginosa</i> törzsek
Varsád	2010.04.26	felszíni víz	1	P164
Balatonszepezd	2016.10.16	felszíni víz	1	
Endrédi-patak	2016.11.29	felszíni víz	1	
Pogányvölgyi-víz	2016.11.29	felszíni víz	1	
Nagyberek	2016.11.29	felszíni víz	1	
Egervíz	2016.11.29	felszíni víz	1	
Lesence-patak	2016.11.29	felszíni víz	1	
Varsád	2017.03.23	felszíni víz	2	
Szeged	2017.03.30	felszíni víz	2	P211
Hajdúszoboszló	2017.04.05	felszíni víz	2	
Maconka	2017.04.07	felszíni víz	2	
Irmapuszta	2017.04.12	felszíni víz	2	
Marcali	2017.05.08	felszíni víz	3	
Szőlősi-séd	2017.06.27	felszíni víz	1	
Egervíz (71-es út)	2017.06.27	felszíni víz	1	
Tapolca-patak (Tapolca város szennyvíztisztító után)	2017.06.27	felszíni víz	1	P204
Lesence-patak (71-es út)	2017.06.27	felszíni víz	1	
Tapolca-patak (71-es út)	2017.06.27	felszíni víz	1	
Zala folyó (Zalaegerszeg)	2017.06.27	felszíni víz	1	
Zalaapáti (Zala folyó)	2017.06.27	felszíni víz	1	
Kis-Balaton 4T	2017.06.27	felszíni víz	1	
Keszthelyi szennyvíztisztító alatt (Gyöngyös-patak)	2017.06.27	felszíni víz	1	
Zala folyó (torkolat)	2017.06.27	felszíni víz	1	
Nyugati-övcsatorna (Balatonkeresztúr)	2017.06.27	felszíni víz	1	
Sári-csatorna	2017.06.27	felszíni víz	1	
Boronkai-patak (Marcali tározó kifolyó után)	2017.06.27	felszíni víz	1	P205
Balatonfenyvesi nyomóárok	2017.06.27	felszíni víz	1	
Pogányvölgyi-víz (Fonyód)	2017.06.27	felszíni víz	1	P206, P207, P208
Zardavári keleti kifolyó (Balatonboglár)	2017.06.27	felszíni víz	1	
Jamai-patak (Balatonboglár)	2017.06.27	felszíni víz	1	
Irmapusztai-elfolyó (Balatonlelle)	2017.06.27	felszíni víz	1	
Köröshegyi-séd (Balatonföldvár)	2017.06.27	felszíni víz	1	
Sió-csatorna (Siófok)	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balatonszepezd	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - A1	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - A2	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - A3	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - A4	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - A5	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - Z1	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - Z2	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - Z3	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - Z4	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - Z5	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - SZ1	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - SZ2	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - SZ3	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - SZ4	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balaton - SZ5	2017.06.27	felszíni víz	1	
Balatonszepezd	2017.07.23	felszíni víz	1	P209, P210
Balatonszepezd	2017.09.03	felszíni víz	1	
Irmapuszta	2017.10.10	felszíni víz	3	
Szeged	2017.10.19	felszíni víz	2	
Maconka	2017.10.24	felszíni víz	3	
Marcali	2017.10.30	felszíni víz	3	
Hajdúszoboszló	2017.11.09	felszíni víz	2	
Varsád	2017.11.14	felszíni víz	3	

Mintavételi helyszín		Minta jellege	Minták száma	Izolált <i>P. aeruginosa</i> törzsek
Sió-csatorna (Siófok)	2018.04.10.	felszíni víz	1	
Pogányvölgyi-víz (Fonyód)	2018.04.10.	felszíni víz	1	
Fenyvesi-nyomóárok	2018.04.10.	felszíni víz	1	
Nyugati-övcsatorna	2018.04.10.	felszíni víz	1	
Zala (torkolat)	2018.04.10.	felszíni víz	1	
Lesence-patak (71-es út)	2018.04.10.	felszíni víz	1	
Tapolca-patak	2018.04.10.	felszíni víz	1	
Balatonszepezd	2018.04.10.	felszíni víz	1	
Akasztó	2018.05.14	felszíni víz	2	
Balatonszepezd	2018.07.09	felszíni víz	1	
Balatonszepezd	2018.08.07	felszíni víz	1	
Révfülöp, szennyvíztiszt.		felszíni víz	1	
Balatonszepezd	2018.09.25	felszíni víz	1	
Akasztó	2018.10.08	felszíni víz	2	
Balatonszepezd		felszíni víz	1	
Révfülöp, szennyvíztiszt.	2018.10.30	felszíni víz	1	
		Feldolgozott felszíni vízminta	Felszíni vízminták száma, melyekből kimutattam <i>P. aeruginosa</i> törzset	Izolált <i>P. aeruginosa</i> törzsek száma
Összesen		92	6	9

A kutatás során környezeti mintákból izolált, identifikált *Pseudomonas aeruginosa* törzsek izolálási és azonosítási adatai, melyeknél antibiotikum rezisztencia, hemolitikus aktivitás és biofilm képző képességet vizsgáltam

	Törzs jele	Faj	Mintavétel időpontja	Mintavétel helye	Minta jellege
1	P126	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
2	P143	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
3	P146	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Békéscsaba	CH szennyezett felszín alatti víz
4	P150	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
5	P153	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
6	P156	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
7	P157	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Székesfehérvár	CH szennyezett felszín alatti víz
8	P160	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Balassagyarmat	CH szennyezett felszín alatti víz
9	P165	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Zalaegerszeg	CH szennyezett felszín alatti víz
10	P167	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Orosháza	CH szennyezett felszín alatti víz
11	P168	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
12	P169	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Orosháza	CH szennyezett felszín alatti víz
13	P170	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Polgár	CH szennyezett felszín alatti víz
14	P171	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Orosháza	CH szennyezett felszín alatti víz
15	P172	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Békéscsaba	CH szennyezett felszín alatti víz
16	P173	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
17	P174	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Békéscsaba	CH szennyezett felszín alatti víz
18	P175	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
19	P176	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Miskolc	CH szennyezett felszín alatti víz
20	P177	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Miskolc	CH szennyezett felszín alatti víz
21	P178	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Miskolc	CH szennyezett felszín alatti víz
22	P179	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
23	P180	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
24	P181	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Bugyi	CH szennyezett felszín alatti víz
25	P182	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
26	P183	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
27	P184	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
28	P185	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Polgár	CH szennyezett felszín alatti víz
29	P186	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Székesfehérvár	CH szennyezett felszín alatti víz
30	P187	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Bugyi	CH szennyezett felszín alatti víz
31	P188	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
32	P189	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Polgár	CH szennyezett felszín alatti víz
33	P190	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Békéscsaba	CH szennyezett felszín alatti víz
34	P164	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Varsád	felszíni víz
35	P204	<i>P. aeruginosa</i>	2017.	Tapolca-patak	felszíni víz
36	P205	<i>P. aeruginosa</i>	2017.	Boronkai-patak	felszíni víz
37	P206	<i>P. aeruginosa</i>	2017.	Pogányvölgyi-víz (Fonyód)	felszíni víz
38	P207	<i>P. aeruginosa</i>	2017.	Pogányvölgyi-víz (Fonyód)	felszíni víz
39	P208	<i>P. aeruginosa</i>	2017.	Pogányvölgyi-víz (Fonyód)	felszíni víz
40	P209	<i>P. aeruginosa</i>	2017.	Balatonszepezd	felszíni víz
41	P210	<i>P. aeruginosa</i>	2017.	Balatonszepezd	felszíni víz
42	P211	<i>P. aeruginosa</i>	2017.	Szeged	felszíni víz
43	P141	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett földtani közeg

	Törzs jele	Faj	Mintavétel időpontja	Mintavétel helye	Minta jellege
44	P142	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett földtani közeg
45	P144	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett földtani közeg
46	P145	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett földtani közeg
47	P147	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett földtani közeg
48	P148	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett földtani közeg
49	P149	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett földtani közeg
50	P154	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett földtani közeg
51	P155	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett földtani közeg
52	P158	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett földtani közeg
53	P159	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett földtani közeg
54	P161	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett földtani közeg
55	P162	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett földtani közeg
56	P127	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
57	P128	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
58	P129	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
59	P130	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
60	P131	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
61	P132	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
62	P133	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
63	P134	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
64	P135	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
65	P136	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
66	P137	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
67	P138	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
68	P139	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
69	P140	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
70	P151	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Kecskemét	komposzt
71	P152	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Kecskemét	komposzt
72	P163	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Kecskemét	komposzt
73	P166	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Kecskemét	komposzt

CH – szénhidrogén

7.SZ. MELLÉKLET: A *P. aeruginosa* törzsek antibiotikum rezisztencia, hemolitikus aktivitás és biofilm képző képesség vizsgálatának eredményei

Törzs jele	Környezeti minta jellege	MIC teszt (µg/mL)													Hemolízis (24H)	Biofilm képző képesség			
		Béta-laktám							Aminoglikozid			Fluorokinolon		Polimixin		24h	48h	72h	96h
		Cefalosporin			Karbapenem		Penicillin		Gentamicin	Amikacin	Tobramicin	Ciprofloxacín	Ofloxacín						
		cefoperazone sub.	Ceftazidim	Cefepim	Imipenem	Meropenem	Piperacillin	Piperacillin/ tazob.											
CPS	CAZ	FEP	IMI	MRP	PIP	TZP	CN	AK	TOB	CIP	OFX	CS							
1	P126	2	1	2	8	0,38	4	3	2	6	0,75	0.19	1	3	+++	+++	++	++	+
2	P143	24	3	3	1.5	4	16	12	1.5	3	0,5	0.094	0.75	2	++	+	+	+	+
3	P146	4	1.0	3	6	0,19	6	4	6	8	1	0.125	0.75	4	++	++	+	++	+++
4	P150	3	1.0	2	4	0,25	3	3	3	6	1	0.19	0.75	2	++	++	+	0	0
5	P153	6	1	2	4	0,19	3	3	3	12	1,5	0.125	1	2	+++	0	0	+	++
6	P156	4	0.5	0.75	0.5	0,016	3	0,75	0.19	0,38	0,19	0.064	0.19	1,5	-	+++	+	+	+
7	P157	3	1	3	8	0,125	4	1,5	2	4	0,5	0.094	0.5	4	+++	++	0	+	0
8	P160	3	1	2	4	0,5	3	6	2	3	0,7	0.094	0.5	3	+++	+	+	+	+
9	P165	3	1	3	>32	2	3	2	2	4	0,75	0.094	0.25	1,5	+	++	0	+	+
10	P167	4	1	3	6	0,75	4	4	3	4	0,75	0.094	1	4	++	+	0	+++	+++
11	P168	4	0.75	3	>32	2	3	4	1.5	4	0,5	0.19	0.75	3	+	++	+	++	+++
12	P169	4	1	4	4	0,125	4	4	1.5	1,5	0,5	0.19	1	3	++	+++	++	+	0
13	P170	6	1*	3*	12	0,75	6	6	3	8	1	0.094	0.75	6	+/-	+++	++	+++	+++
14	P171	2	1	2	4	0,75	2	4	1.5	6	0,75	0.125	0.5	3	++	++	+	+	+
15	P172	3	0.75	2	3	0,5	2	3	2	8	1	0.125	0.75	6	++	+++	+	+	+
16	P173	4	1	2	4	0,25	2	4	1.5	6	0,75	0.19	0.75	3	+++	++	+	+	+++
17	P174	3	0.75	2	4	0,38	3	4	1.5	6	1	0.125	0.5	3	+++	++	+	++	+++
18	P175	4	1	3	6	0,5	4	3	4	8	1	0.19	0.75	4	+	++	+	++	+++
19	P176	4	1	3	6	0,25	4	3	3	8	0,75	0.125	0.5	3	++	+++	++	+++	+
20	P177	3	0.75	2	3	0,38	6	4	2	4	1	0.094	0.094	3	+++	++	+	++	+
21	P178	2	1	2	>32	1,5	4	3	2	8	1	0.094	0.094	4	++	+++	++	0	+
22	P179	3	0.75	2	4	0,38	3	4	2	4	1	0.125	0.125	4	++	++	+	++	+
23	P180	1.5	0.75	1.5	6	0,38	3	6	3	12	1,5	0.125	0.125	3	++	++	++	+	+++
24	P181	3	1.5	1.5	8	0,38	4	4	3	12	1	0.125	0.5	3	+++	+	0	0	+++
25	P182	4	1	3	>32	0,5	4	4	3	8	0,75	0.125	0.5	4	+++	+	0	0	+++
26	P183	2	0.75	1.5	4	0,25	3	3	1.5	6	1,5	0.094	0.38	2	+++	++	++	+++	+++
27	P184	0.75	0.5	3	2	0,19	2	6	1.5	4	0,75	0.19	0.5	4	+	++	++	++	+
28	P185	4	1	3	1,5	0,25	4	3	1.5	4	0,75	0.125	0.38	1,5	+++	+	+++	++	0
29	P186	3	0.75	3	6	0,094	6	4	3	4	1	0.125	0.75	3	+++	+++	+++	+++	+++
30	P187	2	0.75	1.5	6	0,25	3	4	3	3	2	0.125	0.5	1	+++	++	++	++	+
31	P188	3	0.38	3	1,5	0,064	4	6	0.75	2	0,5	0.19	1,5	1,5	++	+++	+	++	+
32	P189	2	0.75	2	2	0,75	3	3	2	4	0,75	0.094	0.75	1	++(+)	+++	++	+++	++
33	P190	3	1	3	1	0,19	6	3	1.5	8	1	0.19	0.75	1	+++	+	+	+	0
34	P164	4	0.75	1.5	6	0,75	4	3	1.5	4	0,5	0.64	0.5	2	+++	0	0	+	+
35	P204	2	1	0.75	4	1	3	2	0.5	2	0,5	0.064	0.38	1	+++	++	+	+	++
36	P205	2	0.75	0.75	1.5	0,19	3	1.5	1	3	0,75	0.094	0.5	1,5	++	++	++	++	+++
37	P206	3	1.5	3	1.5	0,125	4	2	1	4	0,75	0.125	0.5	1,5	+++	+++	+	0	+
38	P207	3	1	1.5	2	0,25	4	2	1	3	1	0.094	1	1,5	++	++	+	0	+
39	P208	3	1.5	2	1.5	2	6	3	1	3	0,75	0.064	0.75	1,5	++	+	+	0	+
40	P209	4	1.5	2	1.5	0,5	4	3	1.5	8	1,5	0.19	1	1,5	+	+++	++	++	++
41	P210	3	1.5	3	1.5	0,75	6	3	2	6	1	0.19	1	1,5	++	+++	+++	+	+++
42	P211	2	1.5	1.5	1.5	0,19	4	2	1	6	0,75	0.125	0.75	1	+++	++	++	+	++

Törzs jele	Környezeti minta jellege	MIC teszt (µg/mL)													Hemolízis (24H)	Biofilm termelő képesség			
		Béta-laktám						Aminoglikozid	Fluorokinolon		Polimixin	24h	48h	72h		96h			
		Cefalosporin			Karbapenem		Penicillin		Ciprofloxacín	Ofloxacin									
		cefoperazone sulb.	Ceftazidim	Cefepim	Imipenem	Meropenem	Piperacillin										Piperacillin/ tazob.		
CPS	CAZ	FEP	IMI	MRP	PIP	TZP	CN	AK	TOB	CIP	OFX				CS				
43	P141	3	1	1.5	6	0,19	4	2	4	4	0,75	0.125	0.75	3	+++	0	+	0	+
44	P142	4	0.75	1.5	6	0,19	4	4	3	8	1,5	0.125	0.75	4	+++	+	0	0	0
45	P144	3	0.5	1	4	0,064	3	2	2	1,5	0,5	0.125	0.5	1,5	+++	++	0	+	+
46	P145	3	1.5	2	6	0,145	4	4	2	6	1	0.19	0.75	6	++	+++	++	+	++
47	P147	4	1.5	4	4	0,25	6	4	4	8	1,5	0.19	1	6	++	+++	+	++	+++
48	P148	3	1.0	3	6	0,25	4	4	3	8	1	0.125	0.5	1,5	++(+)	+	0	+	0
49	P149	4	1.0	4	4	0,38	6	3	3	6	1,5	0.19	1	4	++	+++	+	++	++
50	P154	4	1.5	3	6	0,19	4	2	3	3	0,75	0.19	0.75	2	+++	+	+	++	+
51	P155	3	1	2	4	0,38	4	6	2	3	0,75	0.094	0.50	3	+++	+	+	+	+
52	P158	1.5	0.5	4	4	0,47	4	1	2	3	0,75	0.094	0.5	3	+++	++	0	+	0
53	P159	4	1.5	6	6	0,38	6	3	3	4	1,5	0.19	0.75	3	+(+)	+++	+	++	+++
54	P161	3	0.75	1.5	4	0,38	3	4	1.5	12	1,5	0.19	0.5	4	++	++	+	0	0
55	P162	6	0.75	3	8	0,25	4	4	3	2	0,75	0.19	0.75	2	++	++	++	+++	++
56	P127	4	1.5	3	6	0,5	4	6	1.5	4	0,75	0.19	0.75	4	+++	+++	+++	++	+++
57	P128	4	1	3	6	0,25	4	4	3	6	0,75	0.94	0.75	3	+++	++	++	+	+
58	P129	4	1	3	4	0,25	6	3	2	8	0,75	0.19	1	3	+++	++	++	++	+
59	P130	3	1.5	2	6	0,25	3	3	2	6	1	0.94	0.5	3	+++	+++	+++	+++	++
60	P131	3	0.5	0.75	0.75	0,094	3	1,5	0.25	0,75	0,19	0.032	0.19	1,5	+/-	+++	++	+++	+++
61	P132	8	2	8	6	1	8	16	1.5	6	0,75	0.25	2	4	+++	+	+	0	+
62	P133	4	1.5	3	8	0,5	8	4	3	8	1,5	0.5	1	3	+++	++	+	++	+
63	P134	4	1.5	3	>32	0,38	4	2	4	24	1,5	0.19	1	1,5	+++	+	0	+++	++
64	P135	6	1.5	3	>32	0,094	3	1,5	3	3	1,5	0.5	3	1	+++	+	+	++	+
65	P136	4	1.5	3	3	0,25	3	6	3	8	1	0.19	0.75	2	+++	+++	+++	+++	+++
66	P137	4	1.5	8	4	0,38	6	4	4	12	2	0.25	1	4	+++	+++	+++	+++	++
67	P138	16	3	6	8	2	24	8	4	12	1,5	0.19	2	1,5	++	++	+	+++	+
68	P139	4	2	3	8	0,38	4	4	3	4	0,75	0.125	0.75	3	+++	+++	+	+++	+++
69	P140	4	2	3	4	0,25	8	2	3	8	1	0.19	1	2	+++	+++	+	++	+++
70	P151	3	1	3	3	2	4	6	2	8	1,5	0.125	0.38	4	++	+++	++	++	+++
71	P152	3	1	2	4	0,38	4	4	1.5	4	1	0.094	0.38	3	+++	+++	+	++	+++
72	P163	4	1	3	12	0,125	6	2	2	4	0,75	0.094	0.75	1	+++	++	+	+	+
73	P166	3	1	2	6	0,25	4	4	3	8	1	0.125	0.75	3	++	++	+	++	+
74	KPS-3 seb	2	4	1	1	1	3	4	4	6	1	0.094	1	3	+++	+	+++	+++	++

Jelmagyarázat

Antibiotikum rezisztencia kategória besorolása	Hemolízis	Biofilm képző képesség
érzékeny	+/- kétséges hemolízis	0 nincs biofilm képző képesség
átmeneti rezisztens	+ gyenge hemolízis	+ gyenge biofilm képző képesség
rezisztens	++ hemolízis	++ közepes biofilm képző képesség
	+++ intenzív hemolízis	+++ erős biofilm képző képesség

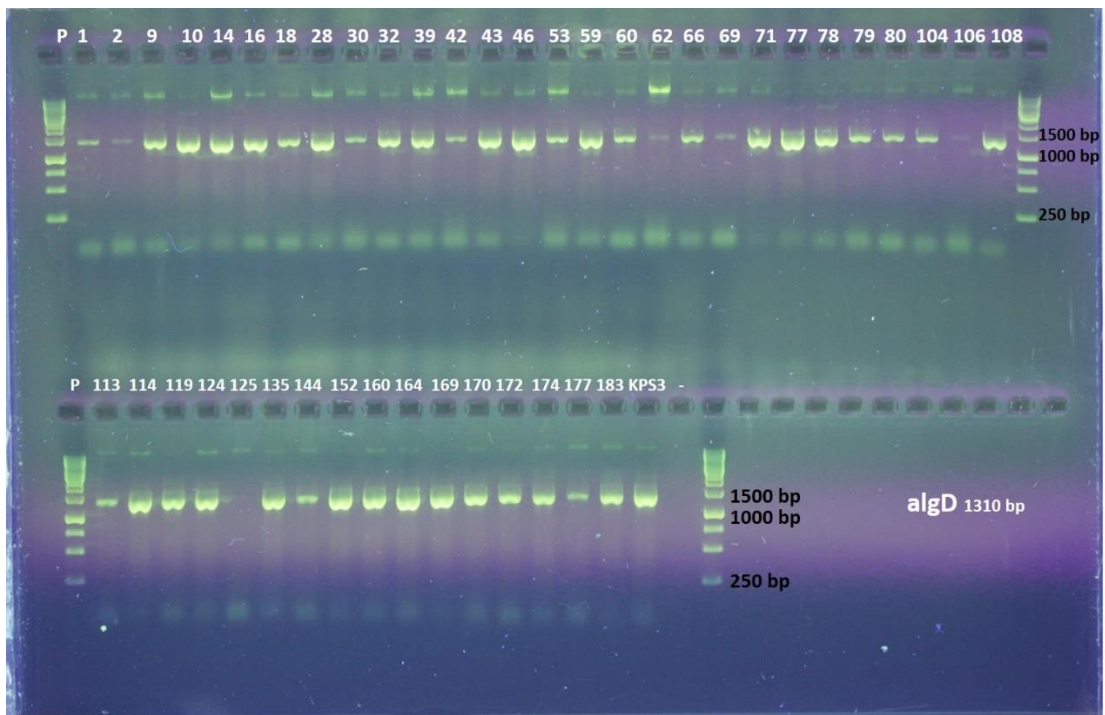
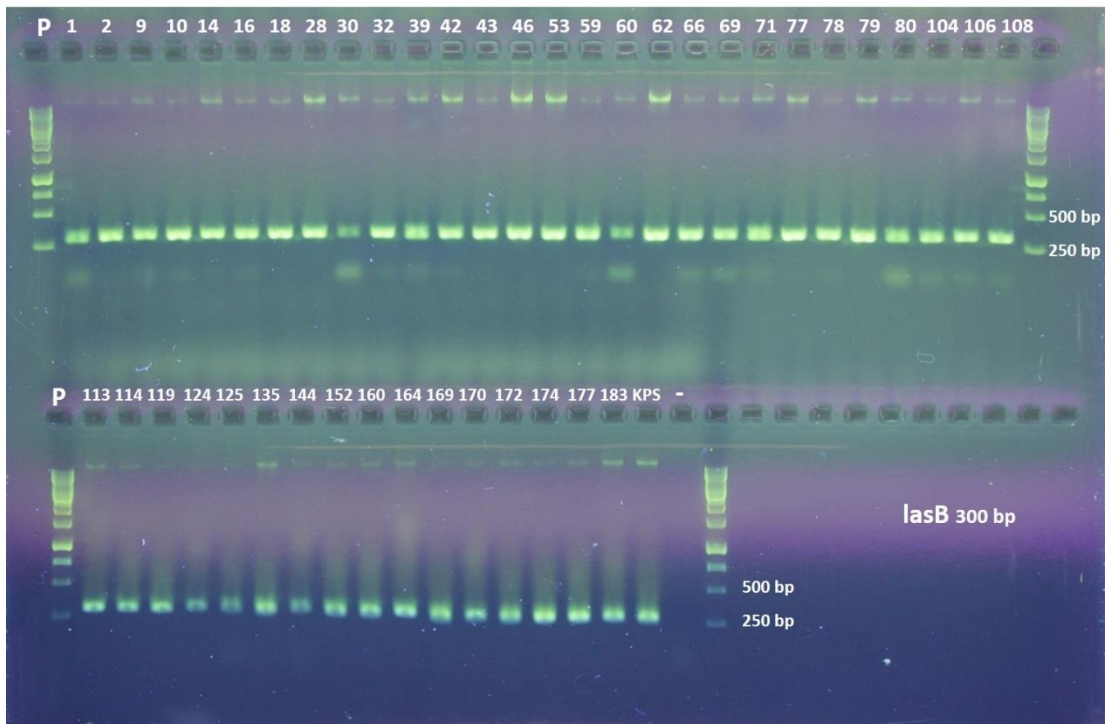
8. SZ. MELLÉKLET A komplex vizsgálatokba vont *P. aeruginosa* törzsek izolálási adatai;
félkövér betűtípus: antibiotikum rezisztenciát mutató törzsek

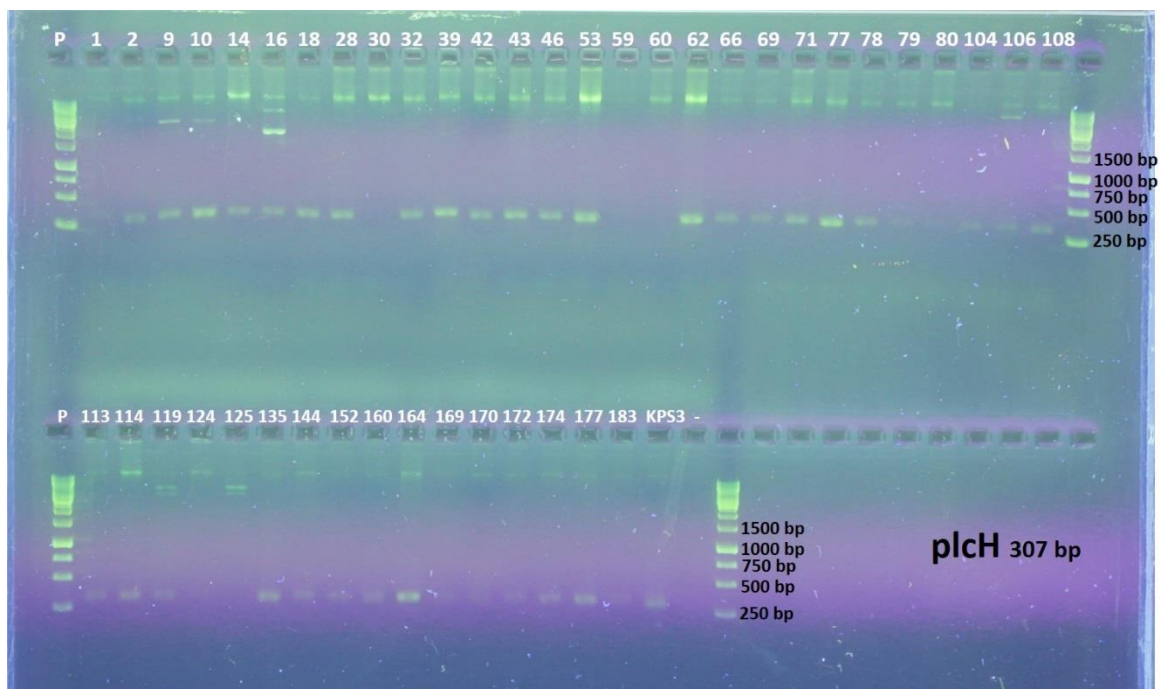
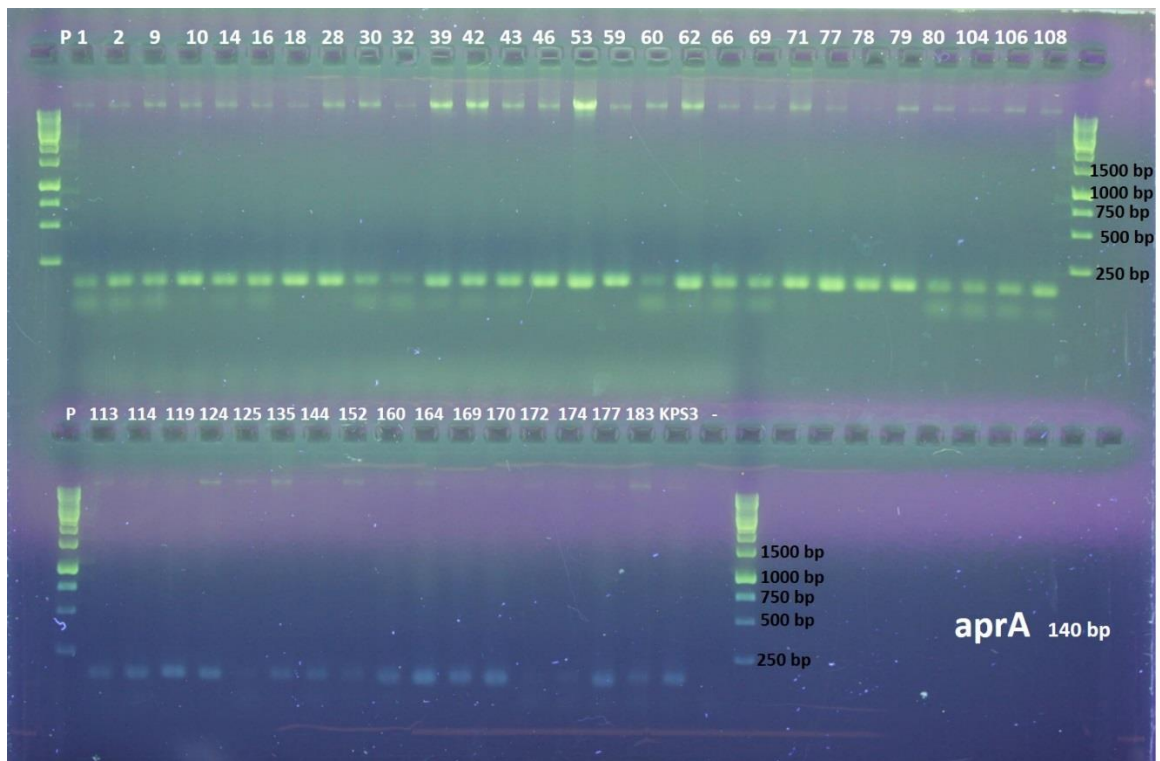
	Törzs jele	Faj	Mintavétel időpontja	Mintavétel helye	Minta jellege
1	P1/ATCC27853	<i>P. aeruginosa</i>	1971.	Boston, USA	emberi vér
2	P2	<i>P. aeruginosa</i>	2002.	Diósd	CH szennyezett felszín alatti víz
3	P3	<i>P. aeruginosa</i>	2008-2009	Órbottyán, ATEV	komposztal kezelt talaj
4	P9	<i>P. aeruginosa</i>	2003.	Diósd	CH szennyezett felszín alatti víz
5	P10	<i>P. aeruginosa</i>	2003.	Diósd	CH szennyezett felszín alatti víz
6	P14	<i>P. aeruginosa</i>	2003.	Tököl	CH szennyezett talaj
7	P16	<i>P. aeruginosa</i>	2003.	Tököl	CH szennyezett talaj
8	P18	<i>P. aeruginosa</i>	2003.	Tököl	komposztal kezelt talaj
9	P28	<i>P. aeruginosa</i>	2003.	Polgár	CH szennyezett talaj
10	P30	<i>P. aeruginosa</i>	2004.	Szabadszállás	CH szennyezett talaj
11	P32	<i>P. aeruginosa</i>	2004.	Komádi	CH szennyezett felszín alatti víz
12	P39	<i>P. aeruginosa</i>	2004.	Algyő	CH szennyezett talaj
13	P42	<i>P. aeruginosa</i>	2005.	Mezőtúr	CH szennyezett talaj
14	P43	<i>P. aeruginosa</i>	2005.	Ópusztaszer	CH szennyezett felszín alatti víz
15	P46	<i>P. aeruginosa</i>	2005.	Budapest	CH szennyezett felszín alatti víz
16	P53	<i>P. aeruginosa</i>	2006.	Zalaegerszeg	CH szennyezett felszín alatti víz
17	P59	<i>P. aeruginosa</i>	2008-2009	Gödöllő	komposztáló, csurgalékvíz
18	P60	<i>P. aeruginosa</i>	2008-2009	Gödöllő	komposztáló, csurgalékvíz
19	P62	<i>P. aeruginosa</i>	2006.	Szarvas	CH szennyezett felszín alatti víz
20	P66	<i>P. aeruginosa</i>	2006.	Zalaegerszeg	CH szennyezett felszín alatti víz
21	P69	<i>P. aeruginosa</i>	2007.	Nagyszénás	CH szennyezett felszín alatti víz
22	P71	<i>P. aeruginosa</i>	2007.	Debrecen	CH szennyezett felszín alatti víz
23	P77	<i>P. aeruginosa</i>	2007.	Zalaegerszeg	CH szennyezett felszín alatti víz
24	P78	<i>P. aeruginosa</i>	2007.	Szarvas	CH szennyezett felszín alatti víz
25	P79	<i>P. aeruginosa</i>	2007.	Szarvas	CH szennyezett felszín alatti víz
26	P80	<i>P. aeruginosa</i>	2007.	Százhalombatta	finomítói szennyvíziszap
27	P104	<i>P. aeruginosa</i>	2008.	Kecskemét	komposzt
28	P106	<i>P. aeruginosa</i>	2008.	Kecskemét	komposzt
29	P108	<i>P. aeruginosa</i>	2008.	Kecskemét	komposzt
30	P113	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Balatonfüzfő	komposzt
31	P114	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Balatonfüzfő	komposzt
32	P119	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Tiszaújváros	szennyvíz
33	P124	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Zalaegerszeg	szennyvíz
34	P125	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Dunaújváros	szennyvíz
35	P135	<i>P. aeruginosa</i>	2009.	Pétfürdő	komposzt
36	P144	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Pétfürdő	CH szennyezett talaj
37	P152	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Kecskemét	komposzt
38	P160	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Balassagyarmat	CH szennyezett felszín alatti víz
39	P164	<i>P. aeruginosa</i>	2010.	Varsád	halastó
40	P169	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Orosháza	CH szennyezett felszín alatti víz
41	P170	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Polgár	CH szennyezett felszín alatti víz
42	P172	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Békéscsaba	CH szennyezett felszín alatti víz
43	P174	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Békéscsaba	CH szennyezett felszín alatti víz
44	P177	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Miskolc	CH szennyezett felszín alatti víz
45	P183	<i>P. aeruginosa</i>	2011.	Siklós	CH szennyezett felszín alatti víz
46	KPS-3	<i>P. aeruginosa</i>	2001-2007	Budapest, Hungary	emberi seb

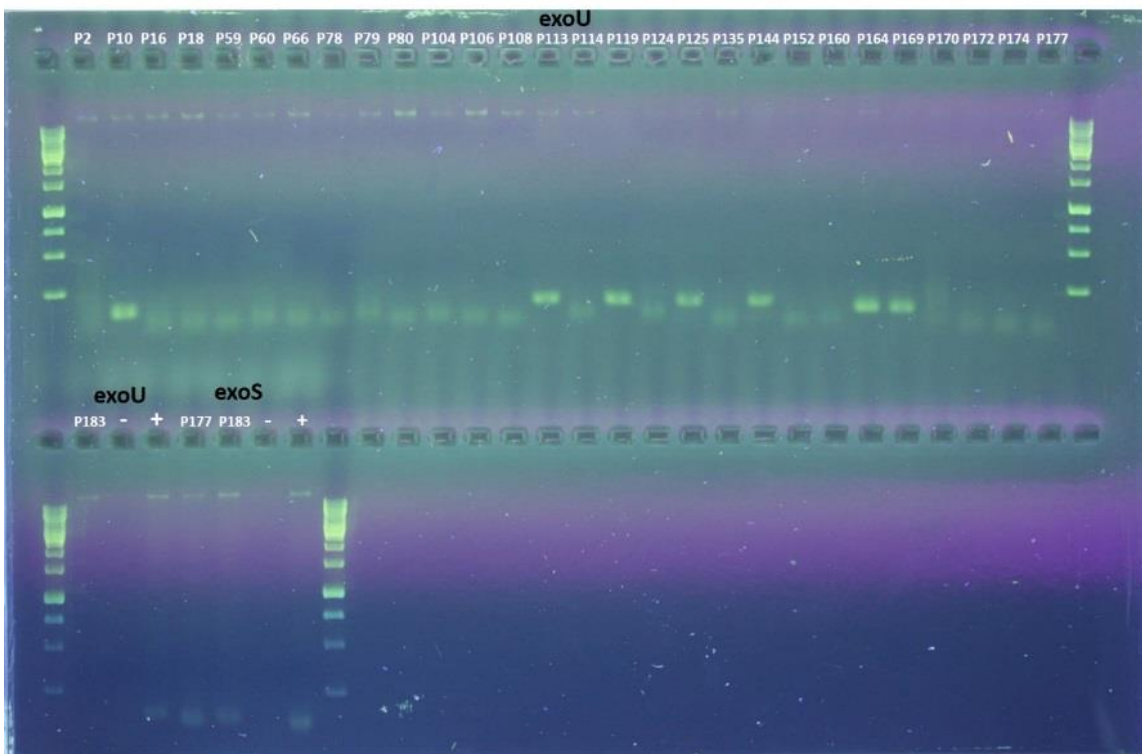
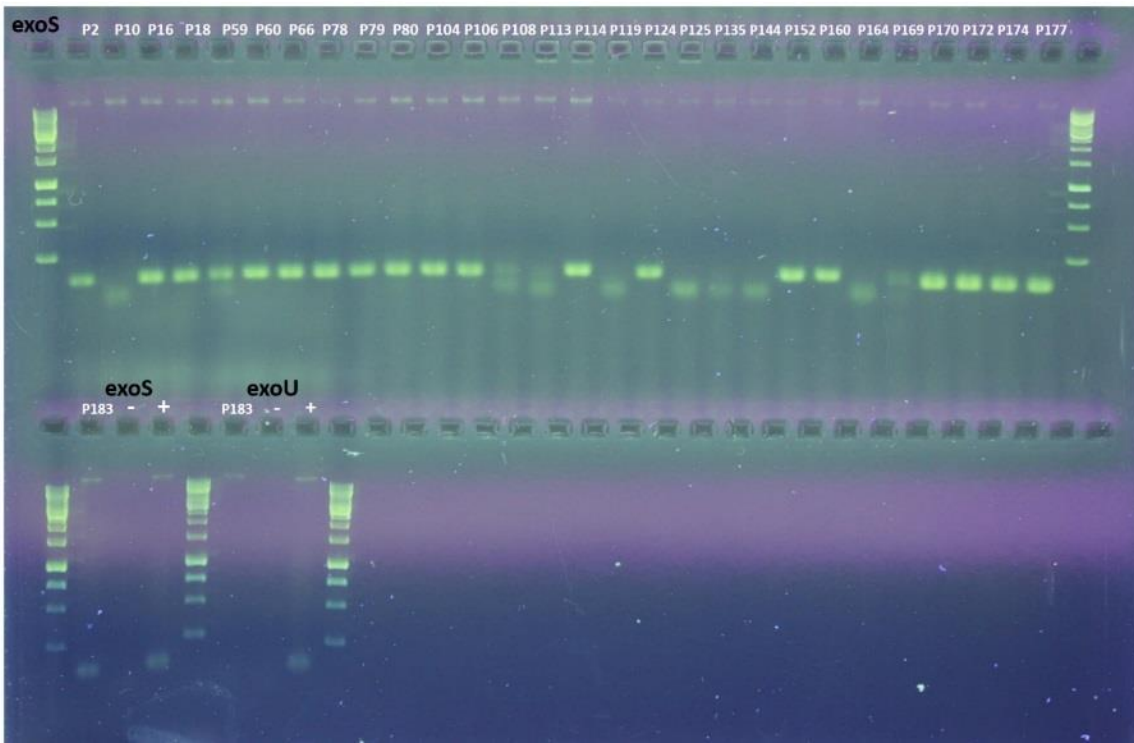
9. SZ. MELLÉKLET: A mikrotiter lemezes módszer és a konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal vizsgált biofilm képzés eredményei

Törzs jelölése		Mikrotiter lemezes módszer (48h)*	A konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készített képek értékelése		
			Dead/Alive**	Struktúra***	
1	P2	+++	A	+++	*0 nincs biofilm termelés, + gyenge biofilm termelés, ++ közepes biofilm termelés, +++ erős biofilm termelés;
2	P3	+	A	+/-	
3	P9	++	A	+	**D-dead/ holt sejtek, A-alive/élő sejtek;
4	P10	+	A	+	
5	P14	+++	D	-	***- nincs struktúra, +/- kétséges, + gyenge struktúra, ++ közepesen erős struktúra, +++ erős struktúra
6	P16	+++	n.d.	n.d.	
7	P18	+	D	-	
8	P28	+++	A	++	
9	P30	++	A	++	
10	P32	+++	A	+	
11	P39	++	A	+	
12	P42	++	A	+/-	
13	P43	+	D	-	
14	P46	+++	A	++	
15	P53	0	D	-	
16	P59	+++	D	-	
17	P60	+++	D	-	
18	P62	+	D	-	
19	P66	+++	D	-	
20	P69	0	D/A	-	
21	P71	+	A	++	
22	P77	++	D	+/-	
23	P78	+	D	-	
24	P79	+++	n.d.	n.d.	
25	P80	++	D	-	
26	P104	++	D	+	
27	P106	+++	A	+++	
28	P108	+++	A	+/-	
29	P113	+	A	+	
30	P114	+	D	-	
31	P119	+++	A	+/-	
32	P124	+	D	+++	
33	P125	++	E	-	
34	P135	+	D	-	
35	P144	0	D	-	
36	P152	+	D	-	
37	P160	+	D	++	
38	P164	0	D	-	
39	P169	++	A	+++	
40	P170	++	D/A	-	
41	P172	+	A	+/-	
42	P174	+	D	-	
43	P177	+	D	+++	
44	P183	+++	D	++	
45	KPS-3	+++	A	+	
46	P1 (ATCC 27853)	++	A	++	

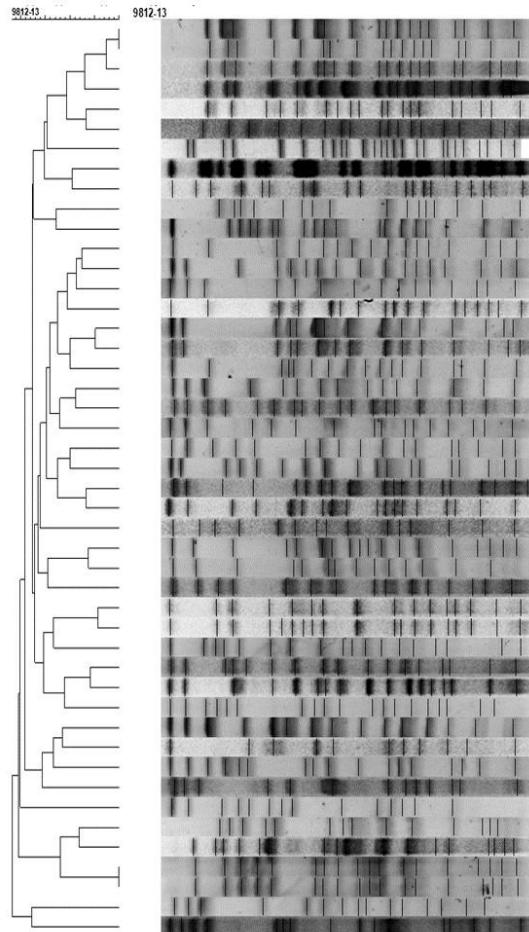
10. SZ. MELLÉKLET: A *P. aeruginosa* törzseken vizsgált virulencia gének PCR termékei – géleképek







11. SZ. MELLÉKLET: A PFGE vizsgálat alapján felállított filogenetikai fa, illetve a vizsgálatba vont 46 *P. aeruginosa* törzs egyéb kísérletekben (szerotípus, motilitás, virulencia *Galleria mellonella* modellen, virulencia gének, hemolitikus aktivitás, biofilm képző képesség mikrotiter lemezes módszerrel) mutatott eredményei



Törzs jele	Motilitás			Virulencia <i>G. mellonella</i> modellen (48h)		Virulencia						Biofilm képzés (48h)		
	Szerotípus	Swimming (cm ²)	Swarming (cm ²)	Twitching (cm ²)	Mortalitás (%)	Besorolás	exo S	exo U	lasB	algD	aprA		plc H	Hemolitikus aktivitás
P66	O11+	HM	M	HM	95	virulens	+	-	+	+	+	+	+++	+++
P78	O7	HM	M	M	90	virulens	+	-	+	+	+	+	+++	+
P77	O8	M	M	M	85	virulens	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+	++
P106	O8	HM	NM	M	100	virulens	+	-	+	+	+	+	+	+++
P28	O1	M	M	M	5	avirulens	+	-	+	+	+	+	+	+++
P2	ONT	M	NM	M	65	közepesen virulens	+	-	+	+	+	-	-	+++
P164	O11+	M	M	M	100	virulens	+	-	+	+	+	+	+++	0
P9	ONT	NM	NM	M	25	avirulens	-	+	+	+	+	+	-	++
P10	O3	M	NM	M	40	közepesen avirulens	+	-	+	+	+	+	-	+
P32	O7	M	NM	M	55	közepesen virulens	+	-	+	+	+	+	++	+++
P170	O1+	HM	NM	M	100	virulens	+	-	+	+	+	+	-	++
P172	O6+	HM	M	M	100	virulens	+	-	+	+	+	-	+	+
P177	O6+	HM	M	HM	70	közepesen virulens	+	-	+	+	+	+	++	+
P80	O6+	NM	M	M	100	virulens	+	-	+	+	+	+	+++	++
P3	ONT	HM	M	HM	80	virulens	-	+	+	+	+	+	+	+
P79	O6+	HM	M	M	80	virulens	-	+	+	+	+	+	++	+++
P46	O6	M	M	M	70	közepesen virulens	+	-	+	+	+	+	+	+++
P59	O6+	HM	M	M	80	virulens	+	-	+	+	+	+	+++	+++
ATCC 27853*	O6	n.d.	n.d.	n.d.	85	virulens	+	-	+	+	+	+	+	++
P71	O1	M	M	HM	95	virulens	-	+	+	+	+	+	++	+
P104	O4+	HM	M	M	100	virulens	+	-	+	+	+	+	+++	++
P16	O9+	HM	NM	M	50	közepesen avirulens	+	-	+	+	+	-	+++	+++
P124	ONT	HM	HM	M	100	virulens	+	-	+	+	+	+	+++	+
P60	O6	M	M	HM	95	virulens	+	-	+	+	+	+	+++	+++
P42	O6	HM	M	HM	90	virulens	+	-	+	+	+	+	+	++
P114	O1	HM	HM	HM	95	virulens	+	-	+	+	+	+	+++	+
P113	O10+	HM	M	M	80	virulens	+	-	+	+	+	+	+	+
P169	O10+	HM	M	M	95	virulens	+	-	+	+	+	+	+	++
P69	O6	M	M	M	50	közepesen avirulens	-	+	+	+	+	+	++	0
P14	O3	HM	NM	M	5	avirulens	-	+	+	+	+	+	+/-	+++
P18	O3	M	M	M	10	avirulens	-	+	+	+	+	+	+/-	+
P144	O1+	HM	M	HM	100	virulens	-	+	+	-	-	-	+	0
P62	O3	M	M	HM	100	virulens	-	-	+	+	+	+	-	+
P30	O3	M	M	M	75	közepesen virulens	-	-	+	+	+	+	-	++
P152	O1+	HM	M	M	100	virulens	+	-	+	+	+	+	0	+
P183	O6+	M	M	HM	95	virulens	+	-	+	+	+	+	+++	+++
P39	O6	M	M	M	90	virulens	+	-	+	+	+	+	+++	++
P174	O1	HM	M	HM	100	virulens	+	-	+	+	+	+	+++	+
P53	O6	M	M	HM	90	virulens	+	-	+	+	+	+	+	0
P160	O6+	HM	M	M	100	virulens	+	-	+	+	+	+	+	+
KPS-3*	O10	n.d.	n.d.	n.d.	65	közepesen virulens	-	+	+	+	+	+	+	+++
P43	ONT	M	M	M	10	avirulens	-	+	+	+	+	+	+++	+
P119	O10+	HM	M	M	100	virulens	-	+	+	+	+	+	+	+++
P125	O10+	HM	M	M	100	virulens	-	+	+	-	-	-	+	++
P135	O3+	HM	M	HM	30	közepesen avirulens	-	-	+	+	+	+	+++	+
P108	O3	HM	M	NM	40	közepesen avirulens	-	-	+	+	+	+	++	+++

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

12. SZ. MELLÉKLET: A *P. aeruginosa* törzsek motilitás vizsgálatának eredményei (n=46)

	Törzs jele	Motilitás			
		Swimming (cm ²)	Swarming (cm ²)	Twitching (cm ²)	
1	P2	0,27	0,00	1,30	
2	P3	1,38	2,62	2,47	
3	P9	0,00	0,00	1,04	nem motilis
4	P10	0,12	0,00	0,05	motilis
5	P14	1,40	0,00	0,85	hipermotilis
6	P16	1,16	0,00	1,62	
7	P18	0,93	1,43	0,19	
8	P28	0,73	0,36	1,39	
9	P30	1,00	0,66	1,59	
10	P32	0,09	0,00	1,16	
11	P39	1,04	5,75	0,11	
12	P42	1,39	3,41	2,01	
13	P43	0,54	0,05	1,16	
14	P46	0,81	0,24	1,04	
15	P53	0,77	0,65	2,63	
16	P59	1,23	1,19	1,63	
17	P60	0,05	0,15	2,04	
18	P62	0,88	1,22	1,93	
19	P66	1,14	3,84	2,17	
20	P69	1,08	0,05	1,44	
21	P71	0,66	1,54	3,74	
22	P77	1,08	2,32	1,49	
23	P78	1,29	2,68	1,74	
24	P79	1,27	0,54	1,60	
25	P80	0,00	2,10	1,63	
26	P104	1,67	2,14	1,01	
27	P106	2,38	0,00	1,11	
28	P108	2,13	3,63	0,00	
29	P113	1,28	1,59	1,11	
30	P114	1,13	12,15	2,38	
31	P119	1,39	0,69	1,59	
32	P124	1,50	8,28	1,65	
33	P125	2,05	0,71	1,16	
34	P135	1,57	3,72	2,84	
35	P144	2,60	2,72	2,15	
36	P152	1,45	1,35	1,34	
37	P160	1,20	0,97	1,35	
38	P164	0,48	0,05	1,14	
39	P169	1,89	0,67	1,44	
40	P170	2,23	0,00	0,74	
41	P172	2,82	0,52	0,98	
42	P174	1,30	0,95	2,21	
43	P177	1,39	1,38	2,98	
44	P183	0,72	1,09	2,63	
45	KPS-3	n.d.	n.d.	n.d.	
46	P1 (ATCC 27853)	n.d.	n.d.	n.d.	

13 SZ. MELLÉKLET: A *P. aeruginosa* törzsek *Galleria mellonella* tesztszervezeten végzett virulencia vizsgálatának eredményei (n=46)

Törzs jelölése	Virulencia <i>Galleria mellonella</i>										
	24h (1)	24 (2)	24h (átlag)	Elhullási % 24h	Túlélési % 24h	48h (1)	48h (2)	48h (átlag)	Elhullási % 48h	Túlélési % 48h	Virulencia 48h
P2	4	2	3	30	70	6	7	6,5	65	35	közepesen virulens
P3	8	8	8	80	20	8	8	8	80	20	virulens
P9	2	1	1,5	15	85	3	2	2,5	25	75	avirulens
P10	1	4	2,5	25	75	3	5	4	40	60	közepesen avirulens
P14	1	0	0,5	5	95	1	0	0,5	5	95	avirulens
P16	3	6	4,5	45	55	4	6	5	50	50	közepesen avirulens
P18	1	1	1	10	90	1	1	1	10	90	avirulens
P28	0	1	0,5	5	95	0	1	0,5	5	95	avirulens
P30	6	9	7,5	75	25	6	9	7,5	75	25	közepesen virulens
P32	1	3	2	20	80	3	8	5,5	55	45	közepesen virulens
P39	10	7	8,5	85	15	10	8	9	90	10	virulens
P42	2	3	2,5	25	75	9	9	9	90	10	virulens
P43	0	0	0	0	100	2	0	1	10	90	avirulens
P46	5	9	7	70	30	5	9	7	70	30	közepesen virulens
P53	9	9	9	90	10	9	9	9	90	10	virulens
P59	9	7	8	80	20	9	7	8	80	20	virulens
P60	10	9	9,5	95	5	10	9	9,5	95	5	virulens
P62	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P66	10	9	9,5	95	5	10	9	9,5	95	5	virulens
P69	3	7	5	50	50	3	7	5	50	50	közepesen avirulens
P71	10	9	9,5	95	5	10	9	9,5	95	5	virulens
P77	8	9	8,5	85	15	8	9	8,5	85	15	virulens
P78	9	9	9	90	10	9	9	9	90	10	virulens
P79	7	9	8	80	20	7	9	8	80	20	virulens
P80	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P104	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P106	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P108	0	0	0	0	100	5	3	4	40	60	közepesen avirulens
P113	9	6	7,5	75	25	9	7	8	80	20	virulens
P114	10	9	9,5	95	5	10	9	9,5	95	5	virulens
P119	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P124	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P125	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P135	0	1	0,5	5	95	4	2	3	30	70	közepesen avirulens
P144	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P152	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P160	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P164	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P169	9	10	9,5	95	5	9	10	9,5	95	5	virulens
P170	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P172	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P174	10	10	10	100	0	10	10	10	100	0	virulens
P177	4	6	5	50	50	5	9	7	70	30	közepesen virulens
P183	9	9	9	90	10	9	10	9,5	95	5	virulens
KPS-3	3	7	5	50	50	6	7	6,5	65	35	közepesen virulens
P1 (ATCC 27853)	9	6	7,5	75	25	10	7	8,5	85	15	virulens
Túlélési arány	Virulencia kategória										
100-75%	avirulens										
74-50%	közepesen avirulens										
49-25%	közepesen virulens										
24-0%	virulens										

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Végtelen hálával tartozom témavezetőimnek *Dr. Szoboszlai Sándornak* és *Dr. Kaszab Editnek*, akik megalapozták a szakmához való hozzáállásomat, értékes tanácsaikkal utat mutattak és végig kísérték utamon az egyetemi évek alatt.

Köszönetemet szeretném kifejezni *Dr. Kriszt Baláznak*, aki lehetőséget adott a Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszéken zajló munkában való részvételre.

Köszönöm *Kollégáimnak*, a Környezetbiztonsági és Környezettoxikológiai Tanszék munkatársainak emberi és baráti hozzáállásukat, hogy támogatták és segítették munkámat és mindennapjaimat.

Hálás vagyok *Dr. Szabó István* docens úrnak és *Szerdahelyi Gábor Soma* tanszéki mérnöknek a tanzániai mintákból származó *Acinetobacter* törzsekért.

Köszönöm hallgatómnak, *Szabó Ádámnak* a közös munkát és az együttműködés lehetőségét a németországi TWINCORE Kutatóintézetrel, továbbá hálás vagyok *Dr. Susanne Häussler* professzor asszonynak a *P. aeruginosa* törzsek vizsgálatában nyújtott segítségéért.

Köszönettel tartozom *Pászti Juditnak* és *Lesinszki Virágnak*, a Nemzeti Népegészségügyi Központ munkatársainak, akik a szerológiai és a PFGE vizsgálatokban nyújtottak segítséget.

Köszönöm *Barátaim* támogatását és bátorítását a derűsebb és nehezebb napokon egyaránt. Végül – de nem utolsó sorban – a legnagyobb hálával és köszönettel *Szüleimnek* és *Testvéremnek*, illetve *Nagyszüleimnek* és *Dédszüleimnek* tartozom, akik megteremtették a lehetőségét annak, hogy eljussak idáig, minden helyzetben biztattak, támogattak. Szeretettel ajánlom a dolgozatomat Nekik!

A munkát támogató pályázatok:

- Új kockázatkezelési modellrendszer fejlesztése a víz- és élelmiszerbiztonság növelése érdekében a haltermékvonalon - NVKP-16-1-2016-0023.
- A balatoni halállomány fenntartható, horgászati célú hasznosításának megalapozása - GINOP-2.3.2-15-2016-00004.
- Az Emberei Erőforrások Minisztériuma által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (1783-3/2018/FEKUTSTRAT), Szent István Egyetem vízzel kapcsolatos kutatások tématerületi programja.