

Karbapenem rezisztens *Klebsiella pneumoniae* izolátumok virulencia faktorainak vizsgálata és vB_KpnS_Kp13 bakteriofág identifikálása

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Horváth Marianna

Témavezető: Dr. Schneider György

Programvezető: Dr. Kerényi Monika

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

Pécs

2020

I. BEVEZETÉS

A *Klebsiella pneumoniae* egy oportunist, Gram-negatív, pálcika alakú baktérium, amely az *Enterobacteriaceae* családba tartozik. Egészséges egyének légutaiban és székletében megközelítőleg 5%-ban fordul elő. Az *Escherichia coli* után orvosi szempontból a második legfontosabb baktérium az *Enterobacteriaceae* család tagjai közül.

Fontos kórházi eredetű (nozokomiális) patogén, amely gyakran szepszist, sebfertőzést, húgyúti fertőzést, hasüregi fertőzést vagy tüdőgyulladást okoz, immunszupresszált betegekben. Szintén fontos patogén a közösségben szerzett fertőző betegségek között, így például a közösségben szerzett pneumóniában. Számos virulencia faktor segíti a *K. pneumoniae* törzsek fertőzőképességét és túlélését egy adott gazdaszervezetben. Podschun és Ullmann (1998) a *K. pneumoniae* törzsek esetén négy fontos virulencia faktort említ: (1) a tokot, amely meggátolja a fagocitózist; (2) a lipopoliszacharidokat (LPS), amelyek hatástalanítják a gazdaszervezet szérum komplementrendszerét; (3) a fimbriákat, amelyek az adhézióban és a biofilm képzésben vesznek részt; valamint (4) a szideroforokat, amelyek elősegítik a vas felvételét a gazdaszervezetből.

A *Klebsiella* fajok jellemzésére különböző módszerek léteznek, mint például biokémiai tesztek, antigén specificitási vizsgálatok, bakteriofág-tipizálás, bakteriocin érzékenységi vagy termelési vizsgálatok és molekuláris tipizáló módszerek. A leggyakrabban használt fenotípusos vizsgálatok, a fimbria- és a biofilm képzés, a sziderofor termelés, a szérumrezisztencia és a hipermukoviszkozitás (HMV) tesztelés. A HMV-fenotípust a tokot felépítő poliszacharid molekulák hálózata okozza, amely megnövekedett viszkozitást eredményez, így ez szintén fontos virulencia faktor. Ezen megnövekedett viszkozitás főként a K1-es és a K2-es tokszerotípussal rendelkező *K. pneumoniae* törzsek esetén fordul elő, ezért ez a két tokszerotípus a leginkább patogén törzsekre jellemző. A molekuláris tipizáló módszereket két nagy csoportra oszthatjuk, a protein-, és a nukleinsav-alapú vizsgálatokra. Ezek célja a törzsek egymástól való elkülönítése genomiai DNS szekvenciájuk és organizációjuk alapján. Az utóbbi években számos molekuláris tipizáló módszert használtak a *Klebsiella* fajok által okozott időbeni és földrajzilag eltérő fertőzések összehasonlító vizsgálatára. A leggyakrabban használt molekuláris tipizáló módszerek között a plazmid profil vizsgálat, a polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction, PCR), a pulzálatott-mezejű gélelektroforézis (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) és a teljes genom szekvenálás szerepel.

A *Klebsiella* fajok által okozott fertőzések terápiáját a világ egyre több pontján nagymértékben nehezíti, hogy izolátumai között gyakori a kiterjedt-spektrumú β -laktamáz (extended-spectrum β -lactamase, ESBL) és a metallo- β -laktamáz termelés. Ez a tény klinikai

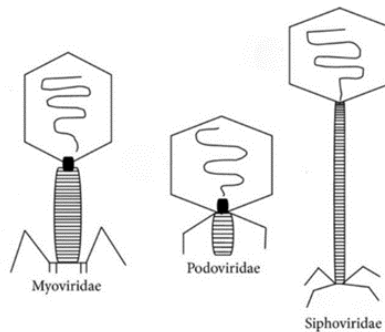
szempontból fontos, hiszen az antibiotikum rezisztens patogének jelenléte kórházi körülmények között nozokomiális fertőzések kitörését okozhatja.

Az antibiotikum rezisztencia sokszor transzmisszibilis plazmidokon kódolt, így hasonlóan egyes virulencia faktorokhoz, ezen tulajdonság is horizontális géntranszferrel hatékonyan képes terjedni az izolátumok közt. A patogének túlélése szempontjából nélkülözhetetlen a különböző rezisztencia gének és virulencia faktorok jelenléte, amelyek szerepét egyes tanulmányok is megerősítették *K. pneumoniae* törzsek patogenezisében, különböző infekciók során. A nozokomiális fertőzések közel 80%-át multirezisztens (multidrug-resistant, MDR) *K. pneumoniae* törzsek okozzák. A harmadik generációs cefalosporinokat (pl. cefotaxim, ceftazidim és ceftriaxon) 1980 óta hatékonyan használják nozokomiális fertőzések kezelésére. A túlzott cefalosporin használat azonban azt eredményezte, hogy a kórházakban cefalosporin-rezisztens baktériumtörzsek jelentek meg, főként az *Enterobacteriaceae* családon belül. A β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kiterjedt-spektrumú β -laktamáz (ESBL) gének expresszióját okozta. Az *Enterobacteriaceae* család tagjai közül a *K. pneumoniae* mutat legnagyobb mértékben ESBL-produkciót. Számos tanulmány szerint az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek Ázsiában, Európában és Észak-Amerikában fordulnak elő a legnagyobb számban. Az ESBL-termelés a β -laktamázokat kódoló gének mutációja révén keletkezik. Ezek az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek a legtöbb antibiotikummal szemben rezisztensek, így kezelési lehetőségük nagymértékben korlátozott. Az egyre aggasztóbb méreteket öltő, világméretű trendek miatt, napjainkban a kutatók több alternatív kezelési lehetőséget vizsgálnak, amelyek használata képes lehet visszaszorítani ezen fertőzések kialakulását, és hatékonyak lehetnek terápiás kezelések során is. A számos alternatív kezelési lehetőség közül a bakteriofágok, a növényi kivonatok és a különböző nanopartikulumok alkalmazása a legfontosabb.

A bakteriofágok (vagy röviden fágok) olyan vírusok, amelyek baktériumokat képesek fertőzni. A fágokat elsőként 1859-ben Ernest Hankin fedezte fel. Megfigyelte, hogy a Gangesz folyóból nyert és megfelelő szűrőn átszűrt víz, baktériumölő képességgel rendelkezett *Vibrio cholerae* ellen. A fágok felfedezése azonban két másik kutató, Frederick Twort (1915) és Felix D'Herelle (1917) nevéhez fűződik, akik egymástól függetlenül fedezték fel, hogy léteznek olyan kisméretű partikulumok, amelyek baktériumok lízisét okozzák. D'Herelle tovább tanulmányozta ezen partikulumokat, elnevezte azokat bakteriofágoknak és terápiás alkalmazhatóságukat is vizsgálta, így őt tekintjük a fágterápia atyjának.

A fágok kisebb-nagyobb mértékben, de mindenütt előfordulnak a környezetben ahol baktériumok találhatóak. Egyes szerzők szerint a számuk 10^{31} -re tehető a Földön. A Vírusok Nemzetközi Taxonómiai Bizottsága (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV)

szerint karakterisztikájuk alapján a vírusokat rendekbe, azon belül pedig családokba sorolhatjuk. A családok tovább oszthatók nemzetségekre, a vírusok genomjának szerveződése és mérete alapján. A fágoknak több mint 90%-a rendelkezik farokkal, így a *Caudovirales* rendbe sorolhatók. Ezen fágok duplaszálú DNS-t tartalmaznak és farok hosszuk alapján három családra oszthatók. A *Myoviridae* családba hosszú, kontraktilis; a *Podoviridae* családba nagyon rövid; a *Siphoviridae* családba pedig hosszú, nem kontraktilis farokkal rendelkező fágok tartoznak (1. ábra). A legtöbb *Caudovirales* rendbe tartozó fág fejének alakja ikozahedrális, ebben található a DNS-ük, amelyet kapszid burok vesz körül. Általában a duplaszálú DNS-t tartalmazó fágok genomjának mérete nagyobb, mint 15 kbp, amely a virion struktúrájának és a genom szerveződésének köszönhetően a fejrészben tömörödik össze. A *Myoviridae* családba tartozó fágok genomjának mérete a legnagyobb (> 125 kbp), a *Siphoviridae* családba tartozó fágok genomjának mérete pedig általában nagyobb, mint 20 kbp.



1. Ábra: A *Caudovirales* rendbe tartozó bakteriofágok morfológiai jellemzői. A *Myoviridae* családba hosszú, kontraktilis; a *Podoviridae* családba nagyon rövid; a *Siphoviridae* családba pedig hosszú, nem kontraktilis farokkal rendelkező fágok tartoznak (Forrás: thebacteriophages.org).

A bakteriofágok életciklusuk alapján két fő csoportra oszthatók, lítikus (replikáció lítikus ciklussal) és lizogén (replikáció lítikus és lizogén ciklussal). Létezik egy harmadik kevésbé gyakori csoport, a filamentózus fágok csoportja, amelynek tagjai állandó vagy tartós fertőzést okoznak a baktérium gazdaszervezetben, lízis vagy a gazda genomjába való integrálódás nélkül. A fágok lítikus ciklusa, amelyet általában a fágok „reproduktív ciklusának” is nevezünk, öt szakaszra osztható: (1) adszorpció, (2) penetráció, (3) transzkripció és bioszintézis, (4) összeszerelés és érés, valamint (5) lízis. A lizogén ciklus első két lépése (adszorpció és penetráció) azonos a lítikus cikluséval, azonban ebben az esetben a fág DNS-e nem azonnal replikálódik vagy expresszálódik. Ehelyett a fág genomja rekombinálódik a bakteriális

kromoszóma egy meghatározott, vagy éppen random szakaszával, és így a fág DNS-e beintegrálódik a gazda kromoszómájába.

Fágterápiás szempontból a lítikus fágok nagy jelentőséggel bírnak, ugyanis szaporodási mechanizmusuknak köszönhetően egyedi módszert kínálnak a bakteriális fertőzések kezelésére. Nagy előnyük, hogy specifikusan képesek fertőzni egy meghatározott gazdabaktériumot, elpusztítva annak antibiotikum rezisztens változatait is. Számos tanulmány foglalkozik a bakteriofágok sikeres, terápiás felhasználásával, mind emberekben, mind állatokban kialakuló, különböző fertőzések kezelése kapcsán. Emellett nagy jelentőséggel bír a fágok biokontrollként való felhasználása is, amelynek során a környezetben vagy különböző élelmiszerekben előforduló patogének felszaporodásának megelőzése a cél. Nyers élelmiszerekben ilyen például a *Campylobacter jejuni* és *Listeria monocytogenes* ellen ható fágok alkalmazása. Az állattenyésztésben is hatékonyan alkalmaznak különböző fágokat *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* és *Salmonella typhimurium* által okozott fertőzések ellen. Akvakultúrákban *Lactococcus garvieae* és *Vibrio anguillarum* törzsek által okozott fertőzések ellen, valamint a növénytermesztésben *Erwinia amylovora* és *Xanthomonas juglandis* törzsek által okozott fertőzések kezelése érdekében is felhasználnak különböző fágokat. A fágokat terápiás célokra legkorábban a humán gyógyászatban alkalmazták, például *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* és *Vibrio fetus* (*Campylobacter fetus*) törzsek által okozott hasmenés, valamint *Staphylococcus aureus* és *Streptococcus pyogenes* törzsek által okozott sebfertőzések kezelésében. A fágterápia során gyakran alkalmaznak úgynevezett fág koktélokot, amelyek jellemzője, hogy több önmagában szűkebb spektrumú fágtörzs kombinálásával készülnek, de együtt alkalmazva, egy szélesebb gazdaspecificitás érhető el használatukkal. A fágterápiának vannak előnyei az antibiotikum terápiával szemben: (1) gazdaságos és hatékony a multirezisztens baktériumokkal szemben, (2) biztonságos, mivel specifikusan csak a célbaktériumra hat, (3) a kezelés során egyetlen dózis beadása is elegendő lehet, a fágok önreprodukáló képessége miatt. Alkalmazhatóságukat azonban számos tény korlátozza, mint például a mutáció következtében létrejövő fág-rezisztens baktérium klónok kialakulása. A mutáció során a fág nem képes megtapadni a célbaktérium felszínén, melynek okai: (1) változás következik be a receptor struktúrájában, vagy (2) hozzáférhetőségében, (3) lecsökken vagy teljesen megszűnik a receptormolekulák termelése.

Az illóolajok olyan növényi kivonatok, amelyek nagy számban tartalmaznak biológiailag aktív komponenseket. A modern tudomány számos illóolaj antibakteriális, antifungális, antivirális, inszekticid, tumorellenes és antioxidáns hatását igazolta. Antibakteriális tulajdonságaik miatt egyre szélesebb körben alkalmaznak különböző illóolajokat terápiás és élelmiszertartósítási céllal.

Az antibiotikumrezisztencia terjedése és a globális egészségügyi problémák kezelése során az antimikrobás hatással rendelkező illóolaj-alapú módszerek kidolgozása előtérbe került.

A különböző nanopartikulumok antibakteriális hatásának vizsgálata napjainkban szintén dinamikus fejlődő kutatási terület. Ezek közül nagy jelentőséggel bírnak a különböző titán-dioxid nanopartikulumok, amelyek antibakteriális hatást mutatnak vizes közegben. UV megvilágítás hatására a TiO_2 molekulákból eltérő mértékben reaktív oxigén szabadgyökök, ROS-ok szabadulnak fel, mint például $\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, és H_2O_2 . Ezen ROS vegyületek hatására a baktériumsejtek membránja, enzimszisztémái és nukleinsavai degradálódnak, így fejtik ki antibakteriális hatásukat a különböző TiO_2 nanopartikulumok.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Kutatásainkhoz összesen 39 *Klebsiella pneumoniae* izolátumot használtunk fel, amelyeket a Countess of Chester Hospital (Anglia) Mikrobiológiai Intézete küldött számunkra. A baktériumtörzseket 2010 és 2017 között gyűjtötték. A mintákat vizeletből, hemokultúrából, köpetből és székletből izolálták.

Munkám elsődleges célja a számunkra elküldött *K. pneumoniae* izolátumok összehasonlító vizsgálata volt. Ezen munkám során céljaink az alábbiak voltak:

- A különböző fertőzésekből származó *K. pneumoniae* törzsek ellenőrző identifikálása.
- Az izolátumok virulencia potenciáljának összehasonlítása fenotípusos és genotípusos tesztekkel.
- A törzsek rokonsági kapcsolatának meghatározása.
- Egy kiválasztott, reprezentatív törzs teljes genomjának megszekvenálása.
- Négy kiválasztott törzs virulencia potenciáljának összehasonlítása különböző állatkísérletes modellekben.

Az utóbbi évtized óta a karbapenemáz-termelő *Klebsiella pneumoniae* törzsek egyre nagyobb számban jelennek meg és terjednek el különböző kórházakban. A terápiás lehetőségek korlátozottak ezen kórházi törzsek ellen, ezért újabb módszerek kutatása vált szükségessé. Éppen ezért célunk volt:

- A kísérleteinkbe vont *K. pneumoniae* törzsek ellen ható, lítikus bakteriofágok izolálása.
- Az újonnan izolált bakteriofág morfológiai jellemzése, hatásspektrumának tesztelése és lítikus hatékonyságának meghatározása.

- A bakteriofág szaporodási görbéjének felvétele, „time-kill” hatékonyságának tesztelése, és biofilm degradáló képességének vizsgálata.
- Az újonnan izolált fág teljes genomjának szekvenálása.
- A bakteriofág terápiás hatékonyságának vizsgálata állatkísérletes modellekben.
- Két alternatív antimikrobás szer – különböző illóolajok és titán-dioxid nanopartikulumok – hatékonyságának tesztelése egy kiválasztott *K. pneumoniae* törzs ellen.

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Kutatásaim során az alábbi módszereket használtuk a *K. pneumoniae* törzsek vizsgálatára:

- Biokémiai tesztek és MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectroscopy, mátrix által segített lézereszorpciós/ionizációs repülési idő tömegspektrometria) analízis.
- Antibiotikumprofil vizsgálat (EUCAST 2018-as szabvány szerint).
- Fenotípusos vizsgálatok:
 - agglutinációs tesztek,
 - biofilm képzés vizsgálata,
 - sziderofor termelés,
 - szérumrezisztencia,
 - hipermukoviszkozitás (HMV) tesztelése.
- Genotípusos vizsgálatok:
 - polimeráz láncreakció (PCR),
 - plazmid izolálás,
 - pulzáltatott-mezejű gélelektroforézis (PFGE).
- Sejtinváziós képesség vizsgálata.
- Állatkísérletek (BALB/c típusú egerek felhasználásával):
 - tüdő infekciós modell,
 - intraperitoneális (IP) infekciós modell,
 - húgyhólyag infekciós modell,
 - bélszéklet kolonizációs modell.
- Egy kiválasztott törzs teljes genomjának szekvencia analízise.

A fág kutatás során az alábbi módszereket használtam:

- Fág DNS izolálás és restrikciós mintázat analízis.
- Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatok.
- Az izolált fág hatásspektrumának és lítikus hatékonyságának tesztelése.
- A fág szaporodási görbéjének felvétele.
- „Time-kill” hatékonyságának tesztelése.
- A fág biofilm degradáló képességének meghatározása.
- Teljes genomjának szekvenálása, analízise és filogenetikai vizsgálata.
- A fág terápiás hatékonyságának tesztelése állatkísérletes modellben.

Végül, az alternatív antimikrobás szerek tesztelése során a következő módszereket alkalmaztam:

- Illóolajok antibakteriális hatásának tesztelése:
 - kicseppentéses módszerrel,
 - minimális gátlókoncentráció meghatározása (minimal inhibitory concentration, MIC),
 - biofilm degradáló képesség vizsgálata.
- Titán-dioxid nanopartikulumok antibakteriális hatásának vizsgálata:
 - folyékony közegben.

IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

IV.1. A *K. pneumoniae* törzsek virulencia faktorainak vizsgálata

A kutatásainkhoz felhasznált, összesen 39 *K. pneumoniae* törzset a Countess of Chester Hospital (Anglia) Mikrobiológiai Intézete gyűjtötte. Számos morfológiai, fiziológiai és biokémiai tesztet elvégeztünk a baktériumtörzsek identifikálása érdekében. A különböző biokémiai tesztek és a MALDI-TOF MS analízis a kapott *K. pneumoniae* törzsek ellenőrző identifikálására szolgált. Kísérleteinkhez csak azon törzseket használtuk fel, amelyek indol próba, metilvörös-reakció, ornitin- és arginin-dekarboxiláz-reakció során negatív eredményt mutattak, valamint aktív mozgásra nem voltak képesek. Ezek mellett az összes felhasznált törzs adonit reakció, Voges-Proskauer teszt, citrát-próba, malonát-reakció, ureáz-reakció és lizin-dekarboxiláz-reakció során pozitív eredményt mutatott. A törzsek mindegyike képes volt a szacharózt és laktózt fermentálni.

A biokémiai tesztek eredménye alapján a *K. pneumoniae* törzseket egy végső MALDI-TOF MS analízisnek vetettük alá vizsgálataink megkezdése előtt.

Az antibiotikum-érzékenységi tesztek 17 különböző antibiotikum felhasználásával végeztük el EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Antimikrobiális Szerekkel Szembeni Érzékenységi Vizsgálatok Európai Bizottsága) 2018-as szabvány szerint, korongdiffúziós módszerrel. A kísérleteinkbe vont *K. pneumoniae* törzsek mindegyikre rezisztens volt penicillinekre, cefalosporinokra, fluorokinolonokra és a karbapenemek közül az ertapenemre. A vizsgált törzsek 97,4%-a (38/39) tobramicin rezisztenciát mutatott, 92,3%-a (36/39) mérsékelten érzékeny volt imipenemre és meropenemre. A törzsek 69,2%-a (27/39) mérsékelten érzékeny volt gentamicinre és 51,3%-uk (20/39) mérsékelten érzékeny volt amikacinra.

A fenotípusos tesztek alapján a törzsek ~95%-a (37/39) rendelkezett I-es típusú fimbrával, amely összhangban van a genotípusos tesztek eredményével (*fimH-1*). Az I-es típusú fimbria elősegíti a *K. pneumoniae* törzsek megtapadását epithelialis sejtek felszínén. III-as típusú fimbrát a vizsgált törzsek ~87%-a (34/39) hordozott. Ezen típusú fimbria elősegíti a baktériumtörzsek adhézióját különböző humán szöveti struktúrákhoz (vese, tüdő, húgyhólyag), valamint elősegíti a biofilm képződését biotikus és abiotikus felszíneken egyaránt. Emiatt fontos szerepe van a biofilm-asszociált fertőzések kialakításában, például katéteres betegek esetén. Az általunk vizsgált törzsek 95%-a (37/39) képes volt vasat megkötni a táptalajból. A gazdaszervezet első védelmi vonala a mikroorganizmusok bejutása ellen a vérszérum baktericid hatása. Az általunk vizsgált törzsek csaknem fele (46%-a) rezisztensnek bizonyult ezen védekező mechanizmussal szemben. Az összes vizsgálatunkba vont *K. pneumoniae* törzs K24-es tokszerotípussal rendelkezett. Hipermukoviszkozitást, azaz HMV-fenotípust a felhasznált törzsek 10,3%-a (4/39) mutatott. Ezen fenotípust az *rmpA* gén kódolja, amely szintén ebben a 4 izolátumban volt kimutatható PCR segítségével, összhangban a fenotípusos tesztek eredményeivel.

A vizsgált karbapenem rezisztens *K. pneumoniae* törzsek makrorestrikciós alapú klonalitás vizsgálatát pulzáltatott-mezejű gélelektroforézis (PFGE) segítségével végeztük, *XbaI* restrikciós endonukleáz felhasználásával. A 85% feletti hasonlóságot mutató törzsek egy klónhoz tartoztak, így a 39 törzset 12 pulzotípusba soroltuk.

A *K. pneumoniae* 53/3 törzs szekvencia analízise alapján a genom mérete 5 010 272 bp, G+C tartalma 51% (azonosító száma: SAMN15956199). A genom 5 671 gént tartalmaz.

Az állatkísérletekben végzett virulencia tesztek során megállapítottuk, hogy az általunk felhasznált törzsek legtöbbje alacsonyabb virulenciát mutatott, mint a kontroll, hipervirulens *K. pneumoniae* NTUH-K2044-es törzs. Egy esetben sikerült eltérést kimutatnunk arra vonatkozóan, hogy a törzsek virulencia potenciál szempontjából nem homogének, lévén a *K. pneumoniae* 11/3-

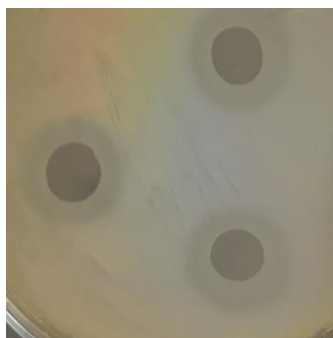
as törzs, az intraperitoneális, 4×10^7 CFU/egér fertőzést követő 3. napon, a kísérleti állatok pusztulásához vezetett. A tüdő infekciós kísérletek során az állatok súlyának csökkenését figyeltük meg, a beoltás után már 24 órával. A húgyhólyag infekciós vizsgálatok során, a tesztelt *K. pneumoniae* törzsek mindegyike ($n = 4$) fertőzést idézett elő. A fertőzést követő 10. napon három baktériumtörzset sikerült visszaizolálnunk az állatok vizeletéből. A bélkolonizációs vizsgálatok megkezdése előtt streptomycinnel előltük az egerek normál bélflóráját. Ezek után a bélkolonizáció a négy különböző *K. pneumoniae* törzssel átmenetileg volt sikeres, mivel ezeket a 3. hét végére már nem tudtuk visszaizolálni az állatok székletéből.

A sejtinváziós kísérletek során kimutattuk, hogy a vizsgált *K. pneumoniae* törzsek különböző mértékben mutattak pozitív inváziós képességet a T24-es húgyhólyag sejteken és az INT407-es bélhámsejteken. Vizsgálataink során megfigyeltük, hogy a baktériumtörzsek a T24-es sejteken jelentősen kisebb mértékben mutattak pozitív inváziót.

IV.2. Újonnan izolált lítikus bakteriofág identifikálása

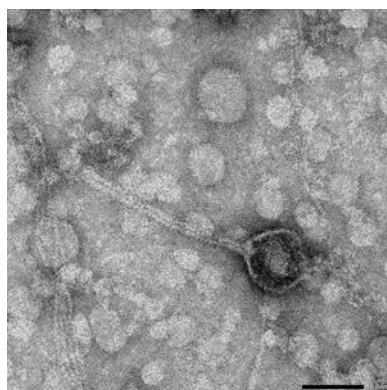
Az utóbbi évtized óta a karbapenemáz-termelő *Klebsiella pneumoniae* törzsek (carbapenemase-producing *K. pneumoniae* strains, CP-Kps) egyre nagyobb számban fordulnak elő a kórházakban, amely súlyos, globális egészségügyi problémát jelent. A terápiás lehetőségek korlátozottak ezen kórházi törzsek ellen, ezért újabb, alternatív módszerek kutatása vált szükségessé. Ebben nyújthatnak segítséget a lítikus bakteriofágok, amelyek specifikusan a nekik megfelelő gazdabaktériumban képesek amplifikálódni és lítikus ciklusuk során a környezetbe jutni. Így a fágok alternatív terápiás lehetőséget nyújthatnak egyes bakteriális fertőzések leküzdésében.

Kutatásaink során összesen 13 bakteriofágot izoláltunk a helyi szennyvíztisztító telepről (Pellérd), az angliából kapott *K. pneumoniae* törzsek ellen. Ezen fágok közül 4, lítikus hatást mutatott minden K24-es tokserotípussal rendelkező *K. pneumoniae* törzs ellen. Ezek közül 3 fág restriktív mintázata (*EcoRI* és *HindIII*) azonos volt, az egyik fágé azonban eltérő a másik 3 fág mintázatától. Ez az egy fág mindig tiszta, lítikus zónát mutatott (átmérője ~10 mm) fág-rezisztens klónok jelenléte nélkül és széles (~4 mm), karakterisztikus halo zónával rendelkezett (2. ábra). Ezt a fágot vB_KpnS_Kp13-nak neveztük el és további kutatásaim során, ennek karakterizálásával foglalkoztunk.



2. **Ábra:** A vB_KpnS_Kp13 fág feltisztulási plakkjainak morfológiája. A feltisztulási zónák átmérője ~10 mm, a körülötte lévő halo zóna nagysága ~4 mm, *K. pneumoniae* 53/3 baktériumgyepen vizsgálva, DLA technikával, LBA táptalajon.

Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) analízissel meghatároztuk, hogy a vB_KpnS_Kp13 fág fej átmérője ~60 nm, valamint a farok hossza ~200 nm (3. ábra). A farok rész flexibilis, de nem kontraktilis. Ezen morfológiai jellemzők alapján a vB_KpnS_Kp13 fagot a *Caudovirales* rendbe, azon belül pedig a *Siphoviridae* családba soroltuk.



3. **Ábra:** A vB_KpnS_Kp13 fág TEM képe. A fág a *Siphoviridae* családra jellemző, hosszú farok résszel rendelkezik, a mintát 1,5 w/v %-os foszfo-wolfram-savval (Merck, Németország) festettük meg. A képen látható skála 50 nm-t reprezentál.

Az általunk izolált vB_KpnS_Kp13 fág hatásspektrumát összesen 89 *Klebsiella spp.* izolátumon teszteltük le, de az újonnan izolált fág csak a K24-es tokszerotípussal rendelkező *K. pneumoniae* törzsek ellen volt hatásos, azok 100%-án (40/40) lítikus feltisztulási zónát hozott létre.

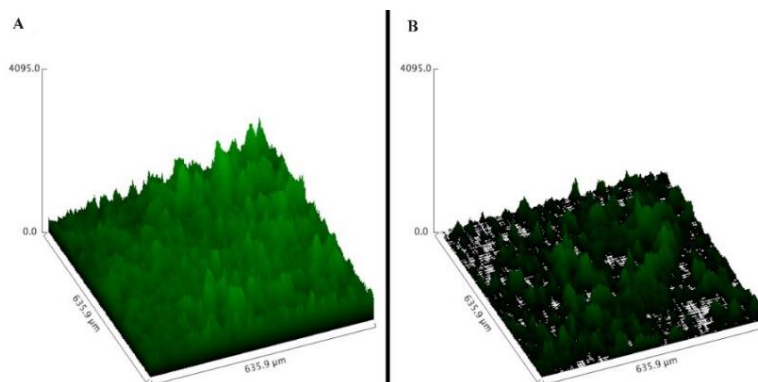
Az egy-lépéses bakteriofág szaporodási görbék felvétele során meghatároztuk a fág latencia periódusát és „burst size” értékét. A szaporodási görbét három szakaszra osztottuk: (1) latencia periódus, (2) logaritmus vagy „emelkedési” szakasz, és (3) plató fázis. A vB_KpnS_Kp13 fág

latencia periódusa 18 percig, a logaritmusos szakasza 10 percig tartott, a plató fázis pedig a 27. percnél kezdődött. Számolásaink alapján a „burst size” értéke ~220 fág partikulum/ fertőzött baktérium volt.

A vB_KpnS_Kp13 fág képes meggátolni a *K. pneumoniae* 53/3 törzs proliferációját, különböző fág – baktérium arányok (multiplicity of infection, MOI) mellett. MOI 0,0001 és 100 között a fág, ~93%-kal szorította vissza a *K. pneumoniae* 53/3 törzs növekedését, LB tápoldatban vizsgálva, 24 óra elteltével. Fág-rezisztens klónokat kicseppentéses módszerrel és folyékony kultúrába való teszteléssel sem tudtunk izolálni.

A *K. pneumoniae* 53/3 törzs magas biofilm termelő ($OD = 4,3 \pm 0,2$) kategóriába tartozik, ennek megállapításához Vuotto és munkatársai (2017) általa leírt OD határértékeket vettük figyelembe. A fág biofilm degradáló képességét különböző fág – baktérium arányok mellett, előzetesen felnövesztett biofilmen vizsgáltuk, négy különböző időpontban. A leghatékonyabb biofilm degradációt abban az esetben figyeltük meg, amikor a fág : baktérium arány 10 : 1 volt (MOI 10). Ezen MOI érték esetén a biomassa 2 óra fágkezelés után 51,8%-al csökkent. Szintén ezen MOI értéket alkalmazva 12 óra után 54,2%-os, 24 óra után 57,5%-os, és 48 óra után 72,9%-os biomassa csökkenést detektáltunk a kontroll (fággal nem kezelt) biomassa struktúrájához képest.

A vB_KpnS_Kp13 fág biofilm degradáló képességét konfokális lézer scanning mikroszkóp (confocal laser scanning microscopy, CLSM) segítségével is megvizsgáltuk. A CLSM felvételeken jól látható, hogy az általunk újonnan izolált fág, erősen redukálja a biomasszát, így a biofilm architektúrájának vastagságát csökkenti (4. ábra).



4. **Ábra:** *K. pneumoniae* 53/3 törzs által képzett biofilm vizualizálása CLSM (Olympus FV1000) használatával. **A:** Kontroll *K. pneumoniae* 53/3 biofilm felszínéről készült plot. **B:** vB_KpnS_Kp13 fággal kezelt (2×10^9 PFU/ml) biofilm felszínéről készült plot. A plotok CLSM szoftver segítségével készültek.

Az újonnan izolált, vB_KpnS_Kp13 fág genomjának mérete 43 094 bp, G + C tartalma 50,6%, GenBank azonosítója MK170446. A GeneMark program segítségével meghatároztuk, hogy a fág genomja 75 ORF-et tartalmaz és tRNS gén nem található benne. Az ORF analízis alapján a vB_KpnS_Kp13 fág genomját 5 nagy funkcionális csoportra osztottuk: (1) a DNS replikációt/modifikációt/transzkripciót reguláló gének, (2) a struktúra kialakításáért és az „összeszerelésért” felelős gének, (3) a gazda líziséért felelős gének, (4) a farok struktúrát kialakító gének, (5) és a hipotetikus vagy ismeretlen funkciójú gének csoportjára.

A vB_KpnS_Kp13 fág filogenetikai analízisét VICTOR program segítségével végeztük el. A filogenetikai analízis alapján megállapítottuk, hogy az általunk újonnan izolált fág legközelebbi rokona a *Klebsiella* JY917 fág, amellyel 90%-os hasonlóságot mutat.

Az újonnan izolált fág terápiás hatékonyságát intraperitoneálisan (IP) fertőzött egerekben teszteltük le. Ennek során megállapítottuk, hogy a fág terápiás hatékonyságát nagyban befolyásolta, hogy a bakteriális fertőzést követően, mennyi idő után oltottuk be az állatokat a fággal. Az egerek 100%-a túlélte az IP bakteriális infekciót abban az esetben, ha a fertőzést követően 10 perccel fág kezelést kaptak az állatok. A terápiás hatékonyság drasztikusan csökkent már abban az esetben is, amikor a bakteriális fertőzést követően 1 óra múlva oltottuk be az állatokat a vB_KpnS_Kp13 fág szuszpenziójával.

IV.3. Alternatív antimikrobás szerek tesztelése

Kutatásaink során, 13 illóolaj antibakteriális hatékonyságát teszteltük le a *K. pneumoniae* 53/3 törzs ellen, kicseppentéses módszerrel. Ennek során azt állapítottuk meg, hogy a rozmaring, a borsmenta, a kakukkfű, az eukaliptusz, az orvosiszálya és a muskotályszálya illóolajoknak antibakteriális hatása volt a *K. pneumoniae* 53/3 törzs ellen. Azon illóolajokat ítéltük hatásosnak a vizsgált baktériumtörzs ellen, amelyeknek gátlási zónája 6 mm feletti volt a kicseppentéses teszt során. A vizsgálatainkba vont 6 illóolaj minimális gátló koncentrációja (minimal inhibitory concentration, MIC) 0,3-0,5 µl/ml között változott. A tesztelt illóolajok különböző mértékű biofilm redukciót mutattak, azonban a leghatékonyabban a kakukkfű illóolaj degradálta a *K. pneumoniae* 53/3 törzs által képzett biofilmet: 24 óra alatt MIC= 0,312 µl/ml illóolaj 55,72%-os degradációt mutatott.

Vizsgálataink során leteszteltük különböző PF-titán-dioxid nanopartikulumok antibakteriális hatékonyságát a *K. pneumoniae* 53/3 törzs ellen. Az általunk használt PF-titán-dioxid módosulatok nem mutattak antibakteriális hatást a sötét inkubáció idején, így bizonyítva azt, hogy a foszfor (P)

és a fluor (F) nem befolyásolja a baktériumsejtek viabilitását. Kísérleteink során a hidrotermálisan 1, 3, 6 és 12 órán át kezelt PF-TiO₂ módosulatok, UV-A megvilágítás hatására bizonyultak a leginkább hatásosnak a *K. pneumoniae* 53/3 törzs ellen. Ezen négy titán-dioxid módosulatot felhasználva a kezelésekek során, minden esetben az élő baktériumsejtek száma 10⁶ CFU/ml-ről 10² CFU/ml-re csökkent 20 perc alatt, amely bizonyítja ezen módosulatok fokozott mértékű antibakteriális hatását.

V. ÚJ EREDMÉNYEK

Legfőbb eredményeink az alábbiak:

1. Összetett fenotípusos és genotípusos vizsgálatokat végeztünk el klinikai *K. pneumoniae* törzseken.
2. Új primer párt terveztünk, amely a K24-es tokszerotípusra specifikus, *K. pneumoniae* törzsek esetén.
3. Kimutattuk az *rmpA* gén jelenlétét VIM-típusú, karbapenemáz-termelő, ST15 klónhoz tartozó *K. pneumoniae* törzsekben. Az *rmpA* gént eddig még nem írták le ilyen típusú izolátumokban.
4. Megerősítettük, hogy a III-as típusú fimbria képzése és a biofilm termelés között összefüggés van.
5. Megerősítettük, hogy az *rmpA* gén jelenléte és a hipermukoviszkozus (HMV) fenotípus között összefüggés van.
6. Kimutattuk a *K. pneumoniae* 11/3 törzs emelkedett virulencia potenciálját állatkísérletes IP modellben.
7. Izoláltunk és identifikáltunk egy új, lítikus bakteriofágot (vB_KpnS_Kp13) a K24-es tokszerotípussal rendelkező, karbapenem-rezisztens *K. pneumoniae* törzsek ellen.
8. Kimutattuk a kakukkfű illóolaj antibakteriális hatását a *K. pneumoniae* 53/3 törzsön vizsgálva.
9. Kimutattuk, hogy a fotoindukált PF-titán-dioxid nanopartikulumok antibakteriális hatással bírnak a *K. pneumoniae* 53/3 törzs ellen és ez a hatás megfelelő kezeléssel fokozható.

VI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Schneider Györgynek, hogy mindvégig segített és támogatott PhD munkám során.

Köszönöm a Countess of Chester Hospital Mikrobiológiai Intézet munkatársainak, hogy megosztották velem *K. pneumoniae* törzsgyűjteményüket vizsgálataim elvégzéséhez.

Köszönöm a PTE-KK Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet minden egykori és jelenlegi dolgozójának, akik segítették munkámat. Külön szeretném megköszönni Dr. Tigyi Zoltánnak, hogy tanácsaival munkámat mindvégig támogatta, és hogy értékes törzsgyűjteményeit kísérleteimhez felajánlotta. Köszönöm Dr. Melegh Szilvia Zsóknának az antibiotikum rezisztencia tesztek során nyújtott segítségét. Köszönöm Prof. Dr. Emődy Leventének az állatkísérletek során nyújtott segítségét. Köszönöm PhD hallgató társaimnak, Schweitzer Bettinának és Pertics Botondnak, hogy folyamatosan inspiráltak PhD tanulmányaim során. Nagyon hálás vagyok Molnár Évának és Denke Lajosné Ildikónak az értékes segítségükért, amelyet kísérleteim során nyújtottak.

Köszönöm Dr. Putnoky Péternek a PFGE vizsgálatok során nyújtott segítségét és Dr. Damjanova Ivelinának a gélfotók alapján készített dendrogramot és cluster analízist.

Köszönöm Dr. Kovács Tamásnak a különböző izolátumok teljes szekvencia analízisét. Köszönöm Dr. Rákhely Gábornak és Sarshad Koderivalappilnek a konfokális lézer scanning mikroszkópos felvételek során nyújtott segítségüket. Szintén szeretnék köszönetet mondani Dr. Kőrösi Lászlónak, hogy munkámhoz biztosította a különböző titán-dioxid nanopartikulumokat.

Külön szeretném megköszönni Dr. Ábrahám Hajnalkának, hogy munkámat mindvégig támogatta. Emellett köszönöm Prof. Dr. Seress Lászlónak a transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatok során nyújtott segítségét.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném kifejezni legszívélyesebb köszönetemet Édesanyámnak szeretetéért, támogatásáért, tanácsaiért és türelméért.

VII. PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

Horváth M., Kovács T., Koderivalappil S., Ábrahám H., Rákhely G., Schneider Gy.: Identification of a newly isolated bacteriophage against a K24 capsular type, carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* belonging to the ST15 clonal lineage. *Scientific Reports*. 10: 5891. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62691-8> (2020). (Impakt faktor: **4,116**)

Kőrösi L., Bognár B., **Horváth M.**, Schneider Gy., Kovács J., Scarpellini A., Castelli A., Colombo M., Prato M.: Hydrothermal evolution of PF-co-doped TiO₂ nanoparticles and their antibacterial activity against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Catalysis B: Environmental*. Volume 231. p:115-122. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2018.03.012> (2018). (Impakt faktor: **14,229**)

Egyéb publikációk:

Schneider Gy., Szentés N., **Horváth M.**, Dorn Á., Cox A., Nagy G., Doffkay Zs., Maróti G., Rákhely G., Kovács T.: Kinetics of targeted phage rescue in a mouse model of systemic *Escherichia coli* K1. *Hindawi*. Article ID 7569645. <https://doi.org/10.1155/2018/7569645> (2018). (Impakt faktor: **2,583**)

Kovács T., Lootz K., Dorn Á., Andrieu J., **Horváth M.**, Mátyás A., Schneider Gy.: Potential of small-scale jar system to extend the shelf life of raw meats, and hinder the proliferation of *Campylobacter jejuni* and *Enterohemorrhagic Escherichia coli*. *LWT – Food Science and Technology*. XXX. 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.058> (2016). (Impakt faktor: **2,7**)

Melegh Sz., Schneider Gy., **Horváth M.**, Jakab F., Emődy L., Tigyi Z.: Identification and characterization of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* clone ST101 in a Hungarian University Teaching Hospital. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 63(3): 233-245. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.3.2> (2015). (Impakt faktor: **0,568**)