

“Prototípust bemutató jegyzőkönyv”

Budapest, 2021. 03. 31.



Antibiotikumérzékenység-vizsgálatok MALDI-TOF tömegspektrometriás módszerrel

Munkánk célja a MALDI-TOF MS érzékenységvizsgálati módszer rutin laboratóriumi „helyének” és alkalmazhatóságának tesztelése, a módszer optimalizálása, adaptálása, a felhasználás határainak esetleges kiterjesztése, de célunk a módszer korlátainak felderítése is.

1. Történeti áttekintés, napjaik kihívásai

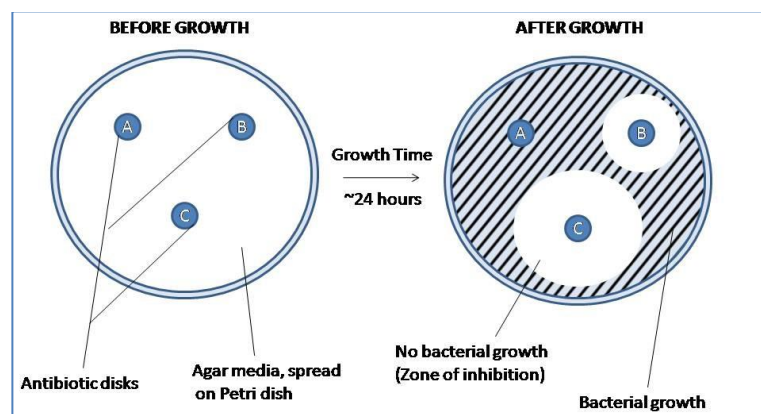
A mikrobák elleni küzdelem az emberiség történetének hosszú évezredeiben végig szinte reménytelennek és kilátástalannak tűnt, egészen a XX. század '20-as éveiben felfedezett antibiotikumok korszakáig a tudományos módszerek csak különböző gyógynövények, gyógyhatásúnak tapasztalt vagy vélt anyagok alkalmazásában merültek ki. Az antibiotikumok előtti történelem során szinte minden akadály nélkül és válogatás nélkül sorra szedték emberi áldozataikat az olyan hírhedt és súlyos betegségeket, sőt világjárványokat okozó patogén baktériumok, mint például a kolera (*Vibrio cholerae*), a pestis (*Yersinia pestis*), vagy a lepra (*Mycobacterium leprae*). Semmelweis Ignác, Louis Pasteur [1], Robert Koch [2,3], Alexander Fleming [4] mellett sok más úttörő kutató higiéniai eljárásokkal, fertőző mikrobákkal, illetve azok elleni anyagokkal kapcsolatos felfedezéseiről nem túlzás kijelenteni, hogy az emberiség jelenleg is tartó, sokféle területen lejátszódó, XX. századi rohamos fejlődésének alapvető feltételeit teremtették meg a különböző fertőző betegségek megfékezésével, kordában tartásával. Az 1918-19-ben a világon végigsöprő H1N1 „spanyolnátha” pandémia és a két világháború során gyakori és igen súlyos sebfertőzések (pl. tetanusz: *Clostridium tetani* és gázgangréna képzők: *C. perfringens*, *C. novyi*) magas incidenciája és mortalitása ébresztette fel a gyógyszeripart is, hogy a jelentős veszteségeket okozó fertőzések elleni harcban órájuk is szükség van.

Napjainkban a patogén baktériumok terjedését elősegítő, rossz higiéniai körülmények az európai és az észak-amerikai kontinensen javarészt már visszaszorultak, a harmadik világ országaiban azonban továbbra is ugyanazokkal az évszázados problémákkal küzdenek. Mindkét régióra egyaránt jellemző viszont a kisebb mértékben humán gyógyászati célú, de dimenzióit tekintve ezt messze túlhaladva, elsősorban a mezőgazdasági és állattenyésztési gyakorlatban alkalmazott óriási mennyiségű antibiotikum. Emiatt ma már azzal az új problémával küzd az emberiség, hogy a kezdetben csodafegyvernek tűnő antimikrobiális szerekkel szemben a mikrobák már védekezni tudnak, ugyanis a rezisztens klónok antibiotikumok jelenlétében kiszelektálódnak és ezek a szuperbaktériumokként is emlegetett mikrobák veszik át a régiek helyét, kórokozókként [5]. A különböző antibiotikumokkal

szemben rezisztens baktériumoknak új patogenitási faktoraik általában nincsenek, ugyanazokat a kórfolyamatokat képesek kiváltani, de az ellenük folyó védekezés eszköztára rezisztenciamechanizmusaik révén jelentősen beszűkült, mert csak néhány vagy akár csak egy-két antibiotikum jöhet szóba, amikor ellenük például valamilyen súlyos nosocomiális fertőzés során terápiára kerül sor. Eközben az antibiotikumok gyógyszeripari fejlesztésének kezdeti gyors üteme mára jelentősen lelassult, alig kerül használatba egy-egy új antibiotikum, új antibiotikum csoportokat pedig szinte már nem is hoznak forgalomba [6, 7]. Mindezek miatt nagyon fontos, hogy a lehető legpontosabban és a lehető leggyorsabban megismerjük az egyes izolált baktériumok érzékenységi viszonyait (az ún. antibiogramját), illetve hogy azt minél gyorsabban a klinikus rendelkezésére tudjuk bocsátani, mert súlyos fertőzések esetén szinte a legtöbb esetben élet-halál kérdése a megfelelő antibiotikus terápia mielőbbi elkezdése [8]. Az igazán nagy kihívást jelentő kórokozók pedig manapság már olyan, akár több antibiotikumcsoportra egyszerre is rezisztens baktériumok, melyeknél sokszor már csak néhány potenciális antibiotikum áll rendelkezésre a terápiában. A XXI. századi Magyarországon sem számít ritkaságnak egy-egy fekvő- vagy járóbeteg mintából izolált ESBL-termelő bélbaktérium vagy akár egy MRSA sem, de rengeteg egyéb multirezisztens kórokozó is jelen van közösségeinkben, elsősorban azonban kórházainkban [9]. Nálunk szerencsére még csak alig-alig kerülnek elő, de várhatóan egyre többször fordulnak majd elő a harmadik világban már egyre kevésbé ritkaságnak számító, karbapenemáz enzimeket termelő baktériumok is [10]. Világszerte egyelőre csak sporadikusan (nosocomiálisan főleg), de már előfordulnak olyan izolátumok is, amik gyakorlatilag szinte minden ismert antibiotikum ellen valamilyen rezisztencia-mechanizmussal felvértezett, ún. pán-rezisztens baktériumok [11].

1. Standard érzékenységvizsgálati módszerek

A baktériumok antibiotikumokkal szembeni érzékenységét vagy rezisztenciáját különböző laboratóriumi, azaz *in vitro* eszközökkel tudjuk vizsgálni. A klinikai mikrobiológia mai standard referencia módszere a mikroorganizmusok *in vitro* rezisztenciavizsgálatára legelterjedtebben a bármely mikrobiológiai laboratóriumban egyszerűen kivitelezhető korongdiffúziós módszer (1. ábra) (Kirby-Bauer disc diffusion susceptibility testing) [12,13].

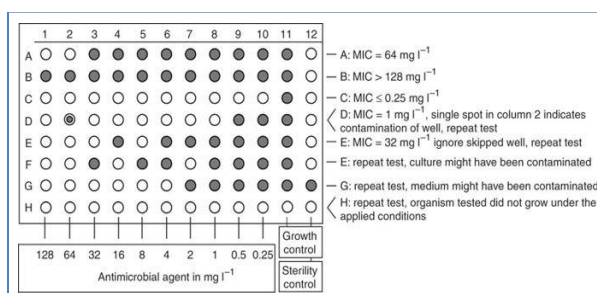


1. ábra

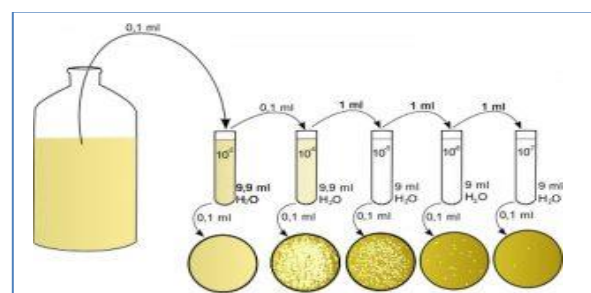
Kirby-Bauer disc diffusion method [14]

Az egyszerűen és olcsón kivitelezhető Kirby-Bauer korongdiffúziós teszt során az ismert mennyiségű antibiotikumot tartalmazó papírkorongból a szilárd táptalajba gyorsan diffundáló antibiotikum a pázsitként felvitt mikroorganizmus növekedését az adott mikroba érzékenységi viszonyaitól függő mértékben gátolja vagy nem gátolja. Ez a gyakorlatban úgy néz ki, hogy a vizsgálat összeállításakor az adott baktériumot pázsitként szélesztjük egyenletesen a táptalaj felszínén (0,5 McF standard mennyiségű inokulumként), majd rögtön ezután a táptalajra helyezük az antibiotikumot tartalmazó papírkorong(oka)t. A megfelelő inkubációs idő (16-24 óra) után a baktériumpázsit egyenletesen felnő, de a táptalajba diffundált antibiotikum a korong körül feltisztulási zónát eredményez, vagyis ott nem tud kinőni a baktérium (lásd az 1. ábra jobb oldali részét). Ennek a zónának a mérete leolvasható (a feltisztulási zóna átmérője milliméterben), ebből pedig kikövetkeztethető a vizsgált mikroba érzékenységi viszonya az adott antibiotikumhoz, és ez alapján a klinikus felé interpretálható az érzékenységi kategória (érzékeny, mérsékelten érzékeny, vagy rezisztens), végül megfelelő célzott terápia indítható. A leolvasott átmérők milliméter értékeiről szakmai ajánlásokban [15] megfogalmazott, nagyon részletesen kidolgozott interpretálási táblázatok léteznek (EUCAST által fejlesztve és folyamatosan frissítve, online, ingyenesen), melyekből végeredményben az antibiotikumonkénti interpretálások megtudhatók és amelyek révén az értékelő mikrobiológus az eredményeket összefoglalja a leleten, amit aztán a klinikus felé továbbít. Ezek alapján egy baktérium egy antibiotikummal szemben lehet érzékeny (azaz alkalmazható vele szemben az antibiotikum), és lehet rezisztens (azaz a baktérium ellenáll az antibiotikumnak, terápiás kudarc). Egy harmadik, köztes kategóriaként, bevezetésre került egy, a két véglet közti ún. mérsékelten érzékeny interpretálási kategória is, melynél a baktérium ellen *in vitro* esetleg már érzékenység tapasztalható, de bizonyos baktériumoknál ismert például, hogy egyes szerekkel szemben csökkent érzékenységet mutathatnak, vagy hogy a baktérium elérése bizonyos szervekben a szer számára valamilyen farmakológiai ok miatt nem a legmegfelelőbb. Ilyen esetekben ezek a szerek inkább a „nem használható”, vagy csak a „végszükség esetén használható” kategóriát jelentik a klinikus számára.

A korongdiffúziós módszer előtt történetileg az ún. leveshígítási és a táptalajhígítási technikák voltak használatosak [16], ezeknél koncentrációsorokat tartalmazó táplevesekben, illetve szintén meghatározott koncentrációjú antibiotikumokat tartalmazó táptalajokon történnek meg a mikrobák érzékenységi vizsgálatai.



2. ábra
Broth dilution method [16].



3. ábra
Agar dilution method [16, 17].

E módszerekkel robusztusságuk, anyag és munkaigényességük ellenére nagy pontossággal és jó reprodukálhatósággal értékelhetőek a különböző antibiotikumokkal szembeni érzékenységi viszonyok. További nagy előnyként említhető, hogy kvantifikálási eredmények is leolvashatók ezekből a vizsgálatokból (MIC értékek) [4, 18], mely a klinikust a megfelelő dozírozásban is segíti. Néhány, szilárd táptalajon nehezen, vagy egyáltalán nem tenyészthető baktériumnak még ma is a leveshígítási módszer az egyetlen ilyen vizsgálati lehetősége.

Egy, a korongdiffúziós technikától kissé eltérő, de alapelveiben hasonló és abból kifejlesztett [19] módszernél, a táptalajra felvitt baktériumpázsitra nem egyetlen adott koncentrációjú antibiotikumot tartalmazó papírcorongot, hanem egy koncentráció grádiens tartalmazó papírcsíkot, ún. Etest-et (eredetileg: „epsilometer test”) helyeznek fel az inokulált táptalaj felszínére [20, 21], aminek az eredménye az érzékenységi viszonyok pontosabb, kvantifikálható értékelése. Az Etest módszer rutin mikrobiológiai laboratóriumi alkalmazása mára már széleskörűen elfogadottá vált, eredményei a standard leveshígítási módszerrel is nagyon jól korrelálnak. Megfelelő használat esetén nagy biztonsággal állapítható meg a vizsgált mikroba adott antibiotikummal szembeni MIC értéke, mely a klinikust nagyban segíti a dozírozás kérdésében. Ezzel a módszerrel tulajdonképpen az addig standard módszerként alkalmazott leveshígítási módszer és az egyszerű és gyors korongdiffúziós technika kombinációja született meg. Az Etest módszer finomításával és optimalizálásával mára már a standard leveshígítási módszerrel versenyképes, ám jóval egyszerűbben kivitelezhető és sokkal kevésbé anyag és munkaigényes, napjainkra már széleskörűen el is terjedt (4. ábra).



4. ábra

Etest [22]. A feltisztulási zóna és a tesztcsík metszéspontja fölötti első felező-hígítási érték a MIC érték.

2. A vizsgálatok célja: a kórokozó baktériumok megismerése és megállítása

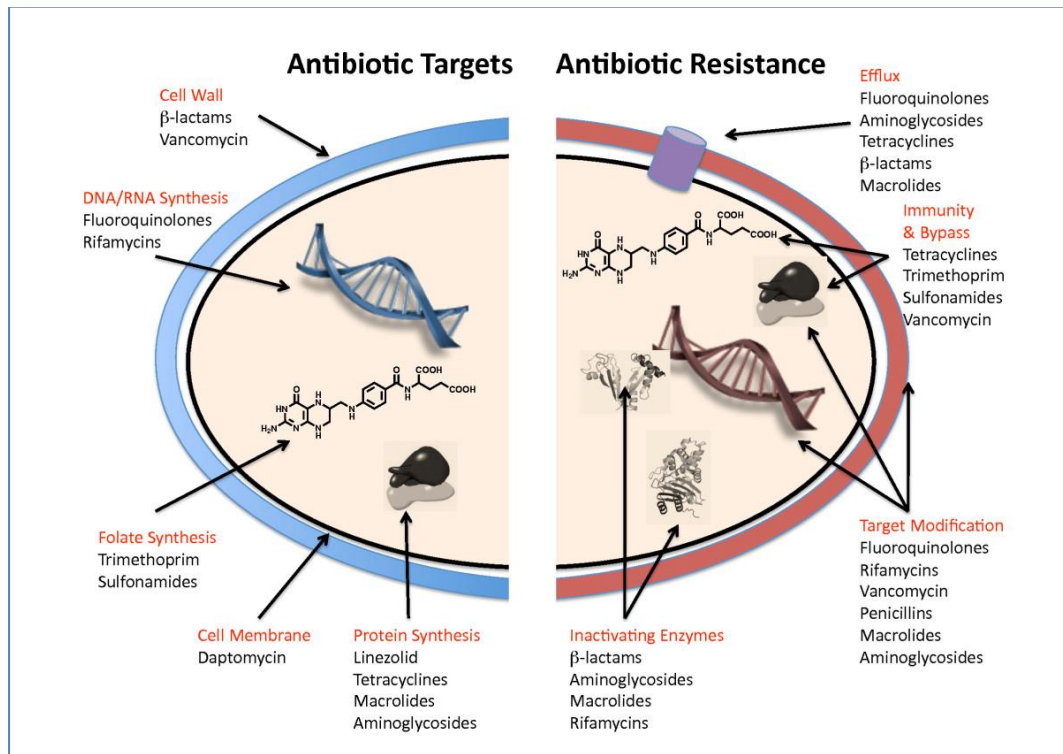
A klinikai mikrobiológiai rutin laborvizsgálatok célja elsődlegesen azoknak a kórokozó baktériumoknak, mikrobáknak a kimutatása, melyek valamilyen antibiotikummal szemben rezisztensek, vagyis annak felderítése, hogy melyek azok az antibiotikumok, amik alkalmazhatóak az adott patogének ellen.

A baktériumok rezisztenciamechanizmusainak kialakulása természetes, evolúciós folyamat. Szelekciós nyomás alatt (antibiotikumok jelenlétében) kiválogatódnak azok a véletlen mutánsok a baktériumok populációjából, amelyek ellenállni képesek ezeknek a szereknek [23]. A baktériumok reprodukciós ideje rendkívül gyors, és e reprodukciós folyamatokban mindig jelenlévő, kis mértékű változásokat generáló mutációk megjelenése nagyon gyorsan „kitermeli” az ellenálló klónokat, melyek azután tovább szaporodhatnak akkor is, ha valamilyen szelekciós nyomás alatt (pl. egy antibiotikum miatt) az eredeti populáció jórésze el is pusztul. Ráadásul jelentősen hozzájárul a rezisztenciák terjedéséhez még az is, hogy ezeket a számukra rezisztenciákat adó géneket a baktériumok – nem is túl nagy nehézséggel – egymás között adni-venni is képesek.

Ezeket az általános, világszerte történő folyamatok visszafordítani már nem lehetséges, a nagyipari érdekek és az emberiség élelmezési szükséglete valószínűleg már nem enged hirtelen és gyökeres szemléletváltást az antibiotikumok széles körű felhasználási gyakorlatában, a már rezisztens baktériumok lassú, de biztos világméretű elterjedését megállítani szinte lehetetlen, egyetlen lehetőségként a folyamat végén lévő betegekből izolált baktériumok antibiogramjának gyors és pontos interpretációja marad, ami alapján a klinikus célzott és hatékony terápiával megmentheti a beteget a kórokozótól, amiben a laboratóriumi vizsgálatok gyors eredményei alapvető segítségére lehetnek.

3.1. A baktériumok rezisztencia típusai és mechanizmusai

A rezisztens baktériumok kialakulásának evolúciós folyamatai sokfélék, ahogyan ennek eredményeként az is sokféle, amennyi féle-fajta rezisztenciamechanizmust adó genetikai változás képes megvédeni a mikrobákat az ellenük használt szerektől (5. ábra).



5. ábra

Antibiotikum csoportok támadáspontjai és bakteriális védekező rezisztenciamechanizmusok [24]

A genetikai változás néha csak pontszerű és a kis mértékben megváltozott DNS-ről hasonlóan kis mértékben megváltozott fehérjetermék valamilyen előnyhöz juttatja a mikrobát. Sok esetben genetikai állományukban, azaz potenciális eszköztárakban elrejtve, már eleve megtalálhatóak olyan rendszerek, melyek megvédeni képesek a baktériumot, de ezek általában csak akkor lépnek működésbe, ha valamilyen indukció éri a sejtet, és ez az indukció a legtöbb esetben maga az éppen használt antibiotikum, de az is előfordul, hogy valamilyen egyszerűbb mutáció okozza egy-egy ilyen rendszer bekapcsolódását, túltermelését. Viszonylag gyakran egész enzimszereket kódoló génkaszetták és plazmidok felvétele révén szereznek a baktériumok bizonyos rezisztenciamechanizmusokat horizontális nukleinsav-transzfer révén, ilyenkor általában többszörös rezisztenciákhoz jut a genetikai elemeket fogadó baktérium, gyakori, hogy multidrog-rezisztens klónok keletkeznek az ezeket a plazmidokat és egyéb átvehető rezisztenciagéneket „beszajzó” baktériumokból.

Azért lehetnek jelen eleve a baktériumok genetikai anyagának örökségében is (vagy átvehető, nyugvó plazmidokban és egyéb elemekben) antibiotikus fehérjetermék, mert a természetben is jelen vannak már ősidők óta az antibiotikumok is (1. táblázat).

antibiotikum csoport	gátlás célterülete	természetesen termelt antibiotikumok		szintetikus antibiotikumok
		baktériumok	gombák	gyógyszeripar
béta-laktámok	sejtfal bioszintézis	klavulánsav	penicillin, cefalosporinok	penicillin származékok, ampicillin, amoxicillin, oxacillin, methicillin, cefalosporinok, karbapenemek
glikopeptidok	sejtfal bioszintézis, RNS-szintézis, sejtmembrán	vancomycin, teicoplanin		
peptidek AB-ok	membránpermeabilitás	bacitracin, polymyxin B, polymyxin E (colistin)		
lipopeptidek	membránpolarizáció	daptomycin		
aminoglikozidok	fehérjeszintézis (30S P10)	streptomycin, neomycin, kanamycin, amikacin, tobramycin, gentamycin		netilmicin
tetraciklinek	fehérjeszintézis (30S)	tetracycline		tigecycline, doxycycline
linkózaminok	fehérjeszintézis (50S)	lincomycin		clindamycin
streptograminok	fehérjeszintézis (50S)	pristinamycin		quinupristin
oxazolidinonok	fehérjeszintézis (50S)			linezolid
chloramphenicol	fehérjeszintézis (50S)	(chloramphenicol)		chloramphenicol
makrolidok	fehérjeszintézis (peptidil transzferáz)	erythromycin		azithromycin
mupirocin	fehérjeszintézis (tRNS)	mupirocin		
nitrofurantoin	flavoproteinek			nitrofurantoin
szulfonamidok	folsav bioszintézis			szulfonamid
nitroimidazolok	DNS, makromolekulák			metronidazole
rifamicinek	RNS-polimeráz	rifamicinek		rifampicin
kinolonok	DNS-szintézis (girázok, topoizomerázok)			nalidixsav, norfloxacin, ciprofloxacín, levofloxacin, moxifloxacin

1. táblázat

A legfontosabb antibiotikum csoportok, alapvető hatásmechanizmusaik és származásuk

Ezeket az anyagokat főleg gombák képesek nagy mennyiségben termelni a maguk védelme és a baktériumok visszaszorítására (pl. *Penicillium*-ok [4], *Acremonium*-ok [25]), de még az állati mirigyekben és még néhány speciális sejtünkben is találunk bizonyos antibiotikus anyagokat (pl. lizozim és más fehérjék [26], defensinek [27]). És természetesen maguk a baktériumok is rendkívül sok és sokféle antibiotikus anyagokat képesek termelni más baktériumok ellen (pl. *Bacillus*-ok: bacitracin, polymyxin B [28]; *Streptomyces*-ek: streptomycin, erythromycin, neomycin, tetracyclin, vancomycin, rifampicin (és az antifungális amphotericin B) [29]; *Micromonospora*: gentamycin [30]). Egyelőre nem teljesen feltártak még a növények által termelt antibiotikus hatású vegyületek, ezek főleg fenol-, flavonoid- és terpénszármazékok, valószínűleg jóval több lehetőség van még ezen a területen, mint amennyit eddig ismerünk [31]. Az általunk ma alkalmazott, FDA által elfogadott antibiotikumok 51%-a bakteriális, 46%-a gomba, 3%-a növényi eredetű antibiotikum (és mindezek módosított vegyületei) [32].

Az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciák kialakulásakor legegyszerűbb esetben olyan kisebb mutációk (pontmutációk) vagy deléciós mutációk történnek, melyek például az antibiotikum felvételéért szükséges fehérjék (pl. porinok) szerkezetének megváltozásával vagy kifejeződésének elmaradásával járnak, így a sejtmembrán permeabilitása lecsökken az antibiotikum számára, végül a baktérium egyszerűen elkerüli az antibiotikum hatását [33].

Némelyik antibiotikum a baktérium sejtmembránjában vagy sejtfalában zajló folyamatok megállítására gátolja a baktériumot, melybe normális esetben a baktérium

bele is pusztulna, de ha az antibiotikum szubsztrátjaként viselkedő targetmolekulák kisebb-nagyobb mértékben megváltoznak, az antibakteriális hatás elmarad (pl. PBP2a). PBP2a esetében horizontális géntranszfer is lehetséges a módosult fehérjét hordozó génkazetta (*SCCmec*) átadása és átvétele révén bármely más *Staphylococcus* sejtbe is [34, 35, 36].

Hasonló végeredményhez jutnak azok a klónok is, amelyeknél az antibiotikumok bekerülnek ugyan a bakteriális sejtekbe, de bizonyos mutációk révén nagy hatékonysággal képesek azt onnan ki is szállítani, sőt némelyik antibiotikum indukálhatja is olyan gének expresszáldását, amik szinte maradéktalan kiszállításukról tudnak gondoskodni (pl. indukált vagy over-expresszált transzporter rendszerek és efflux-pumpák) [37].

Szintén sok antibiotikum támadáspontjául szolgál a bakteriális fehérjeszintézis bonyolult enzimrendszere. Például aminoglikozidok esetében igen gyakori, hogy az antibiotikumokat a citoplazmában olyan enzimek módosítják (acetiltransferázok, nukleotidiltransferázok és foszfortranszferázok), melyek normálisan más sejtfolymatokban vesznek részt, de mutáció révén kialakulhatnak az aminoglikozidok módosítására alkalmas enzimek is és így végül megint csak elmaradhat az antibiotikus hatás [38]. Szintén gyakori aminoglikozid rezisztenciamechanizmus (RND) efflux-pumpák segítségével kijuttatni a sejtől az antibiotikumokat [38, 39]. És természetesen itt is sok olyan apróbb mutációból létrejövő lehetősége van még a sejtnek, amikor pl. az aminoglikozidok fehérje- és egyéb molekuláris targetjei (riboszómális fehérjék, 16S RNS) változásai révén az antibiotikum kötődési affinitása jelentősen lecsökken, azaz a hatása elmarad [40].

Ha az antibiotikum a bakteriális sejtmembrán normális permeabilitását hivatott radikálisan lecsökkenteni – amibe a baktérium a különböző ionegyensúlyi zavarok miatt bele is hal –, rezisztencia kialakulásakor az antibiotikum szubsztrátjaként működő citoplazmatikus fehérjék változása miatt ez szintén meghiúsulhat (pl. szerzett polymyxin B rezisztencia) [41].

Némely antibiotikumcsoport (kinolonok) magát a bakteriális DNS-szintézist képesek gátolni, rezisztencia kialakulásához a target molekulák (giráz, topoizomeráz enzimek) olyan kisebb-nagyobb mértékű változása szükséges, hogy az antibiotikum ne tudjon hozzájuk kötődni és így a hatását kifejteni. Egy ritkább „megközelítés” szerint léteznek olyan enzimek is, amelyek egyszerűen képesek az antibiotikumot módosítani (acetilálni) és ezáltal hatástalanná tenni azokat (*Aac(6)-Ib-cr* enzim), ezek is plazmidkódolt enzimek [42, 43, 44].

A sok antibiotikumcsoport – köztük a talán legelterjedtebben használt béta-laktámok is – támadás pontjaként szolgáló bakteriális sejtfa legkomplexebb védelmi rendszerei azok a rezisztencia mechanizmusok, amikor (akár indukció révén, akár konstitutívan) a baktérium olyan enzimeket képes termelni, amik magukat az antibiotikum molekulákat tudják támadni, módosítani, elhasítani, végeredményként a baktériumsejtet megvédeni. Ezek az enzimek az ún. béta-laktamázok. Némelyik béta-laktamáz enzim csak az egyszerűbb és kisebb hatásspektrumú béta-laktámokat képes hatástalanítani (penicillinázok), némelyik enzim a cefalosporinok különböző szintű generációit tudja módosítani (cefalosporinázok), vannak azonban szinte az összes béta-laktám antibiotikum ellen teljeskörű védelmet biztosító enzimek is (ESBL-ek, AmpC-k, karbapenemázok, metallo-béta-laktamázok). Ezek a béta-laktamáz enzimek lehetnek kromoszómálisan vagy plazmidokon kódoltan a baktériumban,

előbbi esetben kicsit körülményesebben és ritkábban, de átadódhatnak egyik sejtől a másikba horizontálisan is, utóbbi esetben a rezisztencia horizontális átadása egyszerű, hatékony és elterjedt módja e rezisztenciamechanizmusok gyors terjedésének (pl. ESBL enzimeket kódoló plazmidok). Ezeknek a genetikai elemeknek a minél könnyebb terjedése nagyon nagy szelekciós előnyt biztosít a mikrobáknak, és mivel széles körű rezisztenciát élveznek, nagy kihívást jelentenek az ellenük folytatott terápiában is. Dolgozatunk kiemelten foglalkozik a béta-laktamázokkal, ezért ennek a témának az alapjait is részletesebben tárgyaljuk a bevezető részben is.

3.2. A béta-laktamázok

A béta-laktamázok tehát olyan bakteriális enzimek, melyek képesek módosítani a béta-laktám antibiotikumok molekuláit. Ennek a módosításnak az egyszerű biokémiai alapja az, hogy ezek az enzimek a minden béta-laktám antibiotikum vázát képző béta-laktám gyűrűt képesek hidrolizálni, a hidrolízis révén létrejövő molekula pedig már nem képes antibiotikus hatást kifejteni. A baktérium így pedig a legtöbb esetben túl is éli az antibiotikus hatást.

A béta-laktamáz enzimek ismert típusainak száma ma megközelíti az 1000-et, amelyeket jelenleg 24 nagyobb csoportba sorolunk [44], de a jelenlegi kissé kaotikusnak tűnő helyzetet még tovább bonyolítja, hogy nem csak egyféle csoportosítási rendszernek van létjogosultsága, sőt még maga a nomenklatura is elég gyakran változik [45]. (2. táblázat)

osztályozási rendszer						spec.inhibitor			
Ambler	Bush-Jacoby-Medeiros	Richmond-Sykes	Mitsuhashi-Inoue	szubsztrátok (targetek)	enzimek	klav., sub., tazob.	EDTA	APBA	cloxacillin
A szerin- penicillinázok	2a	-	PCase V	penicillinek	PC1 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	+	-	-	-
	2b	III	PCase I	penicillinek, 1. gen. cefalosporinok	TEM-1 TEM-2 SHV-1	+	-	-	-
	2be	- (kiv. K1)	CXase	penicillinek, 2., 3., 4. gen. cefalosporinok	(ESBL-ek) SHV-2-től SHV-6-ig TEM-3-tól TEM-26-ig CTX-M K1 (<i>Klebsiella oxytoca</i>)	+	-	-	-
	2br	-	-	penicillinek	TEM-30-tól TEM 36-ig SHV-72 TRC-1	-	-	-	-
	2c	II, V	PCase IV	penicillinek, karboxy- penicillinek	PSE-1 PSE-3 PSE-4	+	-	-	-
	2e	Ic	CXase	2., 3., 4. gen. cefalosporinok	FEC-1 CepA <i>Proteus vulgaris</i> indukálható cefalosporinázai	+	-	-	-
	2f	-	-	penicillinek, cefalosporinok, karbapenemek	KPC (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) SME (<i>Serratia marcescens</i>) NMC-A (<i>Enterobacter cloacae</i>) GES	±	-	±	-
B metallo-β- laktamázok	3	-	-	legtöbb béta- laktám, karbapenemek	IMP (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) IMI (<i>Enterobacter cloacae</i>) VIM (<i>Acinetobacter baumannii</i>) CcrA, BclI (B1), CphA (B2), L1 (B3) NDM, OXA-23, OXA-24/40, OXA-58	-	+	-	-
C cefalosporinázok	1	Ia, Ib, Id	CSase	cefalosporinok	AmpC, CMY, ACT, MIR-1	-	-	±	±
D oxacillinázok	2d	V	PCase II és III	penicillinek, cloxacillinok	OXA-1-től OXA-11-ig PSE-2 (OXA-10)	±	-	-	-
egyéb	4	-	-	penicillinek	<i>Burkholderia cepacia</i> penicillináza	-	?	?	?

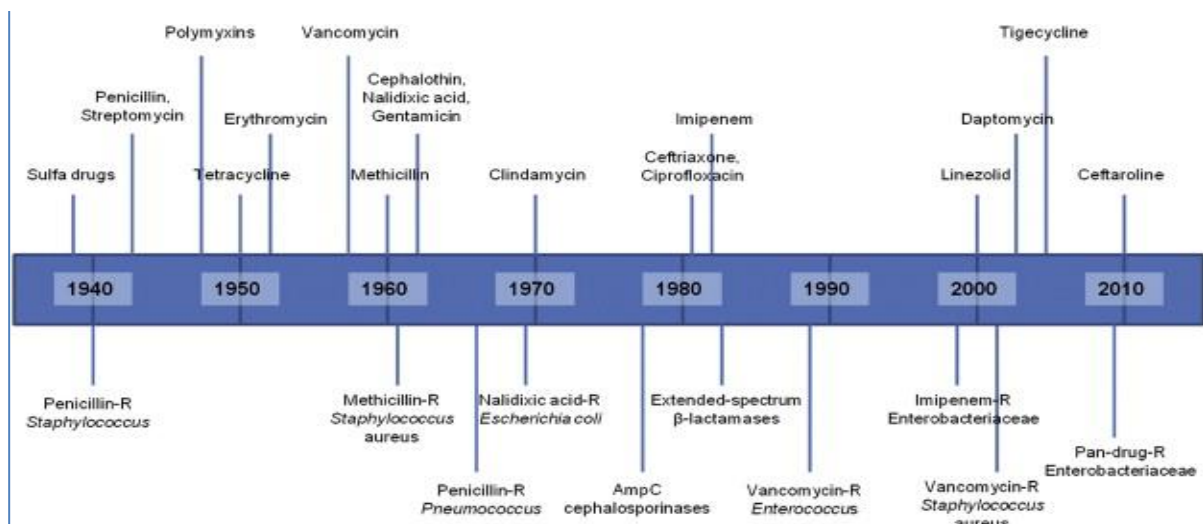
2. táblázat

A legfontosabb béta-laktamáz enzimesoportok különböző rendszerezéseik szerint [47, 48, 49, 50, 51].

A béta-laktamázok klasszifikációja meglehetősen komplikált feladat, mert akár a strukturális, akár a funkcionális megközelítés alapján próbáljuk meg összegezni őket, mindig lesznek kivételek és átfedések, időközben történő változtatások, illetve a rendszerezések kisebb-nagyobb revíziókon is átesnek. A már említett osztályozási rendszereken kívül természetesen mások is léteznek, az Ambler-féle strukturális osztályozásból kiindulva hasonlítottuk össze a főbb rendszerek csoportjait és az ezekben a csoportokba tartozó enzimeket a 2. táblázatban.

A történetileg legkorábbi, az 1970-es és '80-as években megszületett első osztályozási rendszereket (Richmond-Sykes, 1973 [50], Mitsuhashi-Inoue, 1981 [51]) ma már kevésbé használják, bár valószínűleg ezekre épült a későbbi Bush-Jacoby-Medeiros rendszer is (1995 [49]). Az Ambler-féle osztályozás az 1980-as kidolgozása [47] után több revízió is átesve [48], manapság a legtöbbször hivatkozott és a legelfogadottabb rendszernek tűnik.

Létezik funkcionális megközelítésű (Bush-Jacoby-Medeiros) és enzimszerkezeti alapokon nyugvó (Ambler) klasszifikáció is. A jelenlegi ismereteinket tartalmazó osztályozási rendszerek létezése mellett egyébként még az is nagyon valószínű, hogy közel sem ismerünk még minden béta-laktamáz típust vagy akár egyes enzimféleségeket. Ennek az oka az, hogy a tudomány csak egymást követő nagyobb hullámokban ismeri meg ezeket a humán- és állategészségügyi gyakorlatból izolált baktériumokat, melyek ilyen enzimeket hordoznak. Ezek a hullámok pedig annak köszönhetőek, ahogyan az orvostudomány (és más, jelentősebb antibiotikum felhasználó területek) az antibiotikumok újabb és újabb generációit veti be a baktériumok ellen. Ezekre válaszul, napjainkban körülbelül már 3-10 éves válaszüddel jelennek meg az első olyan ismert klónok, melyek már a legújabb generációs antibiotikumoknak is képesek ellenállni [44] (6. ábra). Az így kialakuló rezisztenciákhoz a baktériumok kisebb-nagyobb genetikai változásokon át juthatnak el már létező enzimek módosulásával, alkalmazkodásával, majd specializálódásával az új szerekkel szemben, de akár eddig egészen más funkciót betöltő bakteriális fehérjék is kerülhetnek védő szerepkörbe.



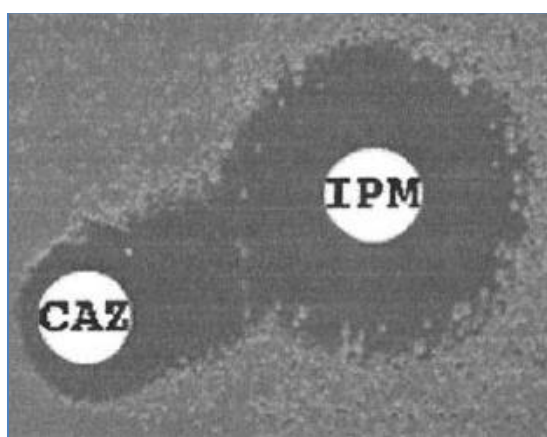
6. ábra

Antibiotikumok bevezetése és különböző rezisztenciamechanizmusok összefüggései [46].

3. Speciális érzékenységvizsgálati módszerek (hagyományos megközelítés)

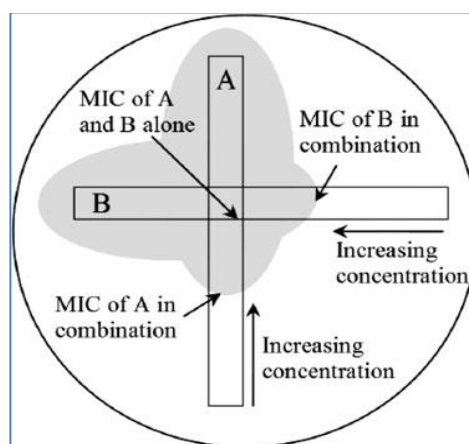
A mai mikrobiológiai laboratóriumokban a legáltalánosabban elterjedt antibiotikum érzékenység vizsgálati módszer a korongdiffúziós (Kirby-Bauer) módszer. Még ennek az egyszerű módszernek a változataival is lehetséges olyan enzimek jelenlétére következtetni, melyek komoly kihívás elé állítják a klinikusokat is, ha terápiára kerül sor.

Legegyszerűbb esetben azt vizsgálhatjuk, hogy létezik-e például két antibiotikum között valamilyen szinergizmus („együtműködés”) az adott baktérium ellen. A korongok elhelyezésekor olyan kialakításra kell törekedni, hogy az egyes antibiotikumok baktériumokra gyakorolt együttes, erősebb hatását tudjuk észrevenni fenotípusosan (ugyanígy természetesen antagonisztikus hatások is felderíthetők). Ezeket az együttes hatásokat a feltisztulási zónák különböző irányú és mértékű torzulásaiból tudjuk kikövetkeztetni (7. ábra). Ugyanez a módszer természetesen létezik a már tárgyalt Etest módszerek esetében is (8. ábra), ahol még a MIC-értékek mennyiségi változását is mérhetjük. Az egyszerű antibiotikum szinergizmusok detektálása abból a szempontból lehet fontos, hogy bizonyos antibiotikumokat együttesen alkalmazva – köztük igazoltan fennálló szinergista hatás esetén – a terápiában nagyon nagy segítséget jelenthet ennek a két szer együttesen erősebb antibiotikus hatása. A molekuláris háttere két szinergista antibiotikumnak abban áll, hogy míg az egyik például a baktérium membránpermeabilitását növeli meg, a másik emiatt nagyobb koncentrációban tud a sejtbe emiatt bejutni, vagyis együttesen erősebb hatást generál a két antibiotikum. További előny lehet, hogy mivel bizonyos antibiotikumok nagyobb dózisban az emberre is károsak, alacsonyabb dozírozással ez a veszély csökkenthető is.



7. ábra

Ceftazidim és imipenem szinergista hatása cloxacillin jelenlétében (teszt baktérium: GES-1 típusú béta-laktamázzal rendelkező *Pseudomonas aeruginosa* törzs) [52]. Az imipenem felé jelentősen eltorzult a ceftazidim körüli zóna.

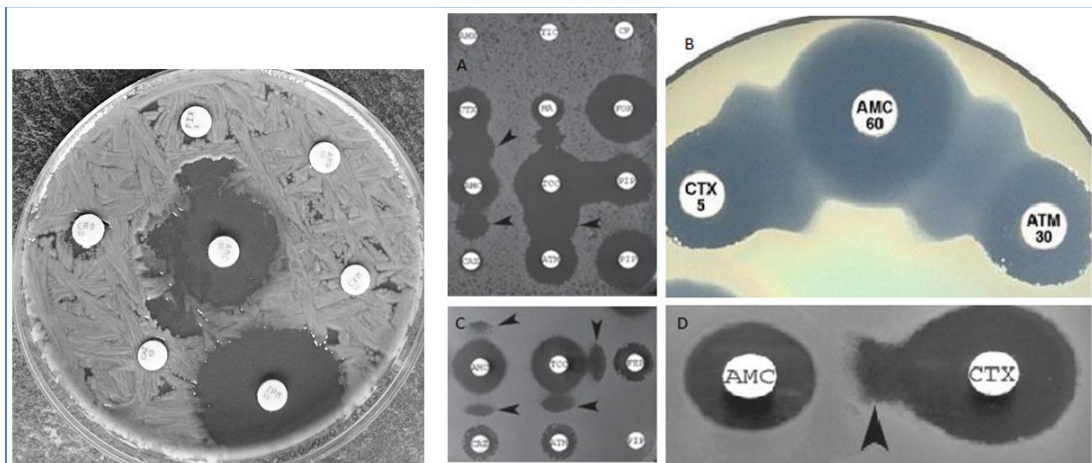


8. ábra

Szinergizmus vizsgálat Etestekkel. A vizsgált két antibiotikus anyag együttes hatása alacsony MIC-értékeket biztosít mindkét szer esetében [53], vagyis az alkalmazási dózis kisebb lehet.

4.1. ESBL és AmpC enzimek

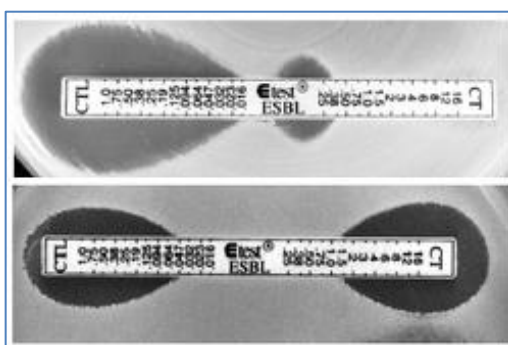
Az EUCAST által ajánlott alapvető érzékenységvizsgálati korongdiffúziós panelben is jelen van egy ilyen szinergista hatás kimutatására való lehetőség Gram-negatív bélbaktériumok antibiogramjának elkészítésekor: ESBL-termelő baktériumok gyors és megbízható kimutatására alkalmas az ún. kulcslyuk fenotípus megjelenése az amoxicillin/klavulánsav (Augmentin) és harmadik generációs cefalosporin korongok közötti feltisztulási zónák torzulásában (lásd 9. (D) ábra). Az ESBL enzimek alapvető és általános tulajdonsága, hogy klavulánsavval irreverzibilisen gátolhatóak, ami *in vitro* azt eredményezi, hogy az amoxicillin/klavulánsav korongból a táptalajba diffundáló klavulánsav szinergistaként tud hatni egyes harmadik generációs cefalosporinokkal és amíg ezek a cefalosporinok önmagukban nem jelentenek akadályt az ESBL-termelő baktériumok növekedésének, addig a klavulánsav és a cefalosporin együttes hatásként már képes megakadályozni a baktérium szaporodását a táptalajon. Ennek háttérében az áll, hogy a klavulánsav gátolja az ESBL enzimet, és ezen enzim hiányában a baktériumot el tudja pusztítani a cefalosporin. A módszert „double-disc method”-ként is nevezi a szakirodalom (két korong egymástól 22-25 mm-re elhelyezve). A kulcslyuk forma megjelenése nem mindig egyforma, a leoltási inokulum mennyiségétől, a táptalajtól, a baktériumtól és egyéb paraméterektől függően lehetnek kisebb-nagyobb mértékben eltérő módon torzult feltisztulási zónák is, de ezek jelenléte egyértelműen felhívja a figyelmet az ESBL enzimek jelenlétére a vizsgált Gram-negatív bélbaktérium esetében. Ez az eredmény pedig alapvetően befolyásolja az antibiogram interpretációját: minden béta-laktám típusú antibiotikum rezisztensként adandó ki a karbapenemek kivételével. *In vivo* az amoxicillin/klavulánsav kombinációs antibiotikum csak az egyszerűbb béta-laktamáz termelő baktériumok ellen hatékony, ESBL-eknél és más, hasonló szélesspektrumú rezisztenciát biztosító enzimek termelése esetén nem.



9. ábra

ESBL-termelő baktériumok detektálása kombinált korongdiffúziós módszerrel (double disc method). Bal oldal: saját fotó (*Escherichia coli*). Jobb oldal: A) *Proteus mirabilis* [54], B) *Klebsiella pneumoniae* [55], C) *Escherichia coli* [56], D) a „klasszikus” kulcslyuk fenotípus double disc tesztben [56].

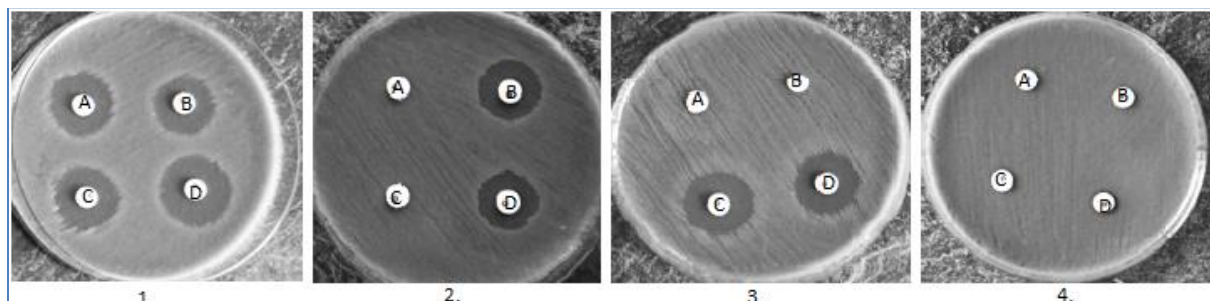
ESBL-termelő baktériumok kimutatása Etest módszerrel is lehetséges. Már rendelkezésre állnak olyan kombinált antibiotikum tesztesíkok, melyekkel a double-disc módszerhez hasonló elven detektálható ez az enzimescsoport. Ebben az esetben a két vizsgált antibiotikum – egy harmadik generációs cefalosporin (pl. cefotaxim) és a klavulánsav – nem külön papír korongokban, hanem egy közös papír tesztesíkon vannak, ellenkező irányú grádiensekkel. A teszt eredménye, hogy az ESBL-inhibitor klavulánsav + harmadik generációs cefalosporin és ugyanezen cefalosporin (egyedül) között itt is egy új, közös, szinergista hatásból származó feltisztulási zóna jelenik meg. Másik fenotípusos lehetőség, ha ilyen egyértelmű, feltisztulási zóna nem alakul ki, hogy a inhibitorral kiegészített cefalosporin MIC-értéke jelentősen alacsonyabb az önmagában mért cefalosporin MIC-énél (10. ábra alul).



10. ábra
ESBL-termelő baktériumok detektálása Etesttel [57].

Ha izolátumunkról az előbbi tesztek egyikével sem mutatható ki egyértelműen, hogy valóban ESBL-termelő, de az általános antibiogramján nyilvánvalóan látszik, hogy valamilyen egyéb széleskörű béta-laktám rezisztenciával rendelkezik, akkor felmerül a gyanú, hogy valamilyen ritkább, és sajnos nehezebben kimutatható rezisztenciamechanizmus áll a háttérben. Ilyen esetekben leggyakrabban az ún. AmpC típusú rezisztenciával van dolgunk, mely spektrumát tekintve ugyanúgy teljeskörű béta-laktám rezisztenciát biztosít a baktériumnak, de klavulánsavval, vagy valamilyen más ESBL-enzim gátló anyaggal nem gátolható. Az AmpC enzimek szintén lehetnek plazmid vagy kromoszómális kódolásúak és gyakori, hogy konstitutívan termelik a baktériumok egy viszonylag alacsony szinten (de léteznek stabilan represszált genotípusok is) az viszont mindannyiukra jellemző, hogy indukció vagy mutáció révén expressziójuk jelentősen megugorhat és akár hiperprodukciónak is termelődhet. Az ESBL enzimektől jellegzetes eltérés még, hogy a klavulánsav csak gyenge inhibitoruk, jobb inhibitorként az APBA-t említhetjük (3-aminofenil-boronsav), az antibiogramban pedig az AmpC enzimeket termelő baktériumok *in vitro* mindig rezisztensek cefamicinekre (cefoxitin, cefotetan). *In vivo* mindkét csoport rezisztens rájuk. Mivel azonban a cefamicinek nem szerepelnek az általánosan használt (EUCAST) Gram-negatív bélbaktériumok vizsgálandó antibiotikumai között, ezért ezt a gyanút megerősíteni csak egy újabb vizsgálattal lehet.

Létezik olyan, kereskedelmi forgalomban is kapható teszt is, mely abban az esetben is adhat egyértelmű eredményeket, ha izolátumunk nem ESBL-termelő (nincs kulcslyukszerű zónatorzulás), de jellegzetesen és széleskörűen rezisztens béta-laktámokra, és ebben a tesztben az AmpC-termelő baktériumok is azonnal igazolhatóak. A teszt [58] során egy harmadik generációs cefalosporin antibiotikum és két inhibitor együttes hatásait vizsgáljuk az izolátumon. A cefalosporin ebben az esetben 10 µg cefpodoxim, az inhibitorok pedig egy ESBL-inhibitor (valószínűleg klavulánsav) és egy AmpC inhibitor (valószínűleg APBA és valamilyen más molekula 1:1 arányú elegye a kitelírás alapján). Az „A” korong csak cefpodoxim, a „B” korong cefpodoxim + ESBL inhibitor, a „C” korong cefpodoxim + AmpC inhibitor, a „D” korong cefpodoxim + ESBL inhibitor + AmpC inhibitor tartalmú. Ha mindegyik feltisztulási zóna egyforma, akkor az izolátum cefpodoxim érzékeny és nem termel sem ESBL, sem AmpC enzimet. Ha az A zóna legalább 5 mm-rel kisebb, mint a B zóna (és ugyanez a reláció megfigyelhető a C és a D zóna között is), akkor ESBL-termelő az izolátum. Ha az A és a B zóna átmérői legalább 5 mm-rel kisebbek a C és D zóna átmérőitől, akkor az izolátum AmpC-termelő. Ha mind az A, mind a B, mind pedig a C zóna legalább 5 mm-rel kisebb a D zóna átmérőjénél, akkor az izolátum egyaránt ESBL-termelő és AmpC-termelő is. Ha egyik korong körül sincs semmilyen feltisztulási zóna, akkor e két fenti enzimen is túli, egyéb rezisztenciamechanizmus áll a háttérben. (A gyakorlatban ez az egész legtöbbször leegyszerűsödik arra a szintre, hogy ha A és C körül nincs, B és D körül van feltisztulási zóna, akkor ESBL; ha A és B körül nincs és C és D körül van zóna, akkor AmpC; ha A, B és C körül nincs zóna és D körül van feltisztulás, akkor ESBL és AmpC egyszerre; ha semmilyen feltisztulási zóna nincs, akkor ezeken túli rezisztencia mechanizmust adó enzim hordozásáról és aktív termeléséről van szó.) Mindezt összefoglalóan szemlélteti a 11. ábra.



11. ábra

D68C tesztek. (Saját fotók.)

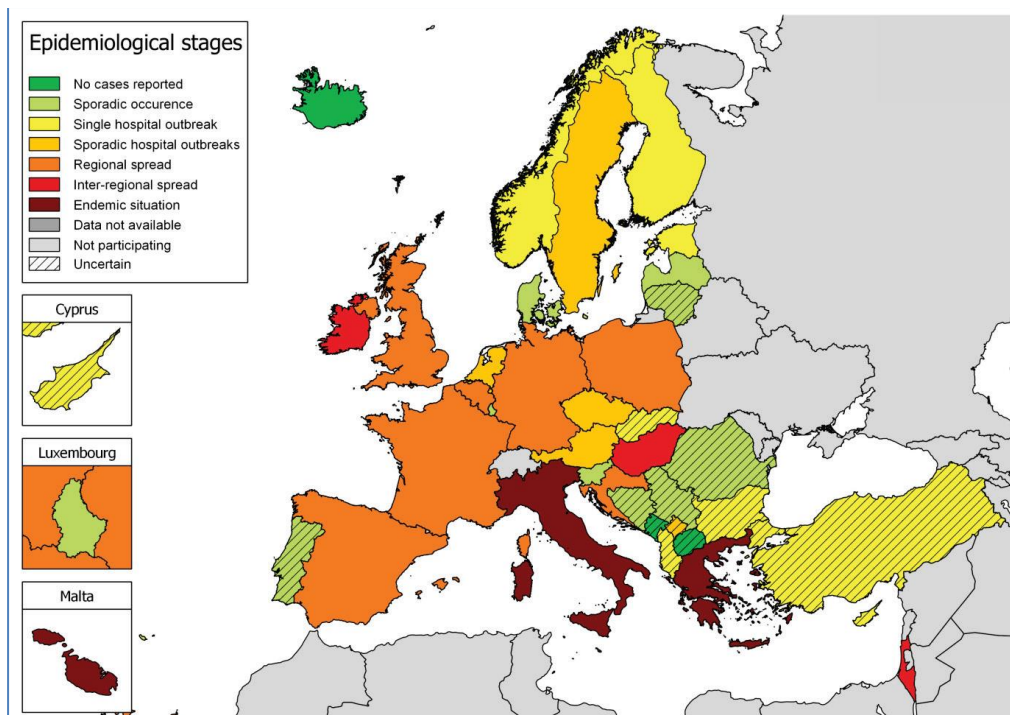
1. ATCC 25922 *Escherichia coli* referenciatörzs – nincs rezisztencia
2. 2062/2018 (G1/79.) *Escherichia coli* klinikai izolátum – ESBL termelő
3. G1/86. *Enterobacter asburiae* klinikai izolátum – AmpC termelő
4. 16616/2018 (G1/84.) *Escherichia coli* klinikai izolátum – nem ESBL és nem AmpC , de rezisztens mindenre → egyéb rezisztenciamechanizmus (karbapenemáz (lásd később))

Léteznek ennél valamelyest bonyolultabb laboratóriumi tesztek is AmpC enzimtermelés kimutatására [59, 60], köztük kisebb-nagyobb szenzitivitási és specificitási különbségekkel.

Mindezek mellett meg kell jegyezni, hogy már léteznek, és az első inhibitorral kombinált szerek (amoxicillin/klavulánsav, ticarcillin/klavulánsav) 1990-es évekbeli bevezetése után néhány évvel már a klinikai gyakorlatból is ismertek olyan ESBL-enzimek, amelyek nem gátolhatók a napjainkban létező és alkalmazott ESBL-inhibitorokkal (klavulánsav, sulbactam, tazobactam) [61]. Ezek az IRT, azaz inhibitor rezisztens TEM típusú béta-laktamáz enzimek nevükben hordozzák, hogy miért is veszélyesek: inhibitorokra nem reagálnak, azaz kimutatásuk és igazolásuk jóval nehezebb. Ismert az is, hogy a TEM típusú béta-laktamázok a legelterjedtebb típusú béta-laktamázok, de egyelőre csak kevés közülük az IRT típusú. További aggodalomra ad okot, hogy a szintén elég gyakori CTX típusú ESBL enzimek között [62], sőt ami még ijesztőbb, hogy a KPC-2 béta-laktamázok (karbapenemáz) között is találtak már IR mutánsokat [63].

4.2. A karbapenemázok

Az ESBL és AmpC enzimeket termelő kórokozók interpretálásakor – a karbapenemek kivételével – minden béta-laktám típusú antibiotikumot és inhibitorral kombinált szert is rezisztensként kell megadni. A karbapenemek (imipenem, meropenem, ertapenem) voltak általánosan azok a szerek, melyek ezeknél a multirezisztens kórokozóknál sokszor egyedüli terápiás megoldásként szóba kerülhettek. A múlt idő használata azért indokolt, mert már Európában és Észak-Amerikában is megjelentek azok a baktériumok (egyelőre főleg csak nosocomiálisan), amelyek rezisztenciát szereztek ezek ellen az antibiotikumok ellen is. A karbapenem rezisztens izolátumok (CPE (carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*)) terjedése már nem csak fenyegető, de még távoli riogatás, hanem a valóság. Magyarországon is történtek már izolálások, a dokumentálatlan esetek miatt ez a szám pedig valószínűleg magasabb is valamennyivel. Az európai léptékben tevékenykedő ECDC [64] 2013-as kiadású tanulmánya alapján [65] a mediterrán országok a leginkább érintettek, észak felé haladva a prevalencia csökken. Magyarországon a dokumentálást az Országos Epidemiológiai Központ [66] végzi, a felbukkanó esetekről a Nemzeti Surveillance Rendszer ad hírt [67].



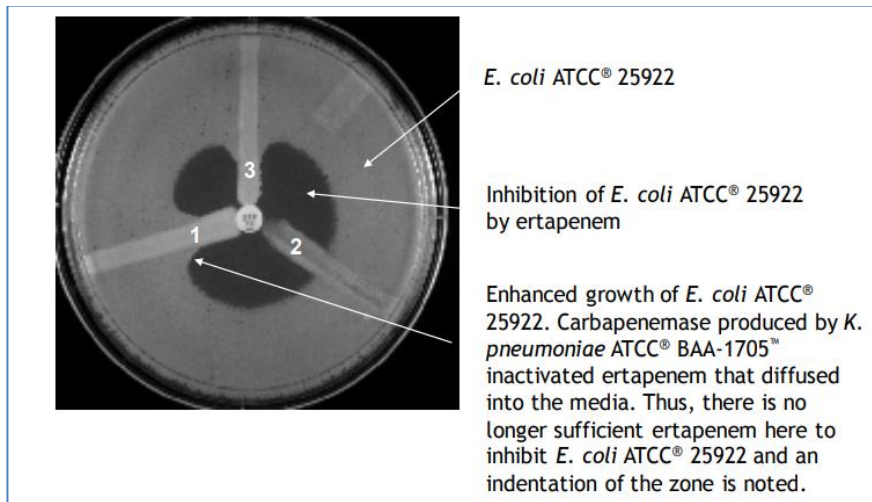
12. ábra

Az ECDC 2013-as adatai az európai CPE izolátumokról [65].

A karbapenemáz enzimek terjedését jelentősen elősegíti, hogy ugyanúgy, ahogy az ESBL enzimeknél is történik, plazmidok segítségével horizontális géntranszfer is lehetséges különböző baktériumok között konjugáció révén. Természetesen állatok is hordozhatnak ilyen enzimeket termelő baktériumokat, mely szintén a gyors földrajzi szóródást segíti [68].

Karbapenem rezisztenciavizsgálat rutinszerűen, az aktuális ajánlás alapján, csak annyiban történik, hogy az izolátumot a hagyományos korongdiffúziós módszerrel többek között imipenemre is vizsgáljuk. Szükségesség esetén meropenem és ertapenem vizsgálatok is történhetnek, kérés vagy szükség esetén MIC meghatározás is lehetséges Etestekkel. A karbapenem rezisztencia gyanúja abban az esetben merülhet fel az inkubáció első 24 órája után, ha a vizsgált karbapenem antibiotikum korong körüli feltisztulási zóna határérték alatti, vagy nincs is feltisztulási zóna. A MIC meghatározással természetesen igazoltnak lehet tekinteni a rezisztenciát, de ilyenkor is lehetőség van egy speciális módszer elvégzésére, amellyel biztosan igazolható a karbapenemáz aktivitás az adott izolátumnál. Mind az EUCAST, mind az amerikai CLSI [69] rutin mikrobiológiai ajánlásai sokáig tartalmazták is, hogy mielőtt karbapenemáz termelőnek interpretálunk egy baktériumot, előtte ezt az ún. módosított Hodge-tesztet még végezzük el (mára ezt már felváltotta egy még újabb módszer a konfirmálásban). A módszer kivitelezése viszonylag egyszerű: egy Müller-Hinton táptalajra standard 0,5 McF-es ATCC 25922 *Escherichia coli* szuszpenziót szélesztünk pázsítként. 3-10 perc múlva a táptalaj közepére helyezünk egy karbapenem korongot (ertapenem vagy meropenem), majd a tesztelendő izolátum 24 órás tenyészetének telepeiből csíkban leoltást végzünk a korongtól kifelé haladva a táptalaj széléig, majd 16-24 óráig inkubáljuk. Egyszerre több izolátum is tesztelhető egy táptalajon (13. ábra). Ha egy tesztelt izolátum termel karbapenemázt, akkor a környezetében növekvő (egyébként mindenre érzékeny) ATCC

25922 *E. coli* törzs növekedésre lesz képes és ezt a teszt izolátum mellé „benövő” *E. coli* növekedés jelzi. Ha a tesztelt baktérium nem termel karbapenemázt, akkor a mellette növekvő ATCC 25922 *E. coli* sem lesz képes extra növekedésre a karbapenem korong felé.

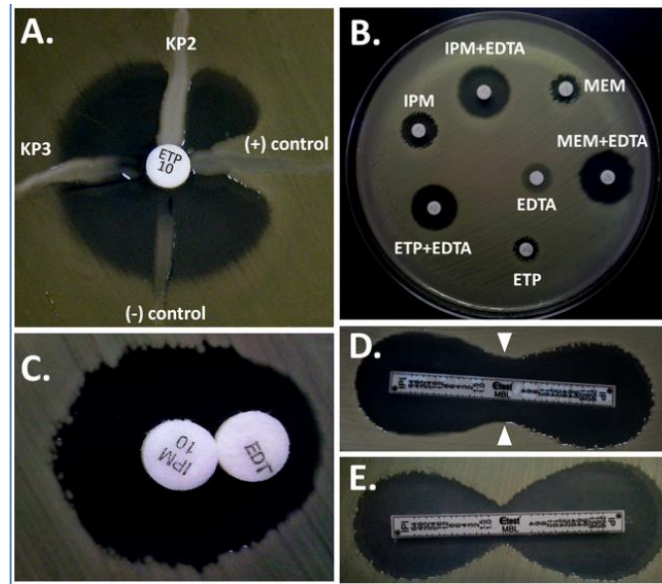


13. ábra

Módosított Hodge-teszt [69].

1. ATCC BAA-1705 *Klebsiella pneumoniae* referenciatörzs – karbapenemáz pozitív
2. ATCC BAA-1706 *Klebsiella pneumoniae* referenciatörzs – karbapenemáz negatív
3. klinikai izolátum – karbapenemáz pozitív

Emellett léteznek egyéb módszerek is a karbapenemáz termelés hagyományos laboratóriumi kimutatására. Mivel a karbapenemáz enzimek legtöbbje metallo-béta-laktamáz, ezért hatékony gátló szerük a metallo-béta-laktamáz enzimek működéséhez szükséges Zn^{2+} ionok kelátolása révén az EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav). Az EDTA és a karbapenem és a kiváltott közös, baktériumra gyakorolt hatás detektálása többféle módon is lehetséges: akár korongokkal, akár Etestekkel (14. ábra). Nagyon fontos megemlíteni, hogy ez a módszer természetesen nem alkalmazható a nem metallo-béta-laktamáz karbapenemázoknál, vagyis a módszer karbapenemáz szűrésre semmiképpen sem lehet alkalmas.



14. ábra

Metallo-béta-laktamáz NDM karbapenemáz hordozás vizsgálata különböző tenyésztési megoldásokkal *Klebsiella pneumoniae* izolátumon [70].

A) módosított Hodge-teszt; B) ertapenem, meropenem, EDTA és kombinációi korongdiffúzióval; C) imipenem és EDTA szinergizmus torzult zónával; D) kombinált Etest.

A karbapenem rezisztens enzimeket hordozó multirezisztens baktériumok ellen egy viszonylag új anyag is rendelkezésre áll: az amoxicillin/klavulánsav példájára létrehozták a meropenem/vaborbactam kombinációs szert, mely csak a KPC karbapenemázok ellen határos, mivel a vaborbactam csak a szerin-karbapenemázokat képes gátolni (Ambler Class A karbapenemázai), az Ambler B osztály metallo-béta-laktamázaira nincs hatással [71, 72]. Jelenleg a kísérleti stádium végső fázisaiban van, kialakult rezisztencia (még...) nem ismert.

4. Alternatív érzékenységvizsgálati módszerek

Mind a korongdiffúziós érzékenységvizsgálati módszer, mind az Etest technika jól kidolgozott, széleskörűen alkalmazott és mára már viszonylag egyszerűen kivitelezhető, de a jelenlévő sok változó és az eredményeket esetleg befolyásoló több paraméter (táptalaj, inokulum mennyiség, inkubációs hőmérséklet és idő) párhuzamos és folyamatos kontrollja szükséges a standard és minőségi eredményekhez. Ezeket a paramétereket egy jó mikrobiológiai labor jól tudja kontrollálni, ezek a feltételek teljesíthetők, így a módszerek jól alkalmazhatók. Ezeken kívül a leveshígítási módszerek és az azokból kifejlesztett, kereskedelmi forgalomban lévő érzékenységhatározásra alkalmas kitek szintén mind megfelelő eszközök ezen a területen. Viszont mindezen módszerek legnagyobb hátránya: azok időigénye; 16-24 órás inkubáció szükséges a mai referencia előírások szerint [15], ami ráadásul csak az első tenyésztési eredmények megszerzése és feldolgozása után kezdődik, ami szintén 16-24 óra. A betegellátás napjainkban folyamatosan növekvő terhelődése egyébként is

mindinkább afelé tereli a laboratóriumi metódusok trendjét, hogy minél gyorsabb és minél kevesebb munkaigényű vizsgálatokkal szükséges felváltani a tradicionális módszereket. A klinikai gyakorlatban alapvető fontosságú, hogy annál sikeresebb lehet egy terápiás folyamat, minél korábban sikerül azt a gyakorlatban elkezdni. Ez gyors és pontos információkat követel, amik alapján célzottan és a lehető leggyorsabban kell elkezdni a beteg kezelését.

5.1. Kromogén alternatív érzékenységvizsgálati módszerek

E laboratóriumi folyamatok gyorsítására több alternatív, gyors eredményt szolgáltató technika került már kidolgozásra az érzékenységvizsgálatokban. Az egyik legegyszerűbb ilyen módszer a nitrocefín gyorsteszt [73, 74]. A nitrocefín egy kromogén cefalosporin, melynek béta-laktám gyűrűjét béta-laktamáz enzimek hasítani képesek, az így hidrolizált nitrocefín pedig piros színreakciót ad (eredetileg sárgás), a reakcióidő 10-15 perc, gyengébb enzimtermelőknél hosszabb. Legelterjedtebben papírkorong vagy papírcsík formájában fordul elő a gyakorlatban és egyszerűen rá kell helyezni a vizsgálandó baktériumtelepre, vagy rá kell kenni egy kevés baktérium inokulumot a tesztre. Pozitív eredményként a teszt pirosas színreakciót ad.



15. ábra

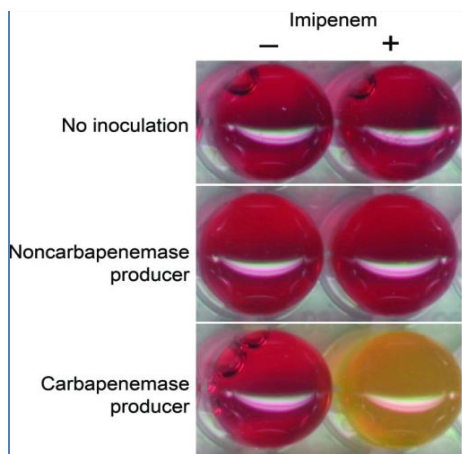
Nitrocefín pozitív BLPACR *Haemophilus parainfluenzae* törzs (3863/2018, G1/101.) (saját fotó).

A nitrocefín teszt jól használható módszer béta-laktamázok jelenlétének egyszerű kimutatására, de annál több információt, hogy valamilyen béta-laktamáz aktivitás van jelen az adott izolátumnál, nem szolgáltat, a legegyszerűbb penicillináztól a széles spektrumú béta-laktamázokig minden enzim hidrolizálni tudja. Korábban használtak más kromogén béta-laktamáz szubsztrátokat is [75], de a nitrocefín vált elterjedté. Hátránya, hogy a színváltozás értékelése néha szubjektív, hogy alacsony szintű enzimtermelésnél lassú és bizonytalan, és hogy a csak citoplazmatikus enzimek kimutatásához extraktum szükséges.

Továbbfejlesztett változatban kolorimetriás technika is létezik nitrocefínnel, ami révén akár kvantifikálható is egy izolátum béta-laktamáz termelése (laktamáz egység/térfogat mértékegységben) [76]. Ez inkább csak kutató laborokban használt, viszont ennek változatai a

komplikáltabban igazolható rezisztenciamechanizmusok kimutatásánál valóban hasznos, de komoly infrastruktúrát igénylő technológiák. Nitrocefint régebben alkalmaztak még akár extrahált fehérje gélek festésénél is, de ez szintén inkább csak kutatási terület [77].

Hasonló kromogén alapelvek mentén született meg a karbapenemázok detektálásához is alkalmas gyors diagnosztikai eszköz, a Carba-NP (Carbapenemase Nordmann-Poirel) teszt [78] és a gyakorlatilag ugyanúgy működő ESBL-NDP (Nordmann-Dortet-Poirel) teszt [79], melyekben enzim és antibiotikum reakciójából eredő pH változást detektálunk indikátorral (16. és 17. ábra).



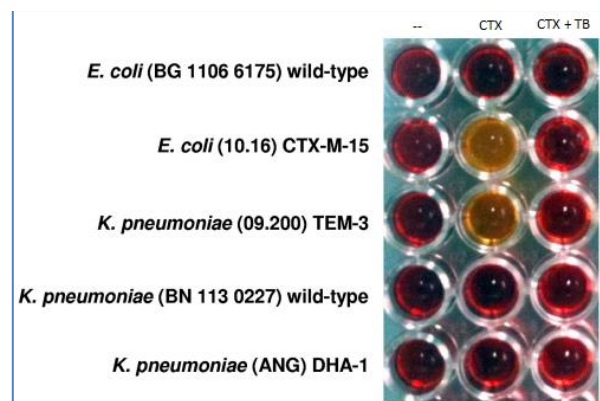
16. ábra

Carba-NP teszt [78]. Jobbra imipenemmel.

Felül: negatív kontroll.

Középen: CTX-M-15 ESBL-termelő *E. coli* – karbapenemáz negatív.

Alul: NDM-1 karbapenemáz termelő *K. pneumoniae* – karbapenemáz pozitív.



17. ábra

ESBL-NDP teszt [79]. Bal oszlop: növekedési kontroll, középső oszlop: cefotaxim, jobb oszlop: cefotaxim + tazobactam.

1. wt *E. coli* – ESBL negatív.
2. CTX-M-15 ESBL *E. coli* – ESBL pozitív.
3. TEM-3 ESBL *K. pneumoniae* – ESBL pozitív.
4. wt *K. pneumoniae* – ESBL negatív.
5. DHA-1 AmpC *K. pneumoniae* – ESBL negatív.

Az egyszerű korongdiffúzió alapján sokszor még nem adható ki egyértelmű eredmény (karbapenemázoknál egyértelműen nem), a módosított Hodge-teszt specificitása magas, de szenzitivitása elég alacsony, az inhibitorokkal folytatott kombinációs teszteknel és az ESBL double-disc módszernél az első tenyésztés utáni sok plusz inkubációs idő (+16-48 óra) róható fel hátrányként és némely karbapenemáz esetén nincs is ismert inhibitor (pl. OXA-48) [78]. A Carba-NP és az ESBL-NDP teszt során az extrakciós oldatban 30 percig inkubált, majd vortexelt, végül centrifugált izolátum felülúszójából vett mintát reagáltatjuk pufferelt oldatban karbapenemmel. Pozitív reakció esetén a béta-laktám gyűrű hidrolízise során keletkező karboxil gyök kialakulása, majd a dekarboxiláció miatt a pH csökken, amit fenolvörös indikátor sárga színváltozással jelez (max ~30 perc).

A Carpa-NP és ESBL-NDP tesztek specificitása és szenzitivitása is magas, az eredmény a tenyésztéses módszerekhez képest pedig nagyon gyors. E tesztek pozitív hemokultúrák centrifugált üledékéből elvégezve gyorsaságuk miatt rendkívüli jelentőségűek.

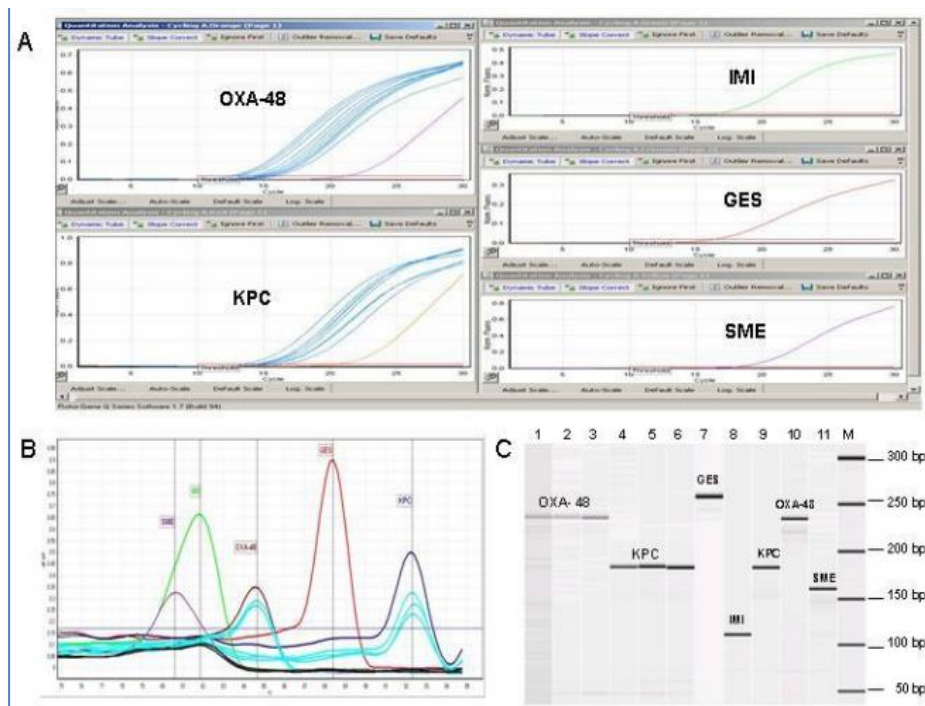
5.2. Nukleinsav alapú alternatív érzékenységvizsgálati módszerek

Az először 1971-ben napvilágot látott [80], majd 1983-tól kezdődően világszerte folyamatosan elterjedő [81, 82] és mára már alapvető metodikává váló PCR alapú vizsgálatok az érzékenységvizsgálatokban is jelen vannak. A tenyésztéses módszerekhez képest gyorsaknak számítanak, de nem tipikusan gyors diagnosztikai eszközök.

A megközelítés alapelve, hogy az izolátum DNS-extraktumából amplifikálunk különböző rezisztenciák kialakulásáért felelős géneket, azaz a genotípus vizsgálatának eszköze. Akár egy módosult porin fehérjealegység génjéről, akár egy béta-laktamáz génjéről, akár egy rezisztenciáért felelős fehérjét hordozó plazmid egy fontos transzkripció vagy replikációs szakaszáról van szó, a PCR vizsgálatok mindig is talán a lehető legmegbízhatóbb módszerek lesznek ezek kimutatásában. Nagyon fontos további lehetőség, hogy ezeket az amplifikált szakaszokat szekvenálni is lehetséges, ami például egy génben valószínűsített pontmutáció keresésekor vagy például egy újonnan felbukkant béta-laktamáz enzim osztályozása és jellemzése során ma már nélkülözhetetlen.

Alapvető „probléma” a PCR alapú vizsgálatoknál, hogy tudnunk kell, hogy milyen gént keresünk: a baktérium növekedésén látott fenotípust többféle genotípus is kódolhatja!

Nagy jelentőségűek a rutin diagnosztikában az ún. multiplex PCR vizsgálatok, amikor egyszerre (egy extraktumból, egy reakcióelegyben, egy időben) történik meg több reakció, azaz több génszakasz együttes vizsgálata. Ilyenkor egyetlen reakcióval kimutatható pl., hogy egy baktérium a sok rezisztenciamechanizmus közül melyiket vagy melyikeket hordozza genomjában. A panelekben végzett PCR reakciók nem csak az egymástól jelentősen különböző rezisztenciagének kimutatásakor lehetnek fontosak, hanem akkor is, ha egy enzimsoport egyes tagjait szeretnénk már a PCR reakció során egymástól elkülöníteni. Ilyen reakciókban tehát egyszerre sikerülhet kimutatni nem csak az akár ESBL, akár AmpC, akár karbapenemáz, vagy akár csak egy bármilyen egyszerűbb béta-laktamáz enzim génjét, de még az is lehetséges, hogy még az enzim konkrét típusát is megtudhatjuk a vizsgálat végére [83, 84].



18. ábra

Real-time PCR vizsgálatok különböző karbapenemáz enzimek kimutatására [84].

A) amplifikációs görbék különböző mérési csatornákon; B) melting curve analízisek;

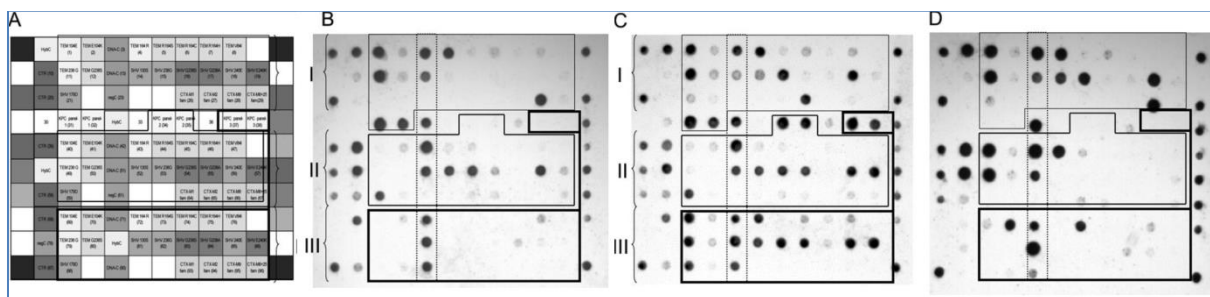
C) amplikonok kapilláris gélelektroforézise.

Sok esetben azonban a legbiztosabb DNS-alapú tipizálási módszer végül mégiscsak a szekvenálás. A szekvenálás végeredményeként a keresett gén minden nukleotidjáról információt kapunk, a vizsgált gének egymással és óriási adatbázisok korábbi eredményeivel nagyon precízen összehasonlíthatók, változások és mutációk fedezhetők fel a genotípusban.

Egy általános, rutin diagnosztikai PCR vizsgálat a mai real-time PCR-ek korában már rövidebb idő alatt kivitelezhető, mint a gélelektroforéziseknél, de még így is (extrakciós folyamattal együtt) általában 3-8 órára van szükség az eredmények megszületéséhez. A PCR vizsgálatok a gyors diagnosztikai technológiák közé tartoznak ugyan, de léteznek náluk sokkal gyorsabb módszerek is. Eredményeit tekintve viszont kevés módszer veheti fel a versenyt a PCR alapú technikákkal.

Hogy fenotípusosan is jelen vannak-e a keresett fehérjetermékek, vagy csak a genotípusban mutathatók ki, annak megválaszolása már más módszert igényel. Ilyen vizsgálatoknál már nem a csak igen/nem választ nyújtó PCR vizsgálatra van szükség, hanem egy gén kifejeződése mértékének mérésére. A kérdés jelentősége abban áll, hogy bizonyos gének expressziós szintje meghatározhatja egy rezisztenciamechanizmus jelenlétét. Lehetnek olyan gének, melyek nem is fejeződnek ki, és lehetnek olyan gének, melyek hatalmas mennyiségben overexpresszálódnak. Az ilyen irányú vizsgálatok már inkább kutatási területeken zajlanak, de így időt is engedhetnek például arra is, hogy a keresett, átíródó mRNS kvantitatív eredményeit összehasonlítsák akár végül a róla transzlálódó fehérje (pl. egy porin fehérjeegység) Western-blottal elvégzett szemikvantitatív kimutatásával is [85].

A nukleinsav alapú technológiák egyik nagyon hasznos, de költségeit tekintve közel sem a legolcsóbb módszerei közé tartoznak a microarray módszerek (DNS-chipként is ismertek). A vizsgálat során rendkívül sok és sokféle génszakasszal komplementer rövid próbákat immobilizálunk egy szilárd felületre (pl. üveglapra) apró, elkülönülő pontokként (spot), amire a vizsgálandó izolátum RNS extraktumából készült és fluoreszcens molekuláris festékekkel megjelölt cDNS összterméket visszük fel inkubálni. A vizsgálat eredményeként a cDNS össztermékben, azaz az mRNS-ként kifejezett gének pooljában ténylegesen szereplő target gének a chip komplementer spotjaihoz kötődnek, ha jelen vannak. A kötődés révén a fluoreszcens festékek emittálni kezdenek, ennek intenzitása arányos az eredeti mintában lévő target mRNS mennyiségével és a kötődés erősségével. Még bonyolultabb elrendezésben peroxidáz – streptavidin szubsztrát rendszert is ligáltatnak a target génekre, melyekkel viszont egyszerűbb a detektálás [86].



19. ábra

DNS microarray [86].

A) A chipen elhelyezett egyes enzimek immobilizált cDNS-komplementer próbáinak „tervrajza”.

B-C-D) I-II-III panelek: 9 baktérium izolátum különböző ESBL, KPC és egyéb enzimei cDNS-ének kimutatása.

A DNS-chip rendszerek is tulajdonképpen még a gyorsdiagnosztikai eszköztárhoz tartoznak, de az egyszerűbb PCR módszerekhez hasonlóan itt is a „még aznap” eredményszolgáltatás a maximum a gyorsaságot tekintve, viszont azt tudni kell, hogy itt az egész microarray vizsgálatot még megelőzi egy extrakciós és reverz transzkripció PCR lépés is. A chipkek által eredményezett nagyon nagy adatmennyiségek sokszor már komolyabb bioinformatikai eszközöket és személyzetet is igényelhetnek, amely adatfeldolgozás szintén időigényes lehet.

5.2. Pontos identifikáción alapuló alternatív érzékenységvizsgálati módszerek

A sok különböző megközelítésű érzékenységmeghatározási technika mellett fontos azt is látni, hogy nem csak a direkt erre irányuló vizsgálatok adhatnak fontos információkat, hanem az is, ha elvégezzük az adott izolátum pontos identifikálását. Sok baktérium fajáról és nemzetségéről ismertek ugyanis ún. intrinsic, azaz természetes rezisztenciák is. Ha tehát ismerjük az adott kórokozó fajtá/nemzetségét, néhány antibiotikum interpretálását már eleve tudhatjuk is. Vagyis ezzel a lépéssel néhány olyan antibiotikumot zárhatunk ki az esetlegesen majd használható köréből, amik az adott baktériumnál biztosan terápiás kudarcot

eredményeznének. Némelyik természetes rezisztencia már az antibiogramon is látható és tulajdonképpen segíti is az identifikálást (pl. *Enterococcus* spp. – clindamycin, *Staphylococcus saprophyticus* – novobiocin, *Proteus/Serratia/Burkholderia* – polymyxin B), de néhány antibiotikum teljes *in vivo* hatástalansága bizonyos baktériumok ellen az *in vitro* eredményekkel nem mindig egyezik meg, ezért ezekre különösen figyelni kell (3. táblázat).

	intrinsic rezisztencia	intrinsic csökkent érzékenység
aerob baktériumok	metronidazol	
anaerob baktériumok	aminoglikozidok, kinolonok, cefalosporinok (kiv.: cefoxitin)	
Gram-pozitív aerobok	polymyxinek, 1. gen. kinolonok, aztreonam	
Gram-negatív aerobok	penicillinek, makrolidok, linkozamidok, streptograminok, glikopeptidek, mupirocin	
<i>Streptococcus</i> spp.	aminoglikozidok	1. és 2. gen. fluorokinolonok
<i>Enterococcus</i> spp.	cefalosporinok, linkozamidok, aminoglikozidok, clindamycin, trimethoprim-sulfametoxazol	penicillinek, aminoglikozidok, fluorokinolonok, meropenem
<i>Mycoplasma</i> spp.	béta-laktámok, vancomycin	
<i>Chlamydia</i> spp.	béta-laktámok, aminoglikozidok	
<i>Haemophilus</i> spp.	penicillin, vancomycin, makrolidok (kiv. aztreonam)	cefalexin, cefuroxim
<i>Bacteroides</i> spp.	aminoglikozidok, penicillin, ampicillin	
<i>Neisseria</i> spp.	trimethoprim	
<i>Proteus</i> spp., <i>Providencia</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Flavobacterium</i> spp., <i>Burkholderia</i> spp.	polymyxinek	
<i>Proteus</i> spp., <i>Providencia</i> spp.	tetraciklinek, nitrofurantoin	
<i>Proteus</i> spp., <i>Morganella morganii</i> , <i>Serratia marcescens</i>	cefuroxim	
<i>Klebsiella</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Yersinia</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp.	aminopenicillinek	
<i>Haemophilus influenzae</i>	fuzidinsav	cefuroxim
<i>Moraxella catarrhalis</i>	trimethoprim	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	karbapenemek, amoxicillin/klavulánsav, piperacillin/tazobactam, cefazolin, cefotaxim, ceftazidim, ceftazidim, aminoglikozidok, fosfomicin	
<i>Listeria monocytogenes</i>	cefalosporinok	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	penicillinek, aminopenicillinek, aminopenicillinek/béta-laktamáz gátló kombinációs szerek, 1. és 2. gen. cefalosporinok, 3. gen. orális cefalosporinok, ertapenem, tetraciklinek, tigecyclin, chloramphenicol, trimethoprim, trimethoprim/sulfametoxazol, clindamycin, fuzidinsav, makrolidok, linezolid, rifampicin, quinupristin/dalfopristin	
<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Providencia</i> spp., <i>Serratia marcescens</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>	amoxicillin/klavulánsav	
<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>	ampicillin/sulbactam	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	aminopenicillinek, ampicillin/sulbactam, aztreonam, linezolid, rifampicin, ertapenem, trimethoprim, chloramphenicol, clindamycin, fuzidinsav, makrolidok, quinupristin/dalfopristin	
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	novobiocin	

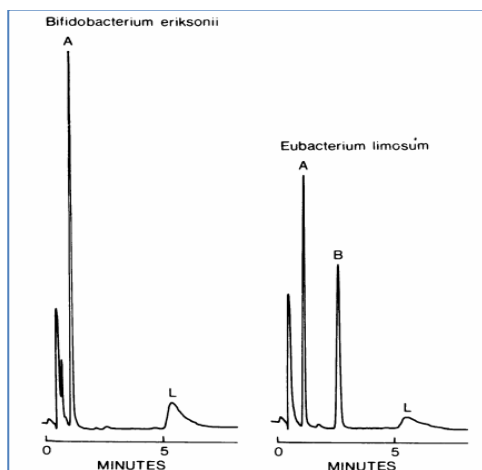
3. táblázat

Az ismertebb és jelentősebb természetes rezisztenciák különböző baktériumoknál [87, 88, 89, 90].

A különböző mintákból kitenyésztett mikrobák laboratóriumi meghatározása jól kidolgozott módszertani területe a klinikai mikrobiológiának: identifikációs folyamatokkal, különböző tesztekkel gyorsan és viszonylag nagy biztonsággal tudjuk meghatározni a leggyakrabban előforduló baktériumfajokat. Telepmorfológia, színek, szagok, hemolitikus

képességek, Gram-festődés, sejtalak, oxidáz reakció, kataláz reakció, ureáz aktivitás, különböző cukrok és más anyagok felhasználási képessége, növekedési paraméterek és még sok kisebb-nagyobb egyéb teszttel vizsgálhatjuk izolátumaink makroszkópos, mikroszkópos és fiziológias tulajdonságait. Végző soron ezeken keresztül általában eljutunk a valós megoldásig. Ha a fenotípusos módszerekkel mégsem jutunk előre, a genotípus elemzésével már biztosan célba érünk: PCR vizsgálatokkal, esetleg szekvenálással már szinte nem is lehet tévedni az identifikálásban.

Az identifikálások hagyományosan jó, de nem mindig száz százalékos és sokszor időigényes módszerei mellett egyre sürgetőbb manapság, hogy új megközelítésű technológiákkal egyszerre gyors és pontos eredményeket tudjunk szolgáltatani, kezelhetőségük pedig viszonylag egyszerű legyen. Ez a technológia mára már megszületett és valószínűleg az 1970-es '80-as években virágkorát élő gázkromatográfiás identifikáló módszerekből nőtte ki magát mai, egyre szélesebb körű alkalmazásáig. A gázkromatográfiás módszereknél a baktériumok (elsősorban anaerobok) által termelt zsírsavak és egyéb illóolajok voltak egymástól elkülöníthetők a kapott spektrumokon, mely zsírsavösszetételből azután az identifikáció volt elvégezhető [91, 92] (20. és 21. ábra).



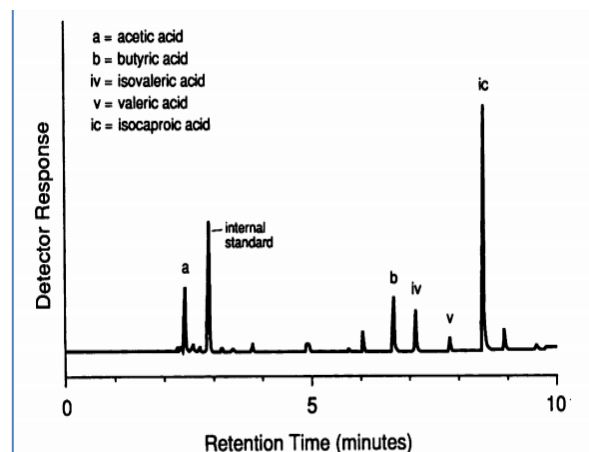
21. ábra

Anaerob baktériumok fermentációs termékei [91].

(A: ecetsav, B: vajsav, L: tejsav)

Bifidobacterium eriksonii ATCC 15423.

Eubacterium limosum ATCC 8486.



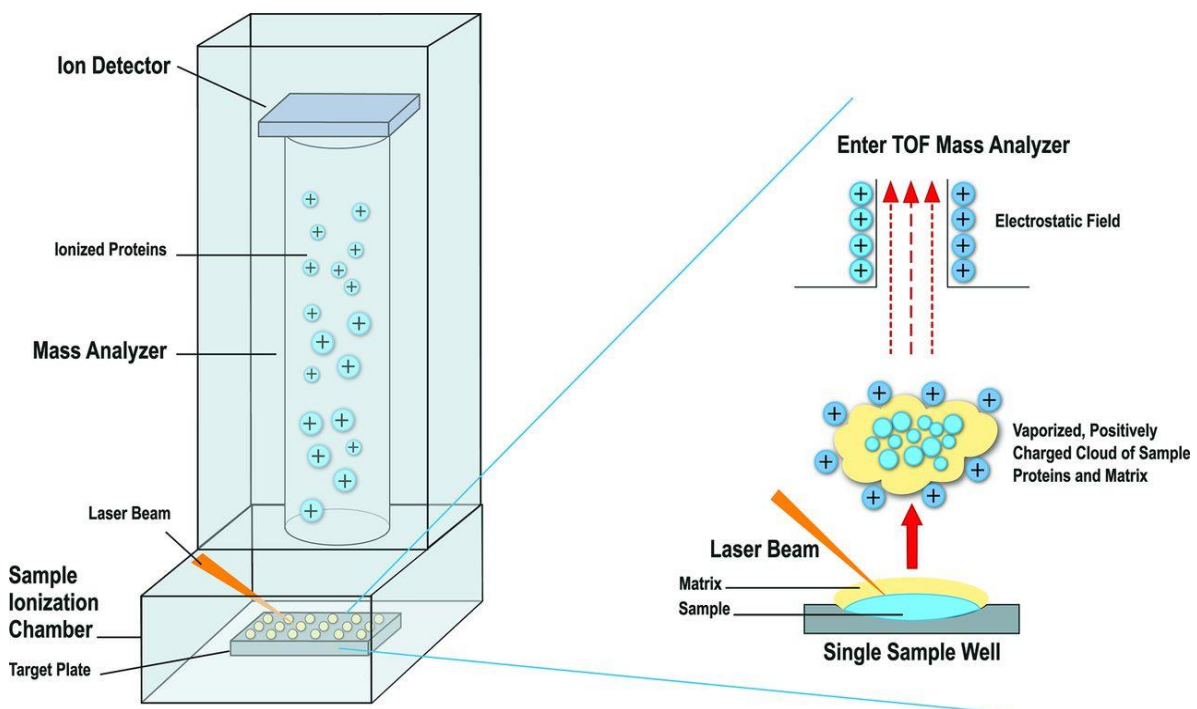
22. ábra

Clostridium difficile izolátum karakterizálása termelt zsírsavprofilja alapján [92].

Az identifikálás gázkromatográfiás megközelítése kiváló módszer volt, de hamarosan molekuláris biológiai és biokémiai gyorsesztek vették át helyüket a laboratóriumokban. A már említett, időközben ekkor már a szárnyait próbálgató másik módszer a MALDI-TOF tömegspektrometria volt, melyet először 1975-ben próbáltak alkalmazni mikrobák azonosítására [93], az 1980-as évekig azonban még sok kezdeti problémát kellett leküzdeni ahhoz, hogy ez a fehérjék és egyéb makromolekulák alapján az egyes baktériumokról profilok felvételére képes módszer elfogadottá váljon. Ekkor kezdték el építeni az első olyan adatbázisokat, melyekből aztán identifikálások készülhettek [94].

A metódot kidolgozása, kifejlesztése Franz Hillenkamp és Michael Karas nevéhez köthető, az első prototípust 1988-ban tesztelték ilyen irányú vizsgálatokra [95]. Velük párhuzamosan egy másik kutatócsoport (Koichi Tanaka és mtsai.) ért el áttörést a lézerionizációs technikán alapuló új műszerrel, ők 2002-ben Nobel-díjat is kaptak tevékenységükért [96].

A MALDI-TOF betűszó egy olyan speciális tömegspektrométert jelent, ahol egy ionforrásból származó lézerimpulzus gerjeszt egy vivőanyagot, amely a mintához kapcsolódik, és a gerjesztett vivőanyag (a kapcsolódó mintával együtt) egy tömegszám-analizátor detektora felé halad egy vákuumcsőben: matrix-assisted laser desorption ionization – time-of-flight.



23. ábra

A MALDI-TOF tömegspektrométer működése az ionizáció, deszorpció és az iongyorsítás fázisaiban [97].

A nagy ionizációs energiát közvetítő lézerimpulzusokkal, melyekkel a vivőanyagot, az ún. mátrixot gerjesztjük, tulajdonképpen szilárd fázisból robbantjuk ki a mátrix anyagot gáz fázisba (deszorpció) a kapcsolódó mintával együtt. A mátrix a mintával kapcsolódva repül egy iongyorsítóként szolgáló légüres, elektromos erőterben. Ebben az elektromos erőterben egy erős gyorsítófeszültség (19-20 000 V) készíteti az ionizált molekulákat mozgásra, a vákuumban történő repülési idő (time-of-flight) lehetőséget ad a mintában lévő anyagok tömeg/töltés szerinti szétválására, a vákuumcsőben repülve a kisebb méretű molekulák rövidebb, a nagyobb molekulák hosszabb idő alatt jutnak el az analizátoron keresztül a detektorba (23. ábra). Így történik meg a mintában lévő anyagok tömeg/töltés szerinti elválasztása és ezek detektálása. Vagyis azt a megfigyelést, miszerint a molekula mérete és a detektor eléréséhez szükséges repülési idő között arányosság áll fenn, felhasználhatjuk a felgyorsított ionok tömegének a meghatározásához. Az így kapott eredmény a tömegspektrum, melyben az egyes jelek (azaz csúcsok vagy peakek) a minta egy adott m/z

fajlagos tömegű molekulaionját jelzik, a peakek magassága pedig az adott molekula mennyiségével arányos.

Esetünkben ezek a töltéssel rendelkező molekulák, melyek a mátrix-szal kapcsolódva repülnek a detektor felé molekulatömegüknek és töltésüknek megfelelően, a baktériumok sejtjeiben legnagyobb mennyiségben megtalálható anyagok: a fehérjék (főleg). Mivel minden baktériumfaj fehérjeprofíljára minőségi és mennyiségi eltéréseket mutat a többihez képest, így ezek a különböző fehérjékből álló jelsorozatok, melyeket egy baktérium MALDI-TOF-ban való felhasználásakor kapunk, jellegzetes profilokká állnak össze. Ezek a fehérjeprofílok tehát egy-egy fajra jellemzőek, azaz alkalmasak arra, hogy ezekből adatbázisokat építve, a MALDI-TOF tömegspektrométerrel újra és újra meg tudjuk határozni az adott baktériumfajt tipikus fehérjeprofíljából kapott egyedi tömegspektruma alapján. Természetesen még az egyes baktérium izolátumok között is vannak kisebb-nagyobb eltérések a fehérjeprofíljukat tekintve még ha egy fajhoz is tartoznak, de az identifikáció olyan általános mintázatok felismerésén alapul, melyet nagyon sok, egy fajba tartozó izolátum méréséből alakítanak ki. A legtöbb esetben nincs szükség arra, hogy az identifikáció során készült tömegspektrum egyes jeleit, azaz peakjeit adó fehérjéről és egyéb molekulákról tudjuk, hogy melyik milyen fehérjét, milyen peptidet takarnak, a lényeg ezeknek a peaksorozatoknak a fajra jellemző mintázata. Ez a mintázat az, amit a MALDI-TOF MS analizátor szoftvere az identifikációnál felhasznál, adatbázisából az ehhez legjobban hasonlító, legtöbb egyezést mutató mintázathoz kódolt fajnevet adja az éppen analizált izolátumunk fajmeghatározásaként.

A mikrobák MALDI-TOF tömegspektrometriás identifikálási folyamata tulajdonképpen már egyszerű feladat: az adott izolátum friss (max. 18-24 órás) tenyészetéből egy steril fogpiszkáló segítségével kevés mintát veszünk fel és azt egy a MALDI-TOF MS készülékbe helyezhető acéllapka, az ún. plate felszínére kenjük. Egy ilyen plate-re (készüléktől függően) 96 minta vihető fel, az egyes minták felviteli helyét kis gravírozott körök, az ún. spotok jelzik.

Legegyszerűbb esetben a minták felvitele után az egész plate-et szobahőmérsékleten állni hagyjuk, hogy az analitok (itt a baktériumsejtek kikent mintái) beszáradjanak. Ezután pipettával 2-2 µl mátrix vivőanyagot viszünk a beszáradt minták apró foltjaira, majd ezt is hagyjuk beszáradni. A mátrix beszáradása, kikristályosodása során történik meg annak fehérjékkel és az analit bármilyen más anyagaival történő kapcsolódása.

Az egész procedúra a baktériumsejtek felvételétől, a különböző oldatok pipettázásán és beszárításán át, egészen a mérésig összesen nem több mint egy kb fél órás munkaidőt igénylő folyamat. Ha több mintával dolgozunk egyszerre (egy plate-en 96 minta dolgozható fel), az nyilván arányosan még több időt takarít meg a sorozatos mintafeldolgozás révén.

A folyamat csak laboratóriumban végezhető el, némely felhasznált anyag veszélyes is, kellő óvintézkedések, precíz odafigyelés és védőfelszerelés használata erősen ajánlott!



24. ábra

Baktérium izolátum identifikálása MALDI-TOF tömegspektrométerrel. Előkészítő lépések és a mátrix kristályosodási folyamata [98, 99, 100].

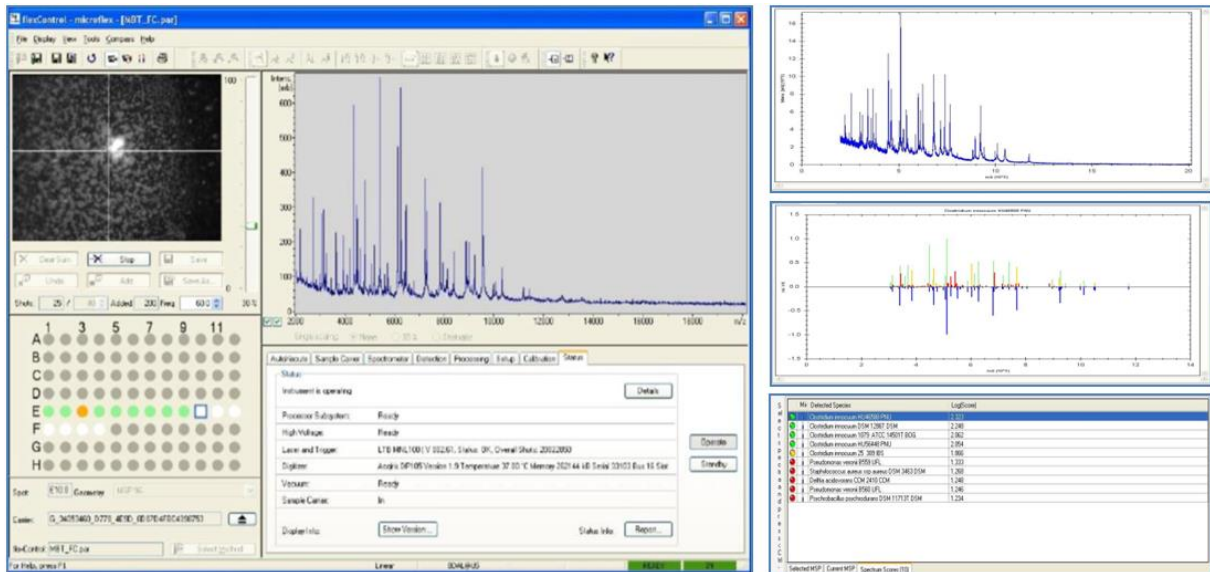
A mátrix vivőanyag leggyakrabban alfa-ciano-4-hidroxi-fahéjsav (α -CHCA) vagy dihidroxi-benzoészav (DHB), funkciója a lézer által biztosított, az ionizációhoz szükséges energia elnyelése és átadása az analit molekuláinak. A mátrix-szal együtt kristályosodott analit ennek hatására a mintából felszabadul (deszorpció), és molekulaionok formájában gáz fázisba kerül. A különböző mátrixok közül az α -CHCA a leginkább elterjedt és széleskörűen alkalmazott (alacsony molekulaméret tartományhoz ez ajánlott), de más mátrixok is léteznek. Funkcionális tulajdonságaikat és molekulatömegüket tekintve eltérő, strukturálisan alapvetően hasonló felépítésű molekulák (4. táblázat).

α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav	2,5-dihidroxi-benzoészav	szinapinsav	aminoacridine
CHCA	DHB	SA	9-AA
MW 189,17	MW 154,12	MW 224,21	MW 194,23
<5000 Da peptidok	kis molekulatömegű molekulák	>5000 Da fehérjék	kis molekulatömegű lipidek és metabolitok
+	+	+	-
1,5-diaminonaftalén	trihidroxi-acetofenon	3-hidroxi-pikolinsav	1,8,9-antracéntriol
1,5-DAN	THAP	3-HPA	DTN
MW 158,20	MW 168,15	MW 139,11	MW 226,23
lipidek	oligonukleotidok és foszforillált peptidok	oligonukleotidok	lipidek
+ / -	+ (Li^+)	+	+ / -

4. táblázat

Gyakoribb mátrixok. Név, rövidítés, molekulatömeg, alkalmazási terület, preferált ionizációs mód [101, 102].

A mai klinikai mikrobiológiában a MALDI-TOF MS alapú identifikálás egyre inkább elfogadott és egyre szélesebb körben is alkalmazott módszerré kezd válni még hazánkban is. Precizitása, gyorsasága messze meghaladja a hagyományos módszerek határait. A tömegspektrométer magas ára sajnos nem teszi lehetővé, hogy minden laboratóriumban jelen legyen egy-egy ilyen eszköz, de a kisebb laborok használhatják „beküldőként” a készüléket, azaz a plate-en elvégzik az egyszerű, előkészítő folyamatokat, majd beszállítják egy olyan központi intézménybe, ahol van MALDI-TOF MS, az eredményeket pedig már néhány órán belül emailen vissza is kapják. A tömegspektrométer készülék az anyagkötségei és a fenntartása tekintetében tulajdonképpen olcsó, anyagigénye alacsony, kezelése egyszerű.



25. ábra

MALDI-BioTyper® szoftveres munkafelület vizsgálat közben (saját képek).

Bal oldal: fent a lézeres ionizáció látható működés közben a beépített kis kamerán át, mellette az éppen készülő spektrum, alul a vizsgált plate rajza a rajta lévő analitokkal, mellette az aktuális paraméterbeállítások felülete.

Jobb oldal (fentről lefelé): egy elkészült MALDI-TOF MS spektrum; egy kapott spektrum összehasonlítása az adatbázis adataival; az analízis végeredménye: az identifikáció tíz legmagasabb score értékű eredménye.

Az identifikáláshoz egy szoftveres értékelő rendszer áll rendelkezésre, a MALDI-BioTyper® [103, 104], ami objektív módon interpretálja a species- és genus szintű identifikációs eredményeket. Az értékelés naprakész és folyamatosan frissített adatbázisok alapján történik, melyek rendkívül fontos tulajdonsága, hogy a felhasználó által is fejleszthetők, azaz például egy teljesen új baktérium esetén „megtanítható” a rendszernek kellő számú spektrum felvételével. Az új faj (melyet például szekvenálással azonosítottunk) beilleszthető az adatbázisba. Ennek nagyon nagy jelentősége van, mert a hagyományos identifikáló módszerek sokszor csak a legnagyobb valószínűség elve alapján működnek, szekvenálásra pedig csak ritkán van mód a rutin munkában előforduló izolátumok esetén. Látványos az a jelenség, hogy a MALDI-TOF MS korszak bevezetése után sok klinikus egyre többet konzultál a mikrobiológusokkal arról, hogy tulajdonképpen mi is az az addig még sosem hallott baktérium, amit a leleten megkapott, mert addig például csak „ α -hemolizáló *Streptococcus*”, „*E. coli*”, vagy „*Enterobacter* sp.” néven kerültek kiadásra azok a baktériumok, melyek a hagyományos módszerekkel csak eddig a szintig voltak

meghatározhatóak. Ez az ugrás abból a szempontból is nagyon jelentős, hogy a precízebb identifikációs eredmények révén új kapcsolatok fedezhetők fel bizonyos „új” baktériumok és bizonyos kórképek között, ha egy ilyen új összefüggéssel egy arra nyitott klinikus szembesül (ez utóbbi viszont még sajnos csak ritkán teljesül). Ezek a baktériumok természetesen nem újak, eddig is ugyanazokban a kórfolyamatokban vettek részt, de eddig nem volt lehetőség arra, hogy felismerjük őket a hagyományos módszerek alapján ilyen mélységben. Például egy *Achromobacter xylosoxidans* vagy egy *Staphylococcus lugdunensis* egyáltalán nem biztos, hogy minden mikrobiológiai laborban könnyen azonosítható MALDI-TOF MS vagy szekvenálás nélkül a hagyományos, rutin biokémiai és mikrobiológiai eszközökkel.

Az értékelés során a kapott spektrumot az adatbázisban szereplő spektrumokkal hasonlítja össze a szoftver, mely alapján egy ún. score értéket ad az adott izolátum azonosítására. Ez azt jelenti, hogy egy magas score értékű azonosítás erős egyezést mutat az adatbázis adataival, azaz az identifikáció biztos, alacsony score érték esetén ennek kisebb a valószínűsége és csak a nemzetség szintű identifikálás a biztos. A score értékek alapján a MALDI-BioTyper® program 4 kategóriát különböztet meg, melyeket színekkel is jelez:

score	értékelés	interpretáció
≥2,0	biztos fajszintű identifikálás	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
1,9-1,7	biztos genuszintű identifikálás	<i>Staphylococcus</i> sp. (coag poz.)
<1,7-0,1	„not reliable identification”, a genus is bizonytalan	-
0	„no peaks found”, nincs értékelhető peak a spektrumban	-

5. táblázat

MALDI-BioTyper® identifikálási eredmények, score érték kategóriák.

A mérések (vagyis a spektrumok) minőségét jelző score értéket jelentősen befolyásolja, hogy hogyan történt a minta előkészítése. „Not reliable” eredmény lehetséges abból az esetből is, ha éppen egy addig az adatbázisban még nem szereplő baktériummal van dolgunk (és ez már egyre kisebb valószínűségű a mai adatbázisoknál), sokkal valószínűbb, hogy a minta előkészítésénél történt valamilyen probléma.

A legegyszerűbb esetben, a már ismertetett előkészítő lépések után közvetlenül meg is történhet maga a mérés is, ez a módszer Gram-negatív bélbaktériumoknál még elfogadható lehet, de komolyabb sejtfallal rendelkező Gram-pozitívoknál vagy gombáknál már biztos gyenge eredményt ad. Egy szinttel komolyabb előkészítésnek számít (és a legtöbb esetben már ez számít az alapvetően elterjedt és bevált rutin identifikációs vizsgálatoknak) az egyszerű hangyasavas feltárás közbeiktatása a mintafelvitel és a mátrix rászárítása közé: ilyenkor 2-2 µl 70%-os hangyasavat pipettázunk a minták spotjaira, ezt is hagyjuk beszáradni, majd következik a már ismertetett mátrix és a mérés. Jóval drasztikusabb feltárást eredményez (pl. gombáknál) a teljes extrakciós módszer, ahol az izolátumot először 96%-os EtOH-ban, majd 70%-os hangyasav és tömény acetonnitrilben extraháljuk, a centrifugált felülúszóból felviszünk 2-2 µl tisztított extraktumot a plate spotjaira, majd ennek beszáradása után jöhet a mátrix és a mérés. Az egyes módszerek eredményének minősége és a ráfordított idő egymással természetesen itt is egyenesen arányos. Viszont a legkifinomultabb eredményeket adó legbonyolultabb extrakciós módszer munkaideje sem haladja meg az egy órát.

A klinikai mikrobiológia egyik nagyon fontos laboratóriumi területe az intenzív osztályon ápoltságok mintáinak vizsgálata. Az eredmények gyorsasága és precizitása ezekben a helyzetekben tényleg létfontosságú. Pozitívként jelzett hemokultúra mintáknál például jelentősen meggyorsítható a szepszist okozó baktérium azonosítása, ha a pozitív hemokultúrából azonnal mintát veszünk, a vér sejtselemlereit lizáljuk, centrifugáljuk és a pelletként az Eppendorf-cső alján lévő baktériumokat a MALDI-TOF plate-re visszük fel a már ismertetett módon [105]. Ez a módszer természetesen csak olyan mintáknál valószínűsíthető meg, ahol egyetlen baktériumfaj van jelen nagy számban a mintában (pl. hemokultúra, vizelet) [106, 107], mert több baktérium együttes jelenlétét egy spektrumban a MALDI-TOF MS sem tudja egyelőre feloldani – bár már vannak ilyen törekvések, amelyek ezt a problémát igyekeznek leküzdni bioinformatikai eszközökkel [108]. Emiatt természetesen még minden esetben szükséges elindítani például egy pozitív hemokultúránál a hagyományos tenyésztéseken alapuló folyamatokat is, mely 16-24 óra múlva ad eredményeket, és természetesen azért is, mert az érzékenységvizsgálatok is csak az így kitenyésztett mikroorganizmusból történhetnek a hagyományos módszertani ajánlások alapján.

A mikroorganizmák azonosításában tehát hatalmas segítség tud lenni a MALDI-TOF tömegspektrometria, a pontos azonosítás révén pedig az intrinsé rezisztencia viszonyok egy része már ebből a nagyon precíz azonosításból is tisztázható. De milyen plusz információt adhat még a MALDI-TOF MS módszer az érzékenységvizsgálatokban?

5. Érzékenységvizsgálatok MALDI-TOF MS módszerrel

A MALDI-TOF MS azonosítási spektrumok azokat a csúcsokat tartalmazzák, amelyeket az adott izolátumban nagy mennyiségben megtalálható fehérjék és egyéb molekulák adnak ki. A különböző rezisztenciákért felelős faktorok, mint például egyes enzimek, vagy módosult citoplazmatikus fehérjeegységek ritkán fordulnak elő olyan mennyiségben, hogy azok ún. marker csúcsként a spektrumokban felfedezhetőek lennének. A jelenség ritka, de nem lehetetlen.

Az *Enterococcus*-ok világszerte nagyon elterjedtek, a humán és állati bélflórában is bőségesen előforduló Gram-pozitív baktériumok, a normál flóra fontos részei. Ennek ellenére kórokozóként is viselkedhetnek opportunistaként, ilyenkor természetesen kórokozóként is kell kezelni őket, ellenük terápia indítható. Szepsziszben és egyéb súlyos fertőzések esetén az egyik ilyen elsődlegesen használt szer *Enterococcus*-ok ellen a vancomycin. A vancomycin a glikopeptid antibiotikumok közé tartozik, hatásmechanizmusa többérettű: a sejt permeabilitását tudja megnövelni drasztikusan, illetve nukleinsavszintézis-gátló tulajdonságai is ismertek. Glikopeptid rezisztens törzsek először az USA-ban jelentek meg az 1980-as években, ahol azután azok nagyon gyakorivá is váltak (20-30%), nálunk még csak sporadikusan fordult elő több esetben [88]. A glikopeptid rezisztenciának 3 fő formája ismert, melyekért a *vanA*, *-B* és

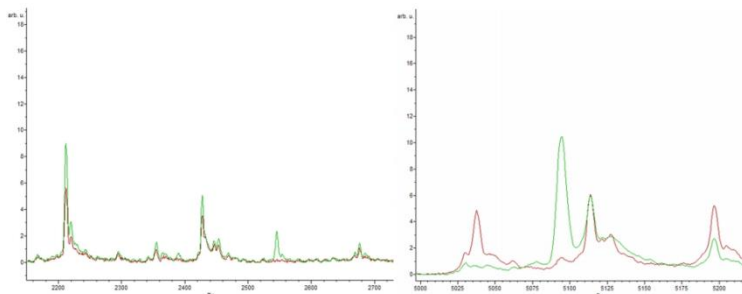
-C génekről átíródó eltérő szerkezetű membránfehérjei felelősek, a változás révén nem jó targetei többé a glikopeptideknek.

	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>vanC</i>
vancomycin	R	M/R	É/M
teicoplanin	R	É/M	É
gén	mobil elemeken, indukálható	kromoszómális, indukálható	kromoszómális, konstitutív
rezisztencia	szerezett	szerezett	intrinsic
leggyakoribb előfordulás	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. raffinosus</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>

6. táblázat

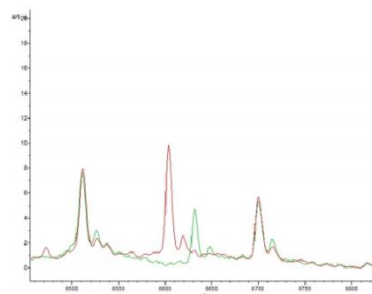
A leggyakoribb *Enterococcus* glikopeptid rezisztenciák [88].

A szerzett glikopeptid rezisztenciát hordozó törzsek nagyon komoly veszélyt jelentenek, mert elterjedésük esetén nagyon sok súlyos, *Enterococcus*-okozta kórkép válhat sokkal nehezebben kezelhetővé, ezért minél gyorsabb kimutatásuk nagyon fontos laboratóriumi feladat. MALDI-TOF tömegspektrometria segítségével sikerült már olyan peakeket azonosítani vancomycin rezisztens *Enterococcus* (VRE) izolátumokban, melyek megbízható és egyedi markereknek tűnnek ennek a típusú rezisztenciának a hordozásában [109]. A vizsgálatban etanolos módszerrel extrahált sejtek spektrumain sikerült megtalálni ezeket az egyértelműen látható marker peakeket (a negatív kontrollok spektrumaihoz képest), ez pedig azt jelenti, hogy kijelenthető, hogy MALDI-TOF MS segítségével sikerült egy rezisztenciamechanizmust detektálni (26. ábra). Egy további kísérletben sikerült differenciáló marker peaket találni a *vanA* és a *vanB* típusú *E. faecium* törzsek között is (27. ábra).



26. ábra

VRE (zöld) (*vanB* *E. faecium*) és nem-VRE (piros) (ATCC 19434 *E. faecium*) MALDI-TOF MS spektrumainak összehasonlítása különböző mérési tartományokban [109].
 - VRE specifikus marker peakek: ~2545, 5095 m/z
 - Nem-VRE specifikus marker peakek: ~5035 m/z



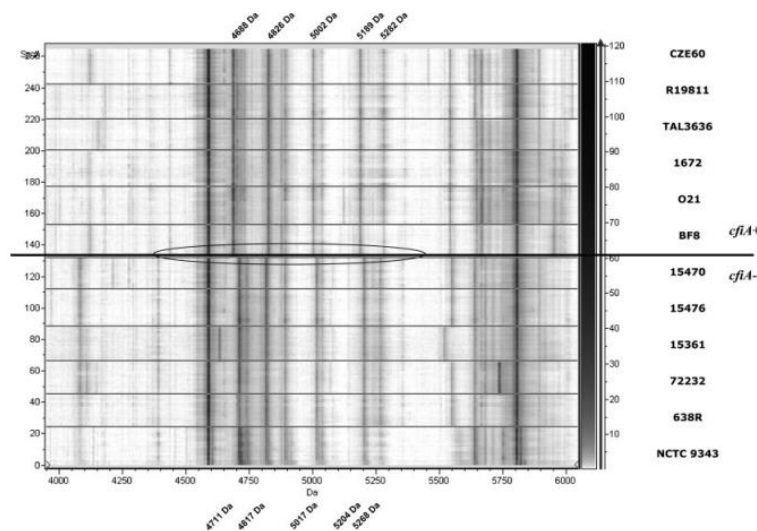
27. ábra

VanA és VanB típusú *E. faecium* törzsek összehasonlítása [109].
 - *vanA* (zöld) specifikus: ~6635 m/z
 - *vanB* (piros) specifikus: 6603 m/z

Szinte a MALDI-TOF alapú vizsgálatok létezésével egyidős az az igény, hogy MALDI-TOF tömegspektrométert használva MRSA és MSSA törzsek között az előbbieket analógiájára valamilyen egyértelmű és elkülönítő marker peakeket sikerüljön találni. Sajnos ennek megoldása még mind a mai napig csak tervek és elméletek formájában létezik, legtöbbször statisztikai alapon próbálják meg megtalálni az egyedi peakeket, mert az MRSA és MSSA törzsek sokfélesége miatt egyelőre nincsenek egyértelmű eredmények. Valószínűsítik néhány viszonylag gyakrabban felbukkanó egyedi peak nagyobb jelentőségét, de ezek is csak

a törzsek egy részére tűnnek igaznak, az izolátumok többi részére nem. Bizonyos szakirodalmi források szerint [110] legvalószínűbbnek a 3784 m/z és az 5700 m/z peakek tűnnek e kutatások alapján, ezek közül az 5700 m/z peak valóban elkülönítőnek tűnik a vizsgált MRSA törzseknél, de azoknak is csak egy részénél, a 3784 m/z peak viszont az MSSA-k hasonló peakjeihez képest általában inkább csak nagyobb intenzitású, és szintén csak a törzsek egy bizonyos hányadában mutatható ki. E szerzők szerint a két csoport közti különbség szignifikáns e két marker peak jelenlétét, illetve intenzitását illetően. Más szakirodalmi források viszont vitatják mindezt és teljesen más megközelítést javasolnak. Valószínűleg először az adott törzsek alaposabb megismerése (spa szekvencia és MLST tipizálás) és precíz csoportosítása után lehet csak elkezdni feloldani ezt a több évtizedes problémát, mert valószínűleg nem csak egyetlen egy és általános megoldás létezik.

A *Bacteroides fragilis* izolátumok *cfiA* gént hordozó és nem hordozó törzseinek differenciálása MALDI-TOF spektrometria segítségével viszont jól működő és széleskörűen elfogadott módszer. A *cfiA* gén egy karbapenemáz enzimet kódol *B. fragilis*-ben, mely karbapenemekkel szemben rezisztenssé teheti az enzimet termelni képes baktériumot. A *B. fragilis* törzsek két nagy csoportra, ún. divízióra oszthatók. Az I. divízióba tartozó törzsek nem hordozzák a *cfiA* gént, a II. divízióba tartozók igen. Egyszerű MALDI-TOF MS spektrum felvételével a két divízió 5 jól elkülönülő marker peak alapján differenciálható egymástól 4700 és 5300 m/z tartományon belül (29. ábra), elkülönítésük révén pedig megtudjuk, hogy izolátumunk hordozza-e a *cfiA* karbapenemáz gént, vagy sem [111].



28. ábra

B. fragilis törzsek I. és II. divíziójának elkülönítése MALDI-TOF MS módszerrel, gel/stack view [111].

I. divízió (*cfiA*-) marker peakek [m/z]: 4711, 4817, 5017, 5204, 5268.

II. divízió (*cfiA*+) marker peakek [m/z]: 4688, 4826, 5002, 5189, 5282.

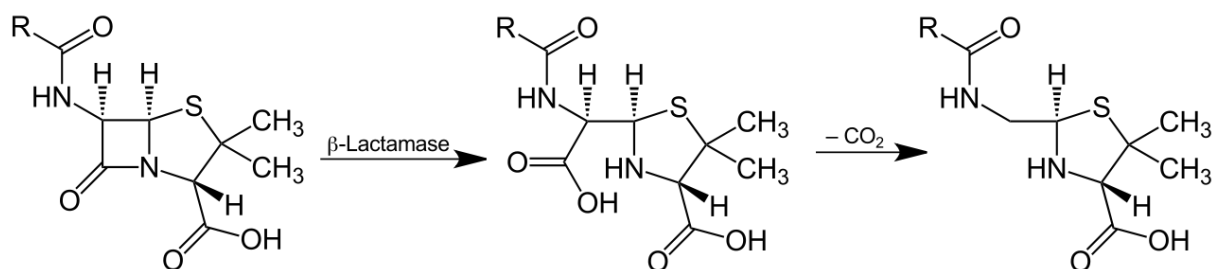
Egy némileg az eddig ismertektől eltérő szemléletű módszer az ún. breakpoint módszer. Az ilyen típusú vizsgálatokban a mikrobákat (a módszert leíró publikációban *Candida albicans*-t) egy antimikrobiális szer hígítási sorában tenyésztik megfelelő körülmények között folyadékkultúrákban [112]. A 16-24 órás inkubáció után mintát vesznek

az egyes kultúrákból és MALDI-TOF mérést végeznek belőle. Azokban a hígításokban, melyekben az adott antifungális szer a *Candida* MIC értéke alatt volt, még „hagyományos”, a fajra jellemző septrumokat kaptak. Azokban a hígításokban viszont, amelyekben már a MIC értéken illetve e fölött volt a hatóanyag koncentrációja, minden esetben eltérő peak-mintázatú eredmények születtek. Ez az eltérés nem folyamatos degradációként jelent meg a hatóanyag koncentrációjának emelkedésével, hanem az egy bizonyos koncentrációtól kezdve, hirtelen minden e fölötti koncentrációban az eredetihez képest eltérően jelent meg. Ez a koncentráció pedig látványosan jó egyezést mutatott az adott törzs valódi MIC értékével. Ebben a módszerben ki kell emelni annak a rendkívüli fejleménynek a súlyát, hogy itt már nem csak annyit dönthetünk el egy mikrobáról spektrometriás módszerrel, hogy érzékeny vagy rezisztens egy bizonyos szerre, hanem pontos és a valós MIC értékkel nagyon jól korreláló eredményt is látunk. Ennek a módszernek a továbbfejlesztése, hogy már csak 2 antibiotikum koncentrációt vizsgálunk meg ezzel a módszerrel: egy MIC érték alatti és egy MIC érték fölötti koncentrációt és e kettőből végezzük el a MALDI-TOF vizsgálatot.

Hasonló elmélet mentén valósítható meg a következő módszer is: egy baktériumot a vizsgálandó antibiotikum hígítási sorában tenyésztünk, de itt a tápoldatokba stabil izotópokkal jelölt aminosavakat is adunk [113]. Ezek mellett mindig szükség van egy olyan negatív kontrollként szolgáló tenyésztetetre is, amely csak a baktériumot tartalmazza és antibiotikumtól és izotóppal jelölt aminosavaktól mentes. A megfelelő inkubációs idő után a baktériumsejteket a kultúrákból kinyerjük és MALDI-TOF MS spektrumokat készítünk sejtes mintáinkból. Ha még rezisztens szinten lévő (vagyis MIC alatti) antibiotikum koncentrációból származó mintákat vizsgálunk, akkor jellegzetes peak-eltolódásokat látunk a negatív kontroll peak-mintázatához képest az izotópos mintákban, mert a még élő és fiziológiásan ép baktérium életfolyamatai során a stabil izotópokat fehérjéibe beépítette, azaz a peakjeit adó fehérjéinek tömege a stabil izotópok révén körülbelül egyforma mértékben megnőtt. Ha azokból az antibiotikum koncentrációkat tartalmazó kultúrákból veszünk mintákat, melyekre a baktérium már érzékeny volt (vagyis MIC fölötti), akkor nincsen általános peak-eltolódás a spektrumokban a negatív kontroll mintázatához képest, mivel a baktérium nem volt képes életfolyamatokat produkálni a rá már káros antibiotikumkoncentráció mellett, a már nem élő baktériumok peak-mintázata pedig ugyanaz maradt. Ebből a vizsgálatból is megtudható a baktérium MIC értéke, amely alapján pedig már eldönthető az általános ajánlások alapján, hogy hatékony vagy nem hatékony ellene az adott antibiotikum.

Az eddig ismertetett szakirodalmi publikációk olyan megközelítéseket vizsgáltak, ahol szinte minden esetben az adott mikroba változásait, e változásokból eredő spektrometriai változásokat tekintették elsődlegesen fontosnak. Ha abból indulunk ki, hogy a mikrobák nem csak úgy képesek védekezni, hogy bennük különböző változások születtek és ezzel elkerülik az antibiotikumok hatását, hanem úgy is, hogy képesek aktívan is védekezni, vagyis az őket támadó antibiotikumot tudják módosítani, hatástalanítani, akkor egy egészen új nézőpontból tudjuk ezt a problémát megvizsgálni és sok esetben sokkal egyszerűbben és rövidebb idő alatt

tulajdonképpen meg is oldani. Az olyan rezisztenciamechanizmusok, amelyek az aktív, bakteriális védekezés révén valósulnak meg, nagyon elterjedtek és emiatt nagyon izgalmas területe ez a mai MALDI-TOF MS alapú érzékenységmeghatározási kísérleteknek. Egyszerűbb béta-laktámok, cefalosporinázok, ESBL- és AmpC-enzimek, karbapenemázok, fluorokinolon acetiltranszferázok tartoznak bele elsődlegesen abba a nagyon széles spektrumba, melynek vizsgálatai nagyon sok hasznos és gyors eredményt tudnak produkálni.



29. ábra

Béta-laktám típusú antibiotikum béta-laktám gyűrűjének enzimatis hidrolízise és az instabil intermedier spontán dekarboxilációja [114].

Ezeknél a teszteknel tehát az antibiotikum ellen ható mikrobiális enzimaktivitást detektáljuk közvetett módon, azaz az antibiotikum módosított, elhasított, hatástalanított formáit keressük (lásd 30. ábra a következő oldalon). Ezek az apró molekuláris változások igen finom és nagy felbontású spektrometriai méréseket igényelnek, de a technikai akadályokon túljutva olyan spektrumokat kaphatunk, melyek egyértelműen mutatják a vizsgált baktérium enzimatis tevékenységének nyomait, sőt a keletkező termékekből azt is kikövetkeztethetjük, hogy milyen enzimek milyen módosításokat végeztek el az antibiotikumon, annak különböző ionos formáin, és milyen különböző intermediereik keletkeztek még ezekben a biokémiai reakciókban.

A vizsgálati módszer gyakorlati kivitelezése úgy történik, hogy az adott baktériumot rövid ideig a tesztelendő antibiotikum oldatában inkubáljuk, majd nem a baktériumsejteket, hanem a baktérium sejtjeitől mentes, lecentrifugált felülúszót vizsgáljuk MALDI-TOF tömegspektrométerrel, amiben csak az antibiotikum és esetleg egyes bomlástermékei vannak jelen. Az ismert molekulatömegű antibiotikum spektrális mintázatához képest a módosított, elhasított antibiotikum spektruma kisebb-nagyobb változásokat mutat. Ha ezek az enzimatis aktivitás következtében kialakuló módosított antibiotikum marker peakok a kísérlet után felfedezhetőek, akkor a vizsgált baktériumot rezisztensként kezelhetjük adott antibiotikummal szemben. A módszer 2011-ben került leírásra [115], az azóta eltelt néhány évben sok fontos adalék, kiegészítés és átfogó elemzés is született [116] az azóta saját nevet [117] is kapott módszerhez: MBT-ASTRA, azaz MALDI BioTyper®-Antibiotic Susceptibility Testing Rapid Assay-ként is hivatkoznak a tesztre és az egyik legmegbízhatóbb módszernek tartják e területen. (Ezen kívül még MSBA néven is emlegetik néha). Nagyon fontos tulajdonsága a módszernek, hogy kivitelezése nem igényel sem sok időt, sem túl nagy infrastruktúráis beruházásokat a hagyományosabb laboratóriumokban sem, így talán kijelenthető, hogy nagy valószínűséggel ma a jövő egyik fontos vizsgálati módszerének fejlesztési folyamatainak részesei lehetünk.

Természetesen ennek a technológiának is vannak korlátai és hátrányai. Először is azokat a rezisztenciamechanizmusokat nem tudjuk e módszerrel detektálni, amelyek a nem enzimikus antibiotikum módosítás révén történnek, de tulajdonképpen ilyen esetben, ha rendelkezésünkre áll például már egy egyszerű antibiogramon egy rezisztencia valamely antibiotikummal szemben és ebben a tesztben nem kapunk eredményt, akkor feltételezhetjük, hogy a rezisztencia a vizsgálaton kívüli típusú. Másrészt technikai problémákat okozhat az is, ha van ugyan enzimaktivitása a vizsgált baktériumnak, de az csak intracellulárisan vagy periplazmatikusan történik ennél a mikrobánál, így a módosítandó termék nem alakul ki, vagy extracellulárisan nem detektálható. Ez a probléma feloldható a sejtek permeabilitásának növelésével (0,1% SDS) [118], vagy a sejtek lizálásával.

Magának az enzim peak-jének a hagyományos identifikációs spektrumban való keresésére is voltak kezdetben próbálkozások [119], de e módszer létjogosultsága megkérdőjelezhető, hiszen ezek az enzimek nem mindig vannak jelen, nem mindig konstitutívak, nem mindig elegendő a mennyiségük ilyen típusú mérésekhez, a sok közel azonos méretű, sok egyéb fehérje peakje pedig a rutin vizsgálatokat szinte ellehetetlenítheti.

Az első leírás óta eltelt közel egy évtizedben elég sok előadás és publikáció született már e fejlődő témában, sok laboratórium kutatja, sok kutató keresi az alap módszer kiterjesztéseit különböző antibiotikumok és különböző mikrobák vizsgálatára. Elsősorban a különböző béta-laktám antibiotikumok [118, 120, 121], köztük a különösen nagy figyelmet érdemlő karbapenemek [115, 118, 120, 122, 123, 124], valamint a fluorokinolonok [125, 126] az egyelőre több-kevesebb sikerrel alkalmazható és viszonylag jól leírt módszerek, de rengeteg apró részlet és optimalizálás szükséges még annak eléréséhez, hogy a módszer bármely mikrobiológiai laboratórium számára könnyen adaptálható és jól funkcionáló tesztként a rutin laboratóriumi folyamatokban is megállja a helyét.

30. ábra (Sparbier et al. 2012) [120]

A) ampicillin intakt marker peakjei béta-laktamáz negatív *E. coli* törzs esetén.

B) ampicillin módosított marker peakjei egy béta-laktamáz termelő *E. coli* törzs mellett.

C) ampicillin intakt és módosított marker peakjei béta-laktamáz termelő *E. coli* törzs és béta-laktamáz enzimet gátló klavulánsav mellett.

6. A kísérletes munka tervezése és gyakorlati kivitelezése

A projekt első fázisában kiválasztjuk azokat az antibiotikumokat, illetve antibiotikum rezisztens és antibiotikum érzékeny mikroorganizmusokat, amelyek alkalmasak a projekt céljainak megvalósítására. A kutatások során MALDI-TOF tömegspektrometriával vizsgáljuk a kiválasztott antibiotikum mikrobiális bontását, az antibiotikum metabolitjának megjelenését a tápoldatban, azaz a rezisztencia e formájának jelenlétét az adott mikrobatorzs esetében. Ez alapján a törzs rezisztenciája (vagy annak hiánya) interpretálható a klinikus felé.

A projekt során elvégezzük azokat az ellenőrző vizsgálatokat is, amelyekkel bizonyítjuk a kidolgozott MALDI-TOF vizsgálati módszer megbízhatóságát. Ezen vizsgálatokkal egyrészt azt bizonyítjuk, hogy a MALDI-TOF tömegspektrométerrel a tápoldatban valóban a vizsgált antibiotikum bomlástermékét, metabolitját, illetve annak natív formáját detektáljuk-e. Másrészt az ellenőrző vizsgálatokkal bizonyítjuk, hogy az antibiotikum bontást valóban az adott mikrobatorzs végezte a kísérletek során. Az ellenőrző vizsgálatokhoz kontrolltörzsek alkalmazása, egyéb kontrollvizsgálatok, enzimspecifikus inhibitorok alkalmazása és hagyományos mikrobiológiai érzékenységvizsgálatok tartoznak elsődlegesen.

Munkánk célja a MALDI-TOF MS érzékenységvizsgálati módszer rutin laboratóriumi alkalmazhatóságának tesztelése, optimalizálása, adaptálása, az alkalmazhatóság határainak esetleges kiterjesztése, ugyanakkor célunk a módszer korlátainak felderítése is.

7.1. Az antibiotikumok kiválasztása:

A vizsgálatokba azokat az antibiotikumokat válogattuk be, melyek a szakirodalomból megismert módszerek alapján jó jelöltjei (vagy már többé-kevésbé igazoltan jónak tűnő eszközei) a MALDI-TOF MS módszerrel végzett érzékenységvizsgálatoknak.

Elsősorban a béta-laktamáz típusú enzimek targetjeként szolgáló béta-laktám antibiotikumok vizsgálata volt projektünk fontos célja,

mert ezek ellen igen széles körben elterjedt rezisztencia mechanizmusok léteznek,

mert detektálásuk nagyon fontos laboratóriumi feladat,

mert detektálásuk nagyon fontos klinikai következményekkel jár,

és mert a módszer gyorsasága miatt valóban képes gyorsítani ezen fontos információknak a klinikum felé történő áramlását, ami végső soron minden ilyen irányú vizsgálatnak célja is kell hogy legyen.

- Penicillin

A történetileg is első antibiotikum a vele szemben már kialakult rengeteg rezisztencia miatt klinikailag fokozatosan egyre szűkebb körben maradt csak alkalmazható, van még azonban néhány olyan kórokozócsoport, ahol még ma is teljeskörű alkalmazhatóság maradt fenn (*Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*, *Treponema pallidum pallidum*) és vannak baktériumcsoportok, ahol még lehet esetleg létjogosultsága alkalmazhatóságának (a

legtöbb baktériumcsoportnál már nem is vizsgáljuk alkalmazhatóságát), de ez már a laboratóriumi vizsgálatok eredményeitől is függ, mert mindegyik csoportnál vannak olyan egyéb szerek is, amik a first line terápiában jobbak és hatásukat tekintve sokkal biztonságosabbak is a penicillinnél (*Haemophilus*-ok, *Neisseria gonorrhoeae*, α - és β -hemolizáló *Streptococcus*-ok, *Corynebacterium*-ok). Gyorsdiagnosztikai jelentősége tulajdonképpen nem túl nagy, kísérletes szempontból viszont érdekességeket tartogat.

- Ampicillin

Ennek a viszonylag régi és egyszerű aminopenicillinnek (csak egy aminocsoporttal különbözik a penicillintől) a vele szemben is már kialakult rezisztenciák ellenére még sok baktérium ellen alkalmazható valóban releváns antibiotikumként még a mai klinikumban is (Gram-negatív bélbaktériumok (*Enterobacteriaceae*), *Haemophilus*-ok, *Staphylococcus saprophyticus*, α -hemolizáló *Streptococcus*-ok, *Enterococcus*-ok). Leggyakrabban akkor használatos, ha nem szükséges magasabb osztályú és erősebb, szélesebb spektrumú antibiotikumot használni (ez kisebb szelekciós nyomást tesz a gazdaszervezet mikrobiomjára és ezért nyilván kisebb kárt is okoz abban). Bevezető kísérleteinket az ampicillin MALDI-TOF MS vizsgálataival kezdtük és igen jó tapasztalatokat szereztünk ebben a vizsgálatosorozatban: a módszer jól alkalmazható volt, az eredmények egyértelműek voltak és jól korreláltak a hagyományos érzékenységvizsgálatok eredményeivel is.

- Cefotaxim

Harmadik generációs cefalosporin, sok korábbi generációs cefalosporinnal ellentétben a gyakoribb és egyszerűbb béta-laktamázok már nem képesek hidrolizálni béta-laktám gyűrűjét, ezért terápiás jelentősége manapság is nagy: Gram-negatív bélbaktériumok (*Enterobacteriaceae*), *Haemophilus*-ok, *Streptococcus pneumoniae*, β -hemolizáló *Streptococcus*-ok *Staphylococcus*-ok, *Neisseria*-k, anaerobok. *Enterococcus*-ok és *Pseudomonas*-ok ellen nem hatásos, azok intrinsic rezisztenciája miatt. Kísérleteink egyik legfontosabb vizsgált antibiotikum alanya, kiváló eszköze ESBL és egyéb szélesspektrumú enzimek működésének MALDI-TOF MS alapú tanulmányozásához.

- ceftazidim

A cefotaximhoz hasonlóan szintén harmadik generációs cefalosporin, hasonló tulajdonságokkal és terápiás spektrummal, de *Pseudomonas*-ok ellen is hatásos, ahol a first line terápiás protokoll része ma is. Szintén kiváló eszköz lehet széles spektrumú béta-laktamáz enzimek tanulmányozásához.

- imipenem

Karbapenem antibiotikum, rendkívül széles hatásspektrummal, még *Pseudomonas*-ok és *Enterococcus*-ok ellen is bevethető terápiás eszköz. *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter*-ek, anaerobok, *Actinomyces odontolyticus* általában érzékenyek rá. Klinikai alkalmazását azonban nagyon fontos, hogy laboratóriumi *in vitro* érzékenységvizsgálat megelőzze, mert sok baktériumcsoportban előfordulnak már csökkent érzékenységgű fenotípusok is (*Acinetobacter*, *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*), másrészt pedig a karbapenemáz enzimek megjelenése óta teljeskörű karbapenem rezisztenciát élveznek az ezeket az enzimeket termelni képes baktériumok. Kísérleteink egyik legfontosabb célmolekulája az imipenem, a karbapenemáz aktivitás rendkívül gyors detektálásának alapvető eszköze.

- meropenem

A MALDI-TOF MS vizsgálattal végzett első ilyen irányú kísérletek is ezzel az antibiotikummal történtek [116], hatásspektruma és jelentősége az imipenemével egyenrangú.

- ciprofloxacin

Második generációs fluorokinolon antibiotikum. Hatásspektruma nagyon széles (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*-ok, *Acinetobacter*-ek, *Haemophilus*-ok, *Neisseria*-k, *Staphylococcus*-ok), ezért ebből következően klinikai felhasználása már csak mennyiségileg is nagyon jelentős. Csökkent érzékenységet mutatnak vele szemben a *Streptococcus*-ok; az *Enterococcus*-ok pedig intrinsic rezisztensek rá. A különböző módokon megvalósuló kinolon rezisztenciák [43, 44] közül a fluorokinolon acetiláz enzimek kimutatásának alapvető eszköze vizsgálatainkban.

7.2. A baktérium törzsek kiválasztása:

Vizsgálatainkhoz olyan baktériumtörzsekre volt szükségünk, amelyekről az alapvető, hagyományos antibiogramok alapján tudtuk, hogy valamely antibiotikummal szemben érzékenyek vagy rezisztensek, illetve egyéb vizsgálatokkal felismertünk bennük valamilyen számunkra fontos vagy érdekes rezisztenciamechanizmust. Felhasznált törzseink legtöbbször klinikai izolátum, mert nagyon fontos volt számunkra, hogy a project céljaként is megjelölt laboratóriumi adaptációt az alkalmazott módszerrel meg tudjuk-e valósítani. E törzsek legtöbbször a MikroMikoMed Kft. mikrobiológiai laboratóriumában előforduló klinikai izolátumok voltak, négy baktériumtörzs a QualiCont Kft. által rendezett országos körvizsgálatok révén jutott el laboratóriumunkba, egy felhasznált törzs pedig a Szent László Kórház Mikrobiológiai Laboratóriumának ajándéka volt (Dr. Nikolova Radka, Dr. Ujhelyi Eszter). A felhasznált törzsek mindegyikéről MALDI-TOF MS elvű meghatározást is végeztünk a pontos és biztos fajszintű identifikáció végett, mert csak azok az izolátumok

kerülhettek be kísérleteinkbe, melyekről egyértelmű faji identifikációt sikerült végezni MALDI-TOF MS hagyományos identifikációval. Negatív kontrollként (amelyekről hitelesített leírásukból adatként ismert, hogy nem rendelkeznek az éppen vizsgált rezisztencia-mechanizmussal) a magyarországi hivatalos törzsgyűjteményből (HNCMB) származó ATCC referencia törzsket használtunk. A felhasznált törzsekről készült listát, azok származásával és egyéb fontos adataival együtt az 1. Függelék tartalmazza. Mindegyik felhasznált törzs tárolása a MikroMikoMed Kft. mikrobiológiai laboratóriumának -70°C-os mélyfagyasztó hűtőjében történik megfelelő körülmények között, további felhasználás, a kísérletek reprodukálása ezekből lehetséges, a mélyfagyasztott törzsekről illetve azok különböző fontos tulajdonságairól füzet és xls formátumú törzslista is létezik.

7. A kísérletes munka céljai

A projekt rövid távú eredményeként azt várjuk, hogy a kísérleteink során optimalizált rendszerekben az egyes antibiotikumok könnyen és megbízhatóan legyenek vizsgálhatóak a klinikai törzsekkel és hogy az eredmények nagy megbízhatósággal egyezzenek a standard módszer eredményeivel.

Nagyon fontos célunk volt annak felderítése, hogy a módszer mennyire adaptálható egy alapvetően hagyományos rutin mikrobiológiai laboratórium eszköztárába, munkafolyamataiba, milyen időbeli előnyt jelentenek ezek a vizsgálatok a hagyományos módszerekhez képest, milyen minőségbeli különbségek fedezhetők fel a kísérletek eredményeként.

Hosszú távú célként tűztük ki a rövid távú célok megvalósulása esetén annak megteremtését, hogy ezeket a rezisztenciavizsgálatokat rutinszerűen végezzük, és hogy egy adott mikrotörzs elemzése során több antibiotikumot is teszteljünk, hogy egy szélesebb antibiogramot is tudjunk interpretálni ezzel a módszerrel. Ehhez szükség van több antibiotikum ilyen irányú kísérletes vizsgálatára, az egyes antibiotikumok tulajdonságainak megismerésére, az előnyök és a buktatók felderítésére, a megfelelő körülmények egyedi optimalizálására.

8. A kísérletes munka eredményei

A leírt MALDI-TOF MS érzékenységvizsgálati módszer rutin folyamatként alkalmazható különböző rezisztenciamechanizmusok gyors detektálására primokultúrákból, azaz további tenyésztéses lépések nélkül. A metodika lehetővé teszi egy 16-24 órával korábban elkészülő antibiogram gyors interpretációját a klinikus felé, így jelentősen javíthatja

például az intenzív betegellátásban részesülők megfelelő terápiájának hatékonyságát, és nem túlzóan: tulajdonképpen a betegek túlélési esélyeit.

A metodika kidolgozása esetén lehetőség nyílik más intézmények által beküldött mikroorganizmusok MALDI-TOF MS módszerrel történő érzékenységvizsgálatára, 3-4 órán belül detektálhatók és interpretálhatók bizonyos antibiotikum rezisztenciamechanizmusok, a célzott és jóval korábban elkezdett antibiotikus kezelésnek köszönhetően jelentős mértékben javítható a fertőzéses eredetű kórképek terápiájának hatékonysága. Felére-harmadára esik a keletkezett veszélyes hulladék mennyisége is, ezzel költség- és helytakarékosabbá is téve a mikrobiológiai laboratóriumi munkafolyamatokat.

9. A kísérletes munka elméleti leírása

A projekt során a legtöbb esetben azt az alapvető módszert használjuk, hogy a vizsgált baktérium primokultúrájából szuszpenziót készítünk antibiotikumot tartalmazó oldatban. Ha az adott baktérium képes ennek az antibiotikumnak a bontására valamilyen enzimtevékenység révén, akkor az tömegspektrometriásan mérhetővé válik a kontrollként használt intakt antibiotikum spektrum mintázatához képest. Ez alapján kimondható, hogy az adott mikroorganizmus rendelkezik-e olyan fajta rezisztenciamechanizmussal, amelyben az antibiotikum bontása révén elkerüli az antimikrobiális hatást. A vizsgálatokat olyan törzsekkel állítjuk be és optimalizáljuk, melyekről hagyományos eljárásokkal ismertek a keresett rezisztenciamechanizmusok. Negatív kontrollként mindezekről biztosan mentes hiteles referenciatörzseket használunk.

1. A projekt során optimalizáljuk a mikroba + antibiotikum rendszerek inkubálási körülményeit, majd a kapott oldatokból tömegspektrometriás méréseket végzünk.
2. A MALDI-TOF MS érzékenységvizsgálati módszerhez kidolgozzuk azt a műszerkezelési protokollt, mely eltér a hagyományos identifikációs mérési protokolltól és a legoptimálisabban szolgálja az antibiotikumrezisztencia kimutatási vizsgálatok céljait.
3. Következő lépésként elvégezzük a tömegspektrometriás méréseket a kidolgozott MALDI-TOF MS antibiotikum rezisztencia kimutatására alkalmas műszeres mérési protokollal, precíz belső kalibrációs lépések lefolytatása mellett.
4. A mérések után az adatok elemzését végezzük el. Kiértékeljük, hogy adott esetben jelen van-e specifikus bomlástermék, illetve intermedier, azaz rendelkezik-e a mikroba ilyen típusú rezisztenciamechanizmussal az adott antibiotikummal szemben.
5. Minden esetben elvégezzük a szükséges kontrollvizsgálatokat is.
6. Nagyobb mennyiségű adat összegyűlése után statisztikai analízist is végzünk.

11. A kísérletes munka részletes terve

A MALDI-TOF MS alkalmazása során lehetőség van a rutin identifikációs eljárásokban használt „default” módtól eltérő beállításokra is. Ilyenkor manuálisan elvégezhető „átállítást” kell eszközölni, ha más mérési tartományban, más mérettartományú molekulák között, vagy más intenzitású jelek között keresgélünk. A MALDI-TOF MS-sel végzett antibiotikum rezisztencia vizsgálatoknál maga a natív antibiotikum is nagyon alacsony molekulású tartományba esik, a belőle enzimatikus úton keletkezett termékek szintén ebben az alacsony moltömegű tartományban keresendők, vagyis az alapbeállítás során a tömegspektrométert kell először is olyan módon beállítani, hogy ezeket a kis moltömegű, kis mennyiségű molekulákat legyünk képesek detektálni. Ezeknél a kísérleteknél a következő alapvető átállításokat kell elvégezni a tömegspektrométeren:

- mérések pozitív lineáris üzemmódban,
- a tömeg szerinti mérési tartomány beállítása 100 – 1000 Da mérettartományra,
- lézer frekvencia: maximális szintre,
- belső kalibráció kis moltömegű jelmolekulával (bradykinin).

A kísérletek tervezésénél felmerült, hogy ha nem megfelelő az általánosan használt CHCA mátrix vivőanyagként, akkor más mátrixokat is kipróbálunk, de minden vizsgálatnál megfelelő eredményt biztosított a CHCA is, így végig ennél a mátrixnál maradtunk. Fontos a spektrometriai mérés belső kalibrációja is, melyet elsősorban bradykinin molekulával tervezünk elvégezni (MALDI Biotyper Realtime Classification szoftverrel). A belső kalibráció lényege, hogy maga az analit tartalmazza a kalibrátort, nem kell külön mérésként felvinni. Ezek alapján (és a szintén ismert tömeg/töltés számú mátrix (CHCA) adatai segítségével) teljes biztonsággal kezelhetők a spektrumok a kalibrált csúcsok precíz beállításával. Ha az eltérés mértéke kisebb mint 1 tömegszám egység, a kalibráció elfogadható.

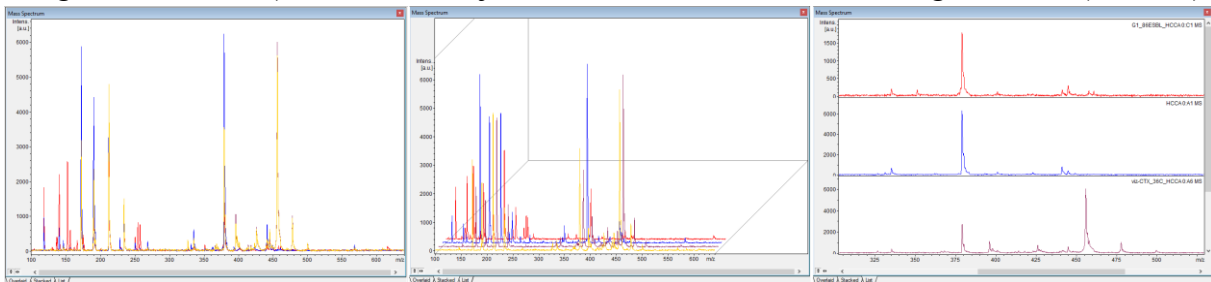
A „beállítások” után igyekszünk megteremteni azokat az informatikai és tömegspektrometriai vezérlési módszerekhez szükséges feltételeket, melyekkel könnyen automatizálható is lesz a jövőben ez a mérési metódus. Ez az automatizálhatóság nyilvánvalóan csak azoknál a teszteknel lesz automatikusan elvégezhető, amelyeknél gyorsan és egyszerűen megoldható az analízise, akár már a spektrométer computere révén is (pl. VRE elkülönítése nem VRE-től, cfiA gént hordozó és nem hordozó *B. fragilis* törzsek, stb). Fontos megemlíteni, hogy az automatizálhatóság sosem jelent teljes felügyelet nélküli interpretációt. Például a VRE-k kimutatása kapcsán tudjuk, hogy némely VRE törzsek kimutathatók ezzel a módszerek, némelyek viszont nem, tehát egy negatív eredmény a MALDI-TOF MS-sel nem jelent automatikusan mindig negatív eredményt; és ugyanitt egy pozitív eredmény pedig egyelőre még konfirmálandó és csak preszumptív eredményként közölhető.

Az antibiotikum enzimatis bontásán alapuló vizsgálat elméleti háttere az, hogy vannak baktériumok, melyek bontani/módosítani képesek bizonyos antibiotikumokat és ezáltal elkerülik annak rájuk nézve negatív (és végzetes) hatásait, vagyis e bontási/módostási folyamat révén megvédik magukat, végső soron rezisztensekké válnak ezekkel az antibiotikumokkal szemben. A kísérletek során ezt a tulajdonságukat keressük a vizsgált baktériumoknak. A kísérletben a baktérium és az antibiotikum elegyét inkubáljuk megfelelő (optimalizálendő) körülmények között, majd MALDI-TOF MS-sel mérjük az elegyből vett mintából az eredeti antibiotikum jelenlétét, illetve a specifikusan az enzimtevékenység révén létrejövő bomlástermékek jelenlétét. Az enzimtevékenység nyomán, kismértékű eltolódások jönnek létre a tömegspektrum egyes csúcsain („peak”-jein) azáltal, hogy egy-egy kötést felszakítva vagy egy-egy atomcsoportot levágva, módosul az eredeti molekula, azaz a tömegspektrum megváltozik. Ha nincsenek jelen bomlástermékek, az azt jelenti, hogy az adott baktériumtörzs nem képes ilyen módon védekezni az antibiotikum ellen, vagyis érzékeny rá, azaz elpusztul tőle, de azt is jelentheti, hogy más típusú rezisztencia mechanizmus révén valósul meg rezisztenciája. Ha jelen vannak az inkubáció végén specifikus antibiotikum-bomlástermékek a mintában, akkor ez a baktériumtörzs rezisztens ezzel a szerrel szemben, és igazoltuk, hogy ezen enzimatis tevékenység révén az. Ebben az esetben lehet azt interpretálni a kezelőorvos felé, hogy olyan tulajdonságot tártunk fel az éppen fertőzést okozó mikrobánál, mely kizárja bizonyos antibiotikumok használatát, vagyis a téves terápia esélye jelentősen csökken, a beteg életesélyei pedig a gyors és pontos eredményeknek köszönhetően jelentősen nőnek.

Az egyes kísérletekben tehát a baktériumokat kis mennyiségű antibiotikum oldatban inkubáljuk (a megfelelő térfogat megállapítását optimalizáljuk). Az inkubáció körülményeit kontrolltörzsekkel álltjuk be, széles körű optimalizálást végzünk minden reakciótípusnál a reakcióidő, a reakció térfogat, az inkubációs hőmérséklet és a felhasznált anyagok különböző koncentrációsoraival. Párhuzamosan különböző negatív és pozitív kontrollokkal végzett reakciókat is indítunk, melyekre minden kísérletsor esetében szükség van, ugyanis mindig tudnunk szükséges, hogy például jelen van-e valamilyen apró szennyeződés az oldatainkban, történtek-e spontán nem biológiai folyamatok a reakcióelegyekben, rendben működnek-e a kontrolláló törzseink. Az inkubáció végén a baktériumokat az Eppendorf-csővek aljára centrifugáljuk magas rpm fordulatszámra, majd a felülúszóból 2 µl-t a MALDI-TOF plate-re pipettázunk ki. A mérések tehát nem a baktériumokból készülnek, hanem a baktériumok jelenlétében lejátszódó vizes oldatokból vett analitokból. Ezért szükséges mindenképpen a baktérium sejteinek szeparálása centrifugálással a mérések kivitelezése előtt. (Ha az így lemerített analitokban meghagynánk a baktérium sejteket, a spektrumok értékelhetetlenek volnának a rendkívül nagy mennyiségű és sokféle peak zavaró jeleitől.) A target plate-re kipipettázott 2 µl-nyi minta gyorsan beszárad (körülbelül 10 perc alatt), tulajdonképpen a beszáradás – a víz hiánya miatt – állítja le az oldatokban zajló biokémiai folyamatokat.

A beszáradt minták spotjait az előzőekben átállított mérési MALDI-TOF MS paraméterekkel vizsgáljuk a mátrix oldat felpipettázása és annak is a beszáradása után a Wessling Kft. laboratóriumában található MALDI-TOF MS készüléken. A méréseket tapasztalt szakember végzi, aki a gépi okokból eredő hibákat rögtön orvosolni is tudja. Az

egyes plate-eken lévő minták méréséhez mindig szükséges, hogy a méréseket összeállítók szolgáltassanak egy xls formátumú fájlt arról, hogy a plate egyes spotjain pontosan hol és milyen egyes analitok vannak. Ez a fájlformátum a MALDI-BioTyper® kezelőszoftver számára megfelelő, külön konvertálásra nincs szükség. Az xls fájl megfelelő soraiba írt analit elnevezések (ékezetek és egyéb különleges karakterek nélkül!) lesznek később a mérés végeredményeként születő spektrumok egyes fájljainak elnevezései (.btmsp kiterjesztésű fájlok). A MALDI-BioTyper® flexAnalysis értékelő szoftverben három különböző többszörös mintavizsgálati módszer elérhető: „Overlaid-”, „Stacked”- és „List” view, mi ezek közül a „List view”-t találtuk a legmegfelelőbbnek vizsgálataink értékeléséhez. Az „Overlaid” és „Stacked” nézeteknél az egyes peakek már nehezen megkülönböztethetők (másfajta vizsgálatokhoz valók), a „List view” jóval áttekinthetőbb ezekben a vizsgálatokban (32. ábra).



32. ábra

MALDI-BioTyper® különböző vizsgálati nézet opciói (Balról jobbra: Overlaid, Stacked, List)

A mérések eredményeiről készült spektrumokat a projektben résztvevők közösen értékelik, ebben a munkafolyamatban összevetjük a spektrumokon kapott eredményeket a várt értékekkel, az aktuális eredményekről a plate mérésének alapjául szolgáló, fent már említett xls fájl eredetijében írjuk fel a tapasztaltakat: megvannak-e a várt peakek, vannak-e nem várt peakek, történt-e váratlan esemény, mennyire értékelhető a spektrum, stb, stb, és végül, de nem utolsó sorban azt vizsgáljuk meg, hogy megtörtént-e a várt enzimatikus reakció, azaz a reakciót pozitívként vagy negatívként értékelhetjük.

Pozitívnak nevezük az eredményt, ha megtaláljuk az antibiotikum enzimatikus bontása utáni specifikus bomlástermékeinek peak-jeit és/vagy az eredeti peakeket is és az intermediereket is. A negatív kontrollokban nincsen a reakció értékelhetőségét zavaró „kontamináns peak”, a negatív és vak kontrollok eredményei pedig elfogadhatók. A vizsgált baktériumról mindezek egyidejű teljesülése esetén kijelenthető (annak minden egyéb interpretálási következményével együtt), hogy rezisztens a vizsgált antibiotikumra.

Negatívnak nevezük az eredményt, ha a mintában csak a natív antibiotikum jele (azaz peak-je) van jelen, vagyis nem történt meg a várt enzimatikus reakció, az adott baktérium érzékeny erre az antibiotikumra. A negatív kontrollokban nincsen a reakció értékelhetőségét zavaró „kontamináns peak”, a negatív és vak kontrollok eredményei pedig elfogadhatók. Ha más rezisztenciamechanizmus nem lehetséges, akkor az adott baktériumról kijelenthető (annak minden interpretálási következményével együtt), hogy érzékeny a vizsgált antibiotikumra. Ha létezik „más úton” megvalósuló rezisztenciamechanizmus is, akkor csak annyit állapíthatunk meg a Negatív eredményből, hogy nem a vizsgált mechanizmusú a baktérium rezisztenciája, vagy esetleg érzékeny az adott szerre.

Fals az eredmény, ha valamely pozitív, negatív vagy vak kontroll hibát tár fel a vizsgálati rendszerben. Ilyen esetben ismételni kell a vizsgálatot. A vak (ddH₂O) kontrollok esetében kísérleteink során kivitelezhetetlen volt, hogy valamilyen mértékű kontamináció ne legyen jelen a méréseknél. Ezek az általában kisebb intenzitású kontamináns jelek (melyek származása nem volt felderíthető) azonban sem intenzitásuk mértékével, sem m/z tengelyen elfoglalt helyzetükkel nem voltak kritikusan zavaróak. A vizsgálatokat végigkísérő jelenséget még jól kezelhető mértékűként fogadtuk el.

Értékelhetetlennek nevezhetjük az eredményt, ha nem születik spektrum (nincsenek peakek), ha túl „zajos” a spektrum (túl sok a zavaró peak), vagy ha egyáltalán nem olyan peakek vannak a spektrumon, mint amilyeneket el lehetne várni (túlzott kontamináció vagy esetleg mintacsere, adminisztrációs hiba történt).

Annak igazolását vagy cáfolatát, hogy azt a bizonyos reakciót az a bizonyos enzim végezte el, amelyiket a reakciónkból vártuk, specifikus inhibitor anyagok segítségével tudjuk elérni. Ilyen specifikus inhibitor anyag például ESBL enzimek esetén a klavulánsav, vagy metallo-béta-laktamáz enzimek esetén az EDTA. Ha az enzimspecifikus reakcióban sikerül leállítani a gátolni kívánt enzim tevékenységét, azaz elmarad vagy jelentősen lecsökken az enzimaktivitás ezen reakciókban a párhuzamosan indított inhibitormentes reakcióhoz képest, akkor igazoltnak tekinthetjük, hogy azt a reakciót az a bizonyos enzim végezte el, amit gátoltunk specifikus inhibitorával. Némely enzim esetén sajnos nem áll rendelkezésre ilyen specifikus inhibitor, némely inhibitor pedig túl sok enzimnek inhibitora is egyszerre vagyis nem teljesen specifikus inhibitor.

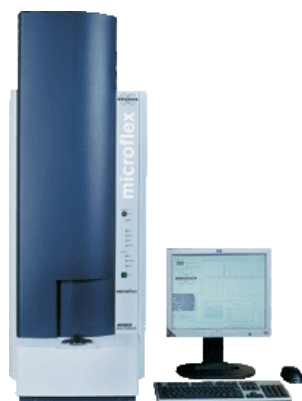
Ha igazoltnak fogadjuk el, hogy ez a bizonyos keresett enzim mutat enzimátikus aktivitást az adott baktériumban, akkor ebből olyan interpretációs plusz információkat tudunk megadni, mellyel nagyon nagy mértékben tudjuk segíteni a klinikust abban, hogy elkerülje a terápia kudarcot. Ez a fajta interpretáció nagyon hasznos abból a szempontból tehát, hogy kevés számú mérésből több antibiotikum tiltását vagy engedélyezését közölhetjük a kezelőorvossal. Ilyen vizsgálat például, ha sikerül ESBL enzim jelenlétét igazolni egy béta-laktamázos mérésben (azaz specifikus inhibitorával a párhuzamos reakcióban elmaradt a reakció), ilyenkor az interpretációban az összes béta-laktám antibiotikum „letiltható” a potenciális terápia repertoárjából.

Az antibiotikumok érzékenységi viszonyaival párhuzamosan mindig szükség van az adott mikroba pontos identifikálására is, mivel ennek ismeretében szintén több olyan antibiotikum tiltható ki az alkalmazható szerek listájáról, melyekre az adott fajhoz tartozó baktériumok például természetes (ún. intrinsic) módon rezisztensek. Emellett természetesen nagyban segíti a pontos és korrekt identifikáció is a lehetséges rezisztenciamechanizmusok jelenlétének ilyen tömegspektrometriás módszerrel történő felismerését is.

Az egyes antibiotikumokra vonatkozó optimalizálások után terveink szerint nagyobb mennyiségű klinikumból származó törzsön fogjuk elvégezni a módszer tesztelését. Az eredményeket minden esetben hagyományos módszerekkel is kontrolláljuk párhuzamosan. A kísérletek során szerzett tapasztalatok alapján olyan MALDI-TOF MS eredményeket vizsgáló számítógépes algoritmusok kidolgozása is szükségessé válhat, melyek nagy biztonsággal és nagy hatékonysággal ismerik fel az automatizált vizsgálatokban azokat a peak-eltolódásokat és módosulásokat, melyek a keresett enzimtevékenységekre utalnak. Nagy mennyiségű adat összegyűlése esetén statisztikai elemzések is végezhetőek lesznek az eredményekből.

12. Felhasznált eszközök és anyagok

A kísérletek kivitelezése viszonylag kis infrastruktúrális beruházásokat igényel. Laboratóriumunk rendelkezésére áll a szükséges MALDI-TOF MS tömegspektrométer a Wessling Kft laboratóriumában. A vizsgálatok kivitelezéséhez és folyamatos „startra kész” állapotban tartásához a 2. számú függelékben szereplő eszközök és anyagok szükségesek. A tömegspektrometriás mérések kivitelezéséhez szükséges anyagok költségei alacsonyak, a segédanyagként szolgáló „mátrix” megfelelő tisztaságú formája viszont szükséges paraméter. Az antibiotikumvizsgálati módszer költségigényét főleg a vizsgálandó, natív antibiotikumok adják, amelyek a lehető legtisztább formában szerzendők be. A vizsgálatokat egy vegyész, egy biomérnök és egy klinikai mikrobiológus végzi, az interpretációt klinikai orvos felügyeli.



33. ábra
MALDI-TOF tömegspektrométer

13. A kísérletes munka részletes leírása

Kísérleteink gyakorlati kivitelezését egy általános protokoll alapján kezdtük el, melyhez [120] végig ragaszkodtunk az összehasonlíthatóság végett, ennek részletesen kidolgozott, munkánkhoz adaptált és általunk végzett lépései a következők:

1. A kísérletben vizsgálni kívánt antibiotikum kiválasztása
 - i. milyen elméleti ismereteink vannak az adott antibiotikumról?
 - ii. milyen lehetőségek vannak ennek az antibiotikumnak az ilyen irányú vizsgálatában?
 - iii. milyen korlátok vannak ezekben a vizsgálatokban?
 - iv. mik a kivitelezés és az optimalizálás várható körülményei?
 - v. adottak-e ezek az infrastrukturális körülmények?
 - vi. rendelkezésre állnak-e a szükséges vegyszerek, anyagok?
 - vii. rendelkezésre állnak-e tesztorganizmusok?
2. A kísérletben vizsgálni kívánt baktériumtörzsek kiválasztása
 - i. rendelkezésünkre állnak-e ilyen, vizsgálni kívánt baktériumtörzsek?
 - ii. milyen elméleti ismereteink vannak az adott baktériumtörzsekről?
 - iii. kivitelezhető-e az adott baktériumok enzimikus aktivitásának ilyen irányú vizsgálata?
3. A kísérletekkel kapcsolatos, eddig megjelent publikációk tanulmányozása
4. A kísérlet elméleti megtervezése
5. A vizsgálni kívánt antibiotikumok és egyéb vegyszerek beszerzése
6. A vizsgálni kívánt tesztorganizmusok -70°C -os mélyfagyasztott cryo-csővekből való kioltása 24 órával a kísérletek előtt az adott baktériumoknak legmegfelelőbb táptalajokra. Az összes kísérletet csak 24 órás primokultúrákból szabad elvégezni, idősebb tenyészeteknél nem megfelelő eredmények születhetnek.
7. A vizsgálni kívánt antibiotikum törzsoldatok elkészítése analitikai mérleg, steril és egyszerhasználatos pipettahegyek, precíz pipetták és nagy tisztaságú oldószer (ddH_2O) segítségével steril fülke alatt.
8. A kísérletsorozat elméleti terveinek megfelelő antibiotikum hígítási sorok és egyéb oldatok összeállítása az egyértelműen feliratozott és steril egyszerhasználatos Eppendorf-csővekben a szükséges inkubációs térfogatokban steril fülke alatt, majd mindezek és a megmaradt törzsoldatok lefagyasztva (-70°C) tárolása.
9. A MALDI-TOF MS mérést végző kollégák értesítése arról, hogy másnap egy kísérleti mérés következik. A mérést végző kollégával történt egyeztetés után ő felkészül rá vagy azonnal elvégzi a szükséges gépbeállításokat. A mérést végző kollégának eljuttatjuk a másnapi kísérletsorozat tervét az egyértelműen és könnyen beazonosíthatóan elnevezett xls fájl formátumban, mely spotonként, egyesével tartalmaz minden szükséges információt az egyes lemérendő analitokról az adott plate-en. Magát a plate-et tartó kis műanyagdobozt is egyértelműen beazonosítható módon feliratozzuk, hogy éppen melyik kísérletet tartalmazza. Érdemes a mérést végző kollégák kollégáit is értesíteni a kísérlet másnapi érkezéséről, hogy ne hogy rutinszerűen, identifikáló mérésre készítsék elő plate-ünket, itt ugyanis az identifikáló eljárásoktól eltérően semmilyen hangyasavas vagy bármilyen más feltáró és egyéb lépés nem szükséges a mátrix felvitele és a mérés kivitelezése előtt.

10. Másnap a kitenyészett tesztorganizmusok növekedésének ellenőrzése, megfelelő növekedésű izolált telepek jelenléte esetén léphetünk csak tovább a kísérletekben.
11. A különböző inkubációs körülmények beállítása (termosztát hőmérsékletének ellenőrzése, száraz hőblokk inkubátorok beállítása és elindítása), az egyéb felhasznált műszerek (centrifugák) működésének ellenőrzése.
12. A kísérlethez előző nap összeállított Eppendorf-csöveket -70°C -ról elővesszük, az oldatokat szoba hőmérsékletűre engedjük melegedni. Csak egészen kis térfogatokat tartalmaznak a csövek, így ez 2-3 perc alatt végbe is megy.
13. A részletesen kidolgozott vizsgálati terv alapján az egyes feliratozott Eppendorf-csövekbe sterilizált és egyszer használatos műanyag fogpiszkálók segítségével körülbelül mákszemnyi mennyiségű baktériumsejtet homogenizálunk el alaposan a reakcióelegyekben. A fa anyagú fogpiszkálók túl sok folyadékot szívnak fel az egyébként is nagyon kicsi (legtöbbször 20 μl) reakció térfogatokból és vegyi tisztaságuk is erősen megkérdőjelezhető, ezért kísérleteink során végig ragaszkodtunk egy bizonyos műanyag fogpiszkáló típushoz, melynek hajlított vége ráadásul nagyban segíti is a baktériumsejtek felvételét a táptalaj felszínéről. A felvett inokulum mennyiségének megítélése viszonylag szubjektív, erre más módszer nincsen, törekedni kell az állandó mennyiség bevitelére. A homogenizálást a műanyag fogpiszkálóval kell elvégezni, vortexelni nem szabad, mert az a reakció térfogatunkhoz képest nagyon nagy Eppendorf-csőben szétszórja a folyadékcseppeket. Szintén figyelni kell a fogpiszkálóval történő homogenizálásnál, hogy ne kenjük szét se a baktériumsejteket, se a reakcióelegyet az Eppendorf-cső falára, hogy egységes reakció térfogatban menjen végbe a reakció. Ügyelni kell arra is, hogy ne összefolyt telepekből, hanem egyedi telepekből vegyünk mintát a biztos tisztaság miatt. Továbbá nagyon kell figyelni arra is, hogy a reakcióba a baktériumsejtek táptalajából semennyi se kerüljön a fogpiszkálós felvétel révén, mert ez szintén zavarná a reakciók tisztaságát.
14. Az adott kísérletsorozat elindítása. Tapasztalataink szerint egy MALDI-TOF MS plate-en kb 90 minta vizsgálata végezhető el. Az identifikációs méréseknél az esetleges mérési bizonytalanság kiküszöbölése miatt mindig két spotra visznek fel egy-egy analitot. Ezt a gyakorlatot tapasztalataink alapján nem mindig követtük, mert a mérések nagyon jó hatásfokkal működtek vizsgálataink során végig, a spektrumot egyáltalán nem adó vagy túl „zajos” spektrumok száma nagyon alacsony volt az elvégzett nagy mennyiségű mérés jó eredményeihez képest.
15. Az inkubációs idők lejártakor az Eppendorf-csöveket az inkubátorokból kivesszük és 13.000 rpm fordulatszámon rögtön lecentrifugáljuk (2') (szobahőn).
16. A lecentrifugált minták felülúszójából 2-2 μl víztiszta oldatot mérünk a kísérleti tervet követve a megfelelő MALDI-TOF target plate spotjaira. Ha a minta zavarossá válik a helytelen pipettázás miatt, akkor újra le kell centrifugálni az adott reakcióelegyet. Tapasztalataink szerint a gömbölyű aljú

Eppendorf-csövek alkalmasabbak ezekhez a kísérletekhez, mert a hegyes-kúpos aljúaknál a sejtek a kúp végébe centrifugálódnak, e fölött található a felülúszó, amiből a mintát kell vennünk. Gömbölyű aljú Eppendorf-csövek esetén a centrifuga dőlési szöge miatt a sejtekből álló üledék nem a cső legalján lesz az üleítés után, hanem kissé attól oldalt, így mintavételnél a csövet kissé megdöntve, sokkal könnyebb tényleg tiszta felülúszót pipettázni még ilyen kicsi térfogatú oldatból is.

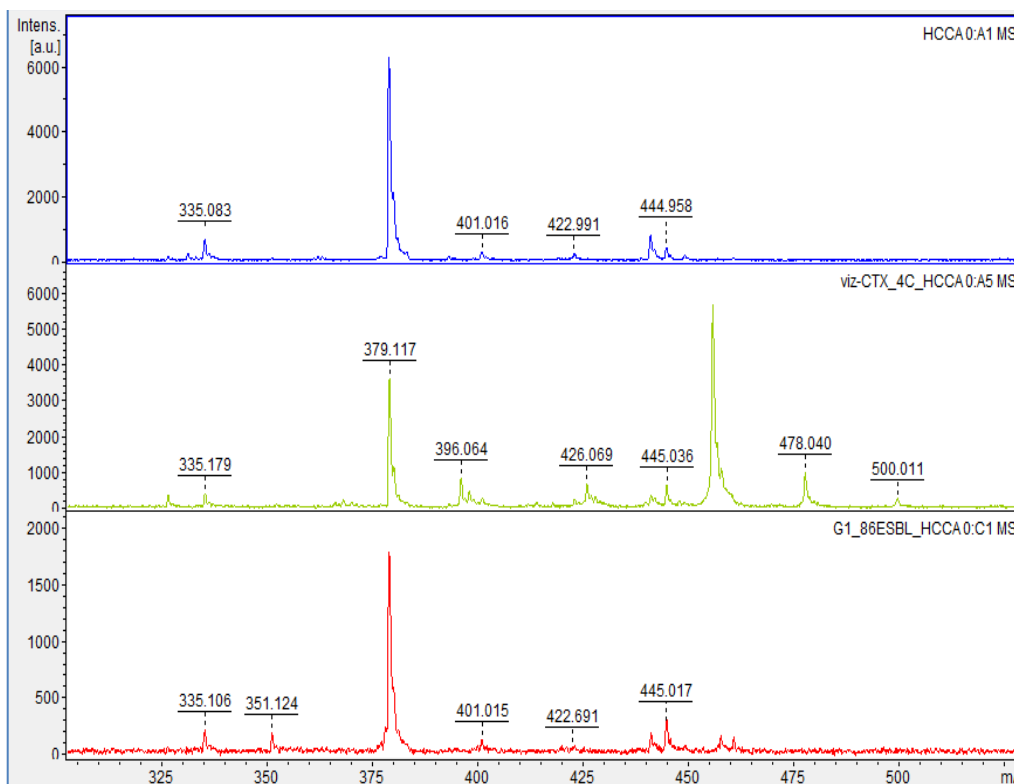
17. A felpipettázott mintákat száradni hagyjuk (~10 perc). A biokémiai reakciót a kiszáradás zárja le. Melegíteni a target plate-et a gyorsabb száradás érdekében nem szabad, mert akkor még eközben már nem kívánt további reakciók is történhetnek a száradó reakcióelegyekben. A száradás sürgetése levegőáram segítségével sem ajánlott, mert akkor a cseppek a légáramnak megfelelően eltorzulva száradhatnak meg, ami a műszeres vizsgálatnál jelentősen megnehezíti a méréseket (az ionizációs lézer a spotok közepére irányul).
18. Beszáradás után következhet a mátrix oldat felmérése az egyes analitokra, majd ennek beszáradása után, maga a mérés. (Ha valamilyen okból éppen nem lehetséges a mérés azonnal, a beszáradt oldatokat tartalmazó plate +4°C-on hűtve eltárolható a mérés kivitelezéséig.)
19. A mérési eredmények kiértékelése MALDI Biotyper® flexAnalysis szoftver segítségével.
20. Eredmények értelmezése, interpretáció
21. Visszacsatolás, a következő kísérletsorozat megtervezése

14. A MALDI-TOF mérések kontrollvizsgálatai, validitás értékelése

Mint minden egyéb kísérletsorozatban, így ebben is természetesen elsőként a vizsgálatokhoz felhasznált alapvető anyagok: a vak kontrollként szolgáló desztillált víz, a tiszta antibiotikum, és az egyéb tiszta alapoldatok (pl. klavulánsav, APBA) tisztaságáról kellett meggyőződjünk.

Ezen vizsgálatok is ugyanazzal a procedurával készülnek mint a vizsgálatok enzimológiai kísérletei, vagyis e tiszta oldatokból is 2 µl-t pipettázunk ki a MALDI-TOF target plate-re, ezt is hagyjuk beszáradni, majd az erre felvitt 2 µl mátrix oldat beszáradása után itt is ugyanúgy történik meg a mérés.

A negatív kontrollként szolgáló oldatok spektrumait a 34. ábra szemlélteti.



34. ábra Negatív kontrollok.

Felső panel: csak dH₂O, vak kontroll; Középső panel: víz + cefotaxim; Alsó panel: csak baktérium felülésző.

Azok a peakek, melyek a csak tiszta desztillált vizet és mátrixot tartalmazó spotokról készült spektrumokban megtalálhatók, minden abban az adott kísérletsorban látható összes egyéb spektrum esetében semmisnek, kontamináns peaknek kell tekinteni. Kísérletsorozatunk során sajnos nem sikerült olyan PCR-tisztaságú, RNáz-mentes, „minden-mentes” ioncserélt, desztillált vizet kipróbálnunk, mely a gyakorlatban is valóban mentes lett volna minden, ebbe a nagyon alacsony mérettartományba eső kontaminációtól. A vizsgált mérési tartományban (~100-600 m/z) minden esetben megjelent néhány kisebb-nagyobb intenzitású kontamináns peak a vak kontrollokban is, de ezek szerencsére szinte egyik esetben sem voltak olyan formában zavaróak, hogy egybeestek vagy nagyon zavaróan megközelítettek volna valamilyen marker peaket.

A gyakorlatban és nagy mennyiségben végzett kísérletekben nem is tűnik életszerűnek ilyen nagyon nagy analitikai tisztaságú víz folyamatos rendelkezésre állása, ha terveinknek megfelelően a módszer egy szinte bármely mikrobiológiai laborban elvégezhető rutin módszeré válik.

Mint az a 34. ábrán látható, minden egyes mérés során van egy nagy intenzitású peak a spektrumokban, mely mindig jelen van: ez a peak egy 379 Da tömegű molekulától származik, ami pedig nem más, mint az aktuálisan használt mátrix molekulánk önmagával alkotott dimerje. Az α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA) molekulatömege 189 Da ($189+189+1=379$). Az utóbbi egyenletben szereplő +1 úgy értelmezhető, hogy az a MALDI-TOF MS ionizációs módjából adódik (itt pozitív ionizáció), azaz csak a protonált formákat mérjük minden molekula esetén ebben a pozitív ionizációs üzemmódban.

A 34. ábra felső paneljében a felhasznált ddH₂O spektruma látható a vizsgált tartományban, a méréshez szükséges mátrix peakjén túl látható még néhány kisebb peak, melyek kontaminánsként vannak jelen a kísérletsorozatban, vagyis ugyanezeketől a peakektől el kell tekintenünk minden más párhuzamosan lemerő spektrum esetén is, mert az az általános oldószerként felhasznált vízből származik. Ilyen peakek például a 326, 335, a 401, a 423 m/z értéknél mért egyedi, kisebb intenzitású peakek és a 441-445 m/z-nél található páros peak kontaminánsok. Ezen peakek tehát megtalálhatóak az összes többi mérésben is, amint az a 34. ábra középső és alsó paneljén is látható. Ennek jelentősége akkor van, ha ezek a kontamináns peakek zavaró „helyen”, zavaró intenzitással vannak jelen. Ilyen túlságosan zavaró, az eredmények értékelését ellehetetlenítő kontaminációt mérésünk során alig tapasztaltunk, de sajnos mindig jelen voltak különböző kisebb szennyező anyagok a legtisztább ddH₂O-ben is.

A tömeg/töltés spektrumokon lévő peakek egysége az m/z, ez tehát a jelek mértékegysége a spektrumokon. A molekulák tömegegysége a Da (Dalton), melynek megfelelő (vagyis azonos) m/z értékekkel láthatóak az MS spektrumokon.

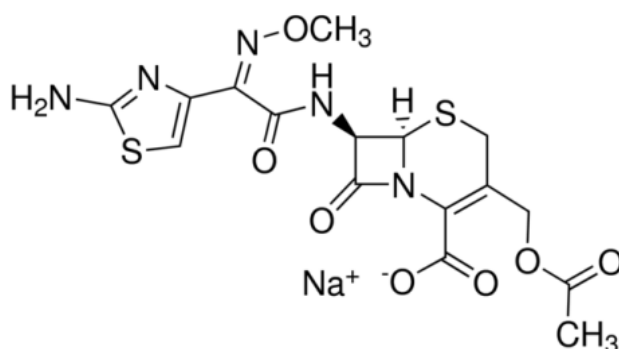
A 34. ábra középső paneljében a csak vizet és 0,5 mg/ml koncentrációban tiszta cefotaximot tartalmazó oldat mérési eredménye látható. A natív (azaz enzimátikusan nem módosított) cefotaxim antibiotikum természetes, intakt oldatában is több formában van jelen egyszerre. Egyszeres Na⁺ ionos, kétszeres Na⁺ ionos, spontán deacetylálódott és ezek kombinációs formáik léteznek a natív vizes oldatban természetes módon is. Ezen természetes formák mindegyike szépen kirajzolódik a mérésben is (396, 426, 456, 478, 500 m/z (Da)), a víz kis intenzitású kontamináns peakjei és a mátrix dimerje mellett. Más peak ezeken kívül nem látható, azaz a negatív kontroll vizsgálat már ezek alapján itt validnak is tekinthető. A validitáshoz nagyon lényeges még, hogy ebben a mérésben ne jelenjenek meg az enzimátikus tevékenység révén várt termékek peakjei, ez ebben az esetben így is történt.

A 34. ábra alsó paneljében egy vizsgált baktérium negatív kontrolljának az előzőekkel megegyezően történt mérése látható. Ebben a tesztben csak a baktériumsejtek voltak jelen és a víz, melyből a sejteket lecentrifugálva elszeparáltuk a felülúszót, ez képezi itt a mérés anyagát. Ebből a negatív kontroll mérésből azt kell megtudnunk, hogy van-e olyan anyagcsere melléktermék a felülúszó oldatban, mely zavarhatja az enzimátikus aktivitás vizsgálatokor jelentkező peakek értékelését. Vizsgálataink során ilyen jelentős plusz metabolit anyagot nem tapasztaltunk, ez a típusú negatív kontroll ilyen esetben szintén validnak tekinthető.

15. MALDI-TOF MS mérések cefotaxim antibiotikummal

Kísérleteink kiindulópontjául és egyik legfontosabb céljául a cefotaxim vizsgálatát választottuk. A cefotaxim terápiás jelentősége nagyon nagy, gyors diagnosztikus interpretációja emiatt igen fontos. Alkalmos a széles spektrumú béta-laktamázok aktivitásának vizsgálatára is, specifikus inhibitorokkal történő párhuzamos tesztelése ezen enzimeknek a gyors detektálási lehetőségét is jelentheti.

A cefotaxim intakt, protonált formája 456 Da. Egy illetve két nátrium ionnal képzett ionos formái 478 Da és 500 Da molekulatömegűek (egy nátrium atom 23 Da; $456-1+23=478$; $478-2+46=500$). A molekula intakt formája mellett spontán kialakul deacetilált forma is, ennek molekulatömege 396 Da (deacetiláció: -60 Da). (Minden natív vizsgálatban jelen volt egy 426 Da-os molekula is, melynek eredetét nem sikerült feltárni.) A cefotaxim enzimátikus módosítása, azaz esetünkben szerin típusú béta-laktamáz enzim révén történő hidrolízise több módosított terméket is eredményez amiatt, hogy a natív cefotaxim oldatban a spontán deacetilált és az egyszeres és többszörös nátrium ionos formái is mind jelen vannak természetes módon is (hidrolízis esetén +18 Da a molekulatömeg változás). Az ezekből a formákból kialakuló termékek méretei 370 Da, 414 Da és 461 Da. Cefotaxim esetében tehát a következő marker peakeket kell keresnünk a spektrumokon is: Natív formák: 396, 426, 456, 478, 500 Da; Enzimátikusan módosított formák: 370, 414, 461 Da (35. ábra).



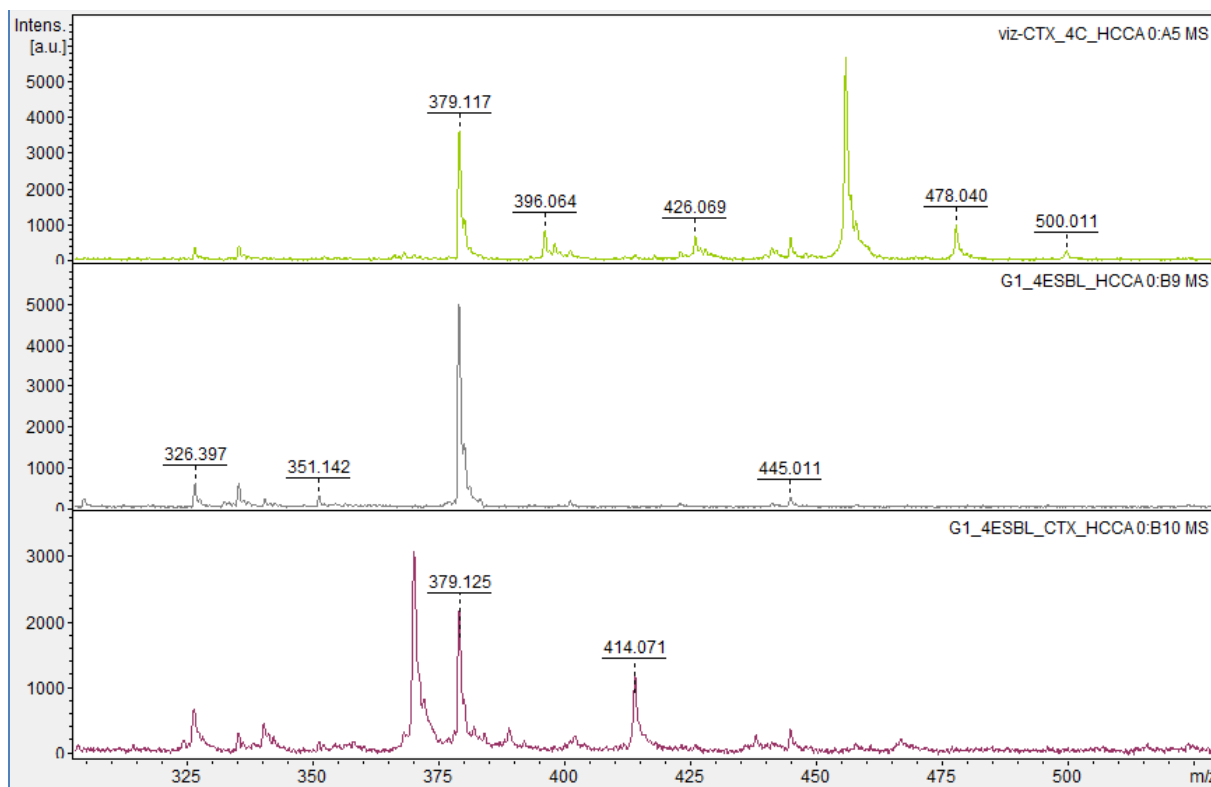
cefotaxim Na⁺ (C₁₆H₁₆N₅NaO₇S₂, 477,45 Da)

intakt formák	396 Da [M-Ac+H] ⁺	426 Da []	456 Da [M+H] ⁺	478 Da [M+Na] ⁺	500 Da [M+2Na] ⁺
módosult formák	hidrolízis		spontán deacetiláció		hidrolízis és spontán deacetiláció
	414 Da [M _{hidr} -Ac+H] ⁺		396 Da [M-Ac+H] ⁺		461 Da [M _{hidr} -Ac+2Na] ⁺
	spontán dekarboxiláció				
	370 Da [M _{hidr} -Ac-COO+H] ⁺				

35. ábra

Cefotaxim natív (zöld), spontán módosult (zöld) és enzimátikusan módosított (piros) formái.

A cefotaxim eredeti formáit és enzimátikusan bontott formáit tehát ismert és kikövetkeztethető molekulatömegeik alapján meg tudjuk különböztetni egy m/z tömegspektrogramon is. Ideális esetben (bizonyos szakirodalmi adatok szerint [120]) a natív antibiotikum formáit jelző marker peakek intenzitásának jelentősen le kell csökkennie, de akár teljesen el is tűnhetnek ezek a peakek a spektrumból, míg az enzimátikus tevékenység révén keletkező termékeket jelző peakeknek meg kell jelenni abból a reakcióból készült spektrumban, amiben béta-laktamáz enzimet termelő baktériumot és antibiotikumot inkubálunk együtt megfelelő körülmények között. A kísérlet eredményeit a 36. ábra szemlélteti:



36. ábra

Első eredményeink a cefotaxim enzimatis bontásának vizsgálatával MALDI-TOF MS spektrumokon.

Felső panel: csak a natív cefotaxim (0,5 mg/ml) és víz+mátrix;

Középső panel: csak vizet és baktériumsejteket tartalmazó szuszpenzió felülúszója;

Alsó panel: cefotaxim és baktérium reakcióelegyének felülúszója.

Ebben a vizsgálatunkban azt láthatjuk, hogy a cefotaxim natív formájában tartalmazza a szükséges peakeket: ezek a 396, 426, 456, 478, 500 Da molekulatömegű formák peakjei. 379 m/z értéknél természetesen most is jelen van a mátrix dimer (felső panel). Az önmagában csak a baktériumot tartalmazó elegy felülúszója szinte csak a mátrix dimer jelét adja, illetve a vízben található néhány kis intenzitású kontamináns peaket (335, 401, 445) (középső panel).

Ha viszont az antibiotikum és az azt módosítani képes bakteriális enzimaktivitás együtt kerül inkubálásra (36. ábra, alsó panel), akkor létrejöhet a várva várt eredmény: a cefotaxim natív formái gyakorlatilag eltűnnek a spektrumból, helyettük két markáns peak jelenik meg: a 370 és a 414 Da molekulatömegű termékek peakjei (a 370 m/z értékű peaket jelző felirat nem látszik a spektrumon, mert a legmagasabb peakre általában sajnos nem tudunk feliratot írattni a szoftverrel, de a csúcs közepe a keresett értéken van, ábrán megtekintve pedig az x tengely skálája alapján könnyen beazonosítható). Ez a két termék a deacetylálódott cefotaxim molekula hidrolizált formája (414 Da) és az ebből továbbalakuló, spontán dekarboxiláción átesett forma (370 Da).

Az eredmények tehát önmagukért beszélnek, a vizsgált baktérium igazoltan rendelkezik olyan enzimmel, mely képes a cefotaxim antibiotikumot módosítani, és ez a módosítás a béta-laktám gyűrű hidrolízise, majd látható a hidrolizált intermedier köztitermék

spontán dekarboxilációja a keletkezett termékek alapján, azaz ez a baktérium biztosan rezisztens cefotaximra, az eredmény így interpretálható.

Ebben az esetben az inkubáció 3 óra volt 36°C-on, a kísérlet összeállításával és a MALDI-TOF MS méréssel, és egy gyors, már rutinos értékeléssel együtt a folyamat körülbelül 4 órányi munkaidőt vett igénybe. Reakciót optimalizáló következő kísérletünkből kiderült, hogy a fent vizsgált baktérium ugyanezt a reakciót már 30 perces inkubáció után is produkálta (de a natív formák teljes eltűnése csak 60 perces inkubáció után volt teljes), azaz ideális körülmények között körülbelül másfél óra alatt megszülethet egy ilyen típusú eredmény egy primo kultúrában kitenyészett baktériumtelepből, ha rendelkezésre és készen állnak anyagok és eszközök a vizsgálat lefolytatásához. Sajnos azonban, mivel nem minden enzim dolgozik „egyforma gyorsan”, azaz hasonlóan nagy aktivitással, és mivel a vizsgálat kezdetén elvileg nem tudjuk, hogy milyen enzimet tartalmaz az adott kórokozó, ezért ennél hosszabb reakció ajánlott általánosságban (2-3 óra), hogy a kisebb aktivitású enzimek lassabb folyamatai ne hozzanak negatív eredményeket.

A vizsgálatok optimalizálását ugyanezzel a folyamattal végeztük el úgy, hogy a különböző paraméter értékeket fokozatosan, lépcsőzetesen eltoltuk a várt optimumtól mindkét irányban több párhuzamosban és duplikált mérésekben. Ezek a vizsgált paraméterek az inkubációs idő, az inkubációs hőmérséklet, az antibiotikum koncentráció, és a reakcióelegy térfogata voltak. Az optimalizálás révén el tudtunk készíteni egy olyan szilárd protokollt, mellyel nagy hatékonysággal tudunk szűrővizsgálatszerűen, nagy mennyiségű baktériumot vizsgálni az ilyen típusú reakciókban.

Az optimalizálás értékelése során problematikus volt kvantitatív értékekkel összeegyeztetni az eredményeket, mert a peakek intenzitása sok esetben nem korrelál a reakció hatékonyságával (és ez igaz a mindig egyenlő mennyiségben jelenlévő mátrix dimer 379 m/z értékű peakjére is!), sokkal inkább a műszeres mérés aktuális minőségével, amely a legprecízebb kísérletek során is néha váratlanul jobb vagy kis mértékben rosszabb lett. Emiatt nem a peakek intenzitásának vagy AUC értékének eredményeit vettük figyelembe, hanem a peakek egyértelműségét, rutin vizsgálatokban való könnyű felismerhetőségét értékeltük és rendeltük hozzá egy egyszerű számsorhoz:

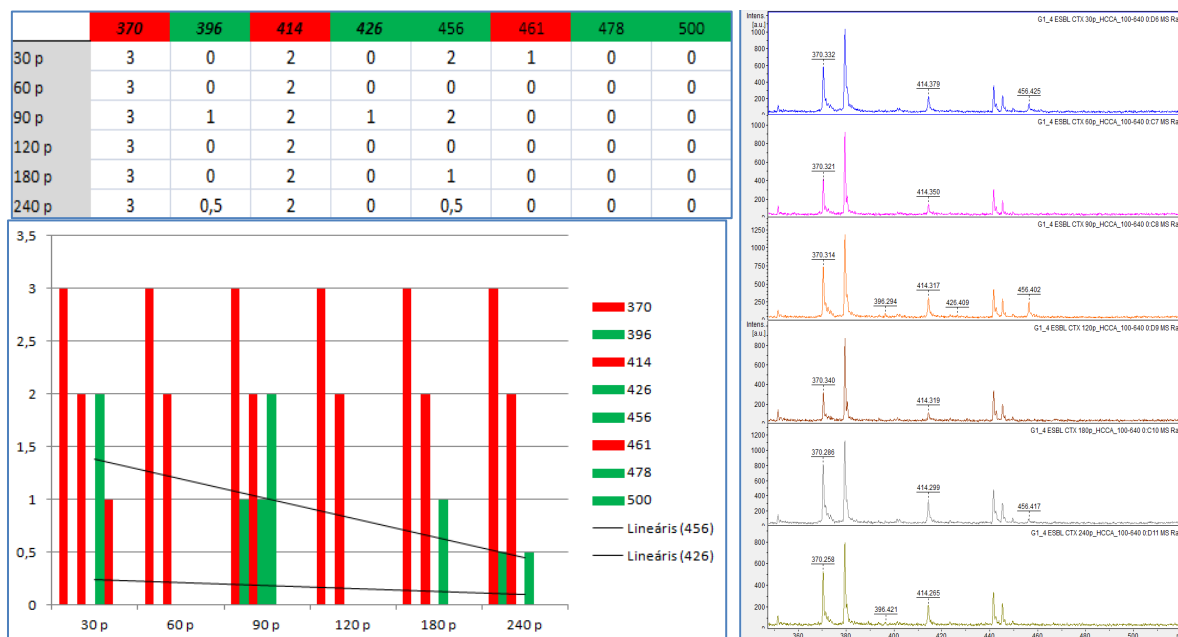
nincs peak: 0

nagyon kis intenzitással, de van peak: 1

egyértelmű peak: 2

kimagasló intenzitású és egyértelmű peak: 3.

Az optimalizálási folyamatokat minden esetben duplikált mérésekkel végeztük el a mérési bizonytalanságok kiküszöbölése okán, az így kapott score értékek emiatt tovább finomodtak. Ezek alapján készítettük el az alábbi optimalizálási grafikonokat az elsőként vizsgált izolátum (G1/4 *E. coli*) és a cefotaxim reakcióról (37. ábra) (grafikonokhoz kapcsolódó eredeti spektrogramok a 3. Függelékben is láthatók).



37. ábra

G1/4 *E. coli* és cefotaxim időfüggésének optimalizálása (36°C, 20 µl térfogat, 0,5 mg/ml cefotaxim)

Az időfüggést vizsgáló optimalizáló vizsgálatból látható, hogy ez az izolátum már 30 perc inkubációs idő után is megfelelő eredményeket tud mutatni, bár ebben a duplikált reakcióban még jelen vannak natív antibiotikum formák is. A 90 perc inkubációs idejű mintákban szintén jelen vannak, sőt még többféle natív forma is látható és még nagyobb intenzitással, ezért véleményünk szerint a 60 perces mintákban ezek hiánya az, ami a kísérletben hibaként felmerülhet, vagyis inkább ennek eredménye kérdőjelezhető meg, nem pedig a másik kettőé. A két legtöbbször előforduló natív forma (426 és 456 m/z) megjelenéséről és relatív intenzitásáról készült trendvonalak alapján egyértelmű lassú fogyás állapítható meg a natív formákat tekintve az egyre hosszabb inkubációs időkkel párhuzamosan.

Érdekes jelenség a 461 m/z értékű peak hiánya és a 30 perces mérésben mégis felbukkanó, kis intenzitású jelenléte (amely egyébként a kétszeres Na^+ ionos forma deacetilálódott és hidrolizált formája). Felmerülhet, hogy ez valószínűleg nem egy stabil intermedier és ezért nem mutatható ki a mérések során. Dekarboxilációja esetén -44 Da volna az elvárt változás, de $461-44=417 \text{ m/z}$ értéknél egyik vizsgálatban sem találtunk peaket. (A 441 és 445 m/z értékeknél megjelenő peakek a tiszta víz spektrumában is megtalálhatók.) Az is elképzelhető (és ezt későbbi vizsgálataink során sikerült is alátámasztani, hogy a különböző enzimeknek a különböző formákhoz különböző mértékben van affinitása, azaz némely enzimtípus egyes natív formákat tud hidrolizálni, másokat nem tud, vagy csak kisebb affinitással (lásd: karbapenemázzal folytatott későbbi kísérleteink).

Mivel a 90 perces és ez alatti inkubációs idejű mérésekben még több natív forma is jelen volt viszonylag nagy intenzitással és mivel egy vizsgálat elindításakor normál esetben még nem ismerjük, hogy milyen enzimtípust fogunk a mérések révén detektálni, ezért annak

ellenére, hogy a G1/4 *E. coli* izolátum egyértelmű béta-laktamáz aktivitást tud mutatni már 30 perces inkubáció után is, a megfelelő inkubációs időnek a 120 percet állapítottuk meg.

A reakció hőmérsékleti függését (38. ábra, 4. Függelék) ugyanilyen módszerrel, duplikátumokban, 4-, 25-, 30-, 36- és 40°C inkubálási hőmérsékleteken vizsgáltuk standard egyéb körülmények mellett. Az értékelési mód itt is az előző score-rendszeren alapult.



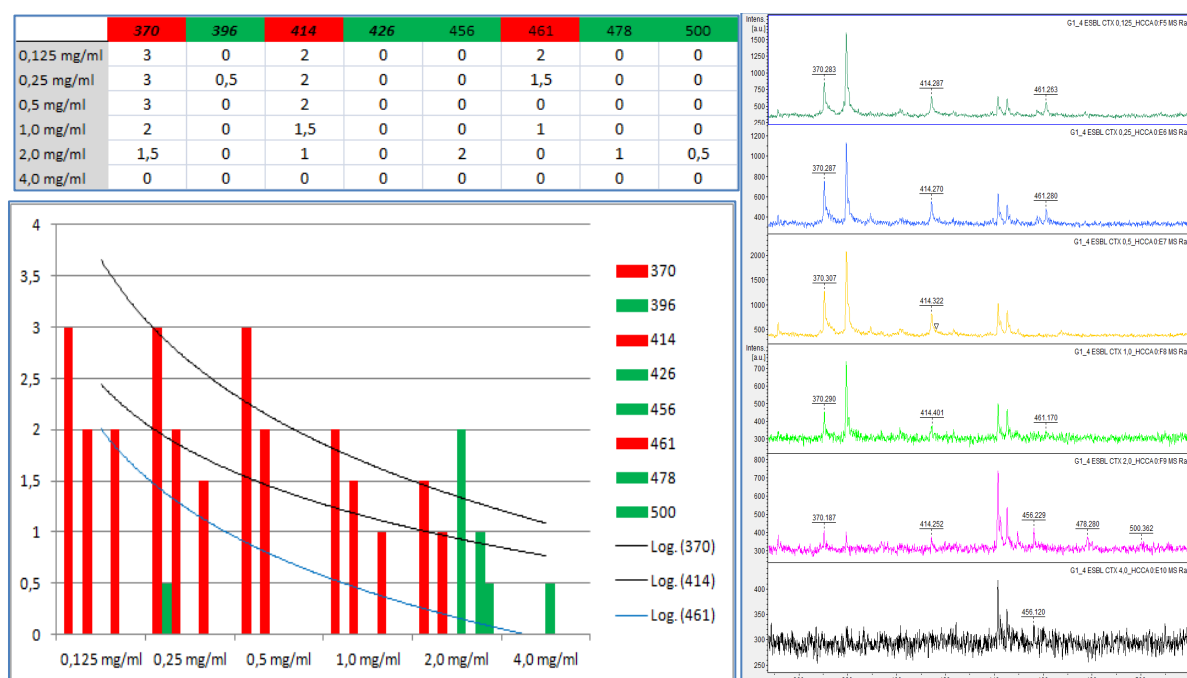
38. ábra

G1/4 *E. coli* és cefotaxim hőmérsékleti függésének optimalizálása (20 µl, 05 mg/ml cefotaxim, 120 perc)

A megfelelő hőmérséklet megállapítása viszonylag egyszerű feladat volt, az eredmények a vártakkal nagyban meg is egyeztek. A G1/4 *E. coli* törzs a jelek szerint már a 4°C-on 120 percig inkubált mintákban is tudott a mérési eredmények alapján hidrolizált termékeket létrehozni, ezt viszont mi inkább annak tudjuk be, hogy a kísérlet összeállításakor körülbelül negyed órán át szobahőmérsékleten voltak ezek a minták is, illetve a reakcióelegyek lecentrifugálása, majd a felülúszók kipipettázása után a 2 µl-es cseppek beszáradásig szintén szobahőn voltak körülbelül 10-15 percet. A végig 25°C-on inkubált minták eredményei alapján jól látható, hogy már szobahőmérsékleten is van ennek a törzsnek béta-laktamáz enzimaktivitása, de ugyanúgy, ahogy a 30°C-os minták esetében, itt is jelentős még a natív formák jelenléte is (396, 426, 456, 478, 500 m/z), vagyis ezek nem optimális körülmények. 36°C-on viszont az eredmények egyértelműek: a natív formák teljes eltűnése mellett nagyon nagy intenzitással jelennek meg a hidrolizált formák és azok módosulatai (370, 414 m/z). A 40°C-on inkubált mintáknál több natív peak is jelen volt és látható ugyan enzimaktivitás, ennek mértéke jóval elmarad a 25-36°C-ig vizsgált mintákéihoz képest. Ezek alapján a hőmérsékleti optimumot 36°C-ban állapítottuk meg.

Ismét érdekes jelenség figyelhető meg a hőmérsékleti optimalizálás során felvett spektrumokon a 461 Da tömegű hidrolizált termékkel kapcsolatban: csak a 4°C-on és a 40°C-on inkubált mintákban volt kimutatható ez a béta-laktamáz aktivitás következtében kialakuló termék $[M_{\text{hidr}}\text{-Ac}+2\text{Na}]^+$. 40°C-on nagyon alacsony, 4°C-on viszonylag nagyobb intenzitással. Ennek okai nem ismertek, feltételezésünk szerint a béta-laktamáz aktivitáson túl, más enzimtevékenységek is történhetnek egy ilyen reakcióegyben, azaz további bontása is elképzelhető ennek a terméknek, ami a 4°C-os inkubálás alatt egyáltalán, a 40°C-os inkubálás alatt pedig csak kisebb mértékben tudott megvalósulni.

A következő optimalizálási lépés a cefotaxim antibiotikum legmegfelelőbb koncentrációjának beállítása. 0,125 mg/ml-től 4 mg/ml koncentrációig vizsgáltuk standard egyéb körülmények között a reakciókat (120 perc, 36°C, 20 µl). Az értékelési mód itt is az előzőekben már használt score-rendszer volt (39. ábra, 5. Függelék).



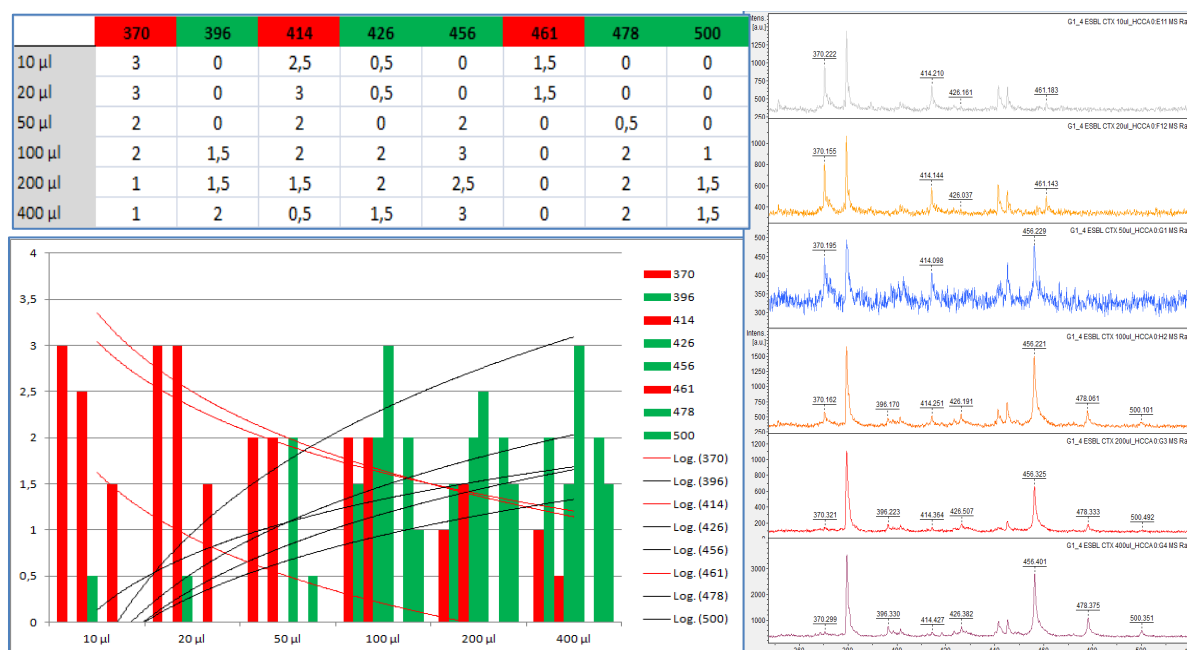
39. ábra

G1/4 *E. coli* és változó cefotaxim koncentrációk optimalizálása (20 µl, 36°C, 120 perc)

A szakirodalmi ajánlás [120] 0,5 mg/ml cefotaxim értéket állapít meg optimumként. Vizsgálataink alapján nem feltétlenül ez a legmegfelelőbb cefotaxim koncentráció, mert mint az a 39. ábrán is jól látható az ennél alacsonyabb koncentrációkon is tökéletesen eredményes és egyértelműen értékelhető eredmények születnek. Igaz ugyan, hogy a 0,25 mg/ml értéknél vizsgált duplikált mérések egyikénél kimutatható volt egy natív forma kis intenzitású peakje is (396 m/z), de ettől függetlenül, általánosságban, a peakek intenzitása, értékelhetősége 0,125 és 0,25 mg/ml értéknél ugyanolyan jó, ráadásul a korábban már vitatott okok miatt „előkerülő” 461 Da-os enzimatikusan hidrolizált termék ezeknél a kisebb koncentrációtartományoknál jelen van és egyértelmű jeleket mutat, a koncentráció növekedésével fokozatosan csökken a mérhetősége (kék trendvonal a 39. ábrán). Ezek alapján

ismét arra a megállapításra jutunk, hogy valószínűleg egyéb enzimevények révén ennek a terméknek a mennyisége az inkubáció során csökkenhet. A két másik marker termék (370 és 414 Da) minden esetben jelen van, értelmezhetőségük a koncentráció emelkedésével szintén folyamatosan csökken (fekete trendvonalak). 2 mg/ml koncentrációnál már megjelennek a natív formák jelei is, csökkent mértékben ugyan, de láthatóak a módosított formák nyomai is, itt valószínűleg már olyan magas koncentrációt ér el az antibiotikum, hogy annak hatását még ez a rezisztens baktérium sem tudja kivédeni. 2 mg/ml értéknél is látható, hogy a mátrix dimer (379 m/z) értéke is jelentősen lecsökkent, 4 mg/ml értéknél pedig a mérést már nem csak zavarja a túl magas antibiotikum koncentráció, de szinte meg is hiúsítja azt. Mindezek alapján a legmegfelelőbb cefotaxim koncentrációnak a 0,25 mg/ml értéket gondoljuk.

A legegyszerűbbnek tűnő optimalizáló lépés a megfelelő reakcióterfogat megkeresése. Előzetes vizsgálataink kiválóan működtek a legtöbb publikációban leírt 20 µl térfogatban, de vannak közlemények, melyek ettől eltérő térfogatokat használnak [118, 120, 125, 126, 127]. Mi 10-, 20-, 50-, 100-, 200- és 400 µl reakció térfogatokat teszteltünk (40. ábra, 6. Függelék).



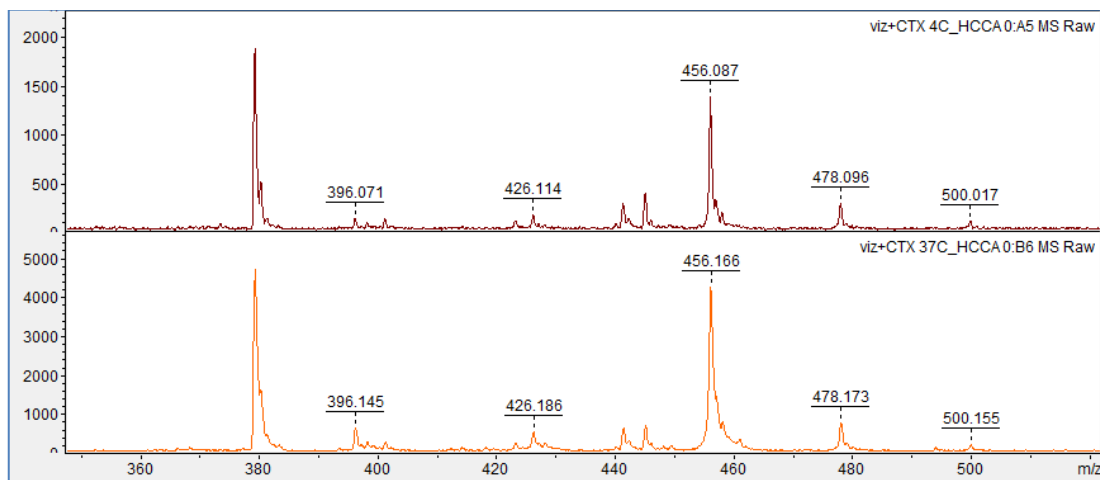
40. ábra

G1/4 *E. coli* változó reakció térfogatok optimalizáló vizsgálataiban (36°C, 120 perc, 0,5 mg/ml cefotaxim) Ezt a tesztet még a szakirodalmi ajánlásban lévő standard 0,5 mg/ml cefotaxim koncentrációval végeztük el.

A növekvő térfogatokkal látványosan nő a natív formák mennyisége (fekete trendvonalak) és ugyanígy csökken az enzimatikusan módosítottaké (piros trendvonalak). Az általunk ismert szakirodalmi publikációk 10-től 50 µl-es reakció térfogatokról számolnak be, ennek oka a mi kísérletünk eredményei alapján is jól látható. A 10 és 20 µl-es térfogatok eredményei nem sok különbséget mutatnak, a 20 µl-es térfogattal való munka (centrifugálás utáni 2 µl lepipettázása tisztán a sejttöledék fölül) jóval egyszerűbb. 50 µl-nél már csökkennek a módosított termékek peakjeinek intenzitásai és ezzel együtt egyre több és intenzívebb natív forma révén keletkező jel látható, ez a trend egészen a maximális 400 µl-ig folytatódik.

Ezeknél a nagy térfogatoknál már nehézkes arányosan növelni a bevitt baktérium inokulum mennyiségét is, ezért ezek a nagyon nagy reakció térfogatok már nem is reálisak ilyen vizsgálatokban, hiszen gyakran előfordul, hogy csak egy-két kitenyészett, apró, valóban csak mákszemnyi méretű baktériumtelepből lehet csak mintát prezentálni a teszthez. Mindezek miatt továbbra is a 20 µl-es reakció térfogatot fogadjuk el optimálisként a vizsgálatokhoz.

Az optimalizálás után, következő lépésként azt teszteltük, hogy előfordulhat-e, hogy a felhasznált cefotaxim antibiotikum nem csak enzimatis aktivitás, hanem hő hatására is elbomlik és ad esetleg fals pozitív eredményeket. Ennek kivitelezésére natív cefotaxim antibiotikum oldatot inkubáltunk az enzimatis reakciónál optimális 36°C-on 180 percig (41. ábra).

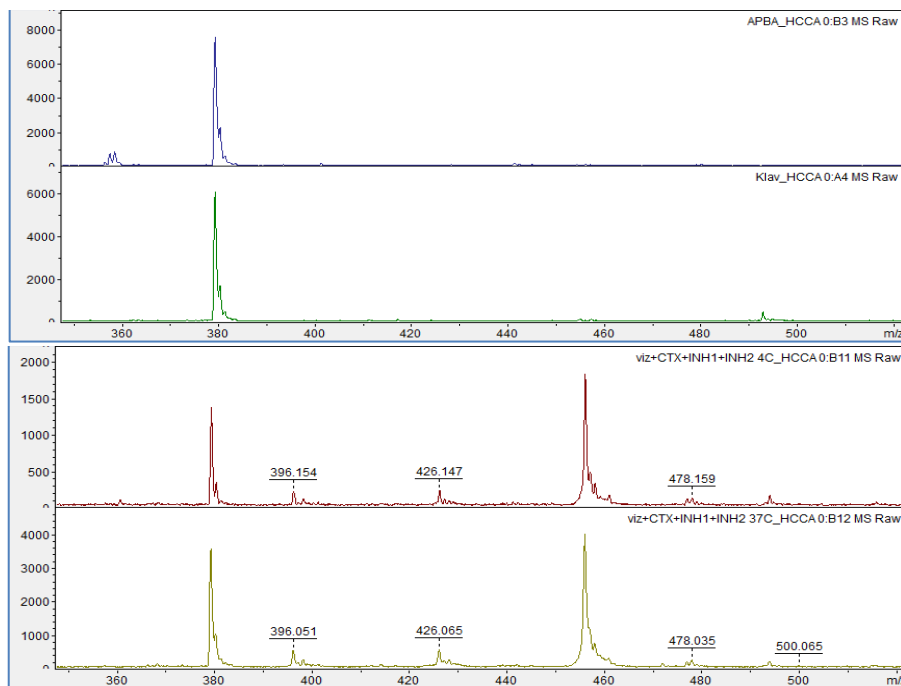


41. ábra

Tiszta cefotaxim (0,5 mg/ml) 4°C-on és 36°C-on inkubálva 180 percig.

A tiszta cefotaxim 36°C-on történő inkubálása során gyakorlatilag semmilyen változást nem mutatott a 4°C-on inkubált mintához képest, ezért kijelenthető, hogy a cefotaximnak nincs jelentős spontán bomlása hosszú inkubációs idő után sem. Ugyanazok a natív formákhoz tartozó peakek láthatók mindegyik mérésben.

Emellett leteszteltünk két olyan, a későbbiekben felhasználásra kerülő molekulát is (klavulánsav és APBA), melyek majd a reakcióelegyekbe kerülnek más témájú vizsgálatok során, de még nem tudtuk (illetve inkább csak ki kellett zárunk ennek lehetőségét), hogy ezek a cefotaxim bármelyik formájával valamilyen nem biológiai folyamat révén reagálnak-e, esetleg lesznek-e módosulások láthatók a natív cefotaxim spektrumához képest (42. ábra). A klavulánsav 199, az APBA (3-aminofenil-borát) pedig 155 Da tömegű molekulák, vagyis ebben a mérési tartományban (~300-600 m/z) nem is látszódnak ezektől az anyagoktól származó jelek. Ha nincsenek nem biológiai reakciókból származó jelek ezekben az inkubációkban (szintén 4°C-on és 36°C-on 180 percig), akkor a két anyag biztonsággal használható a továbbiakban.



42. ábra

Felső panel: tiszta APBA (3-aminofenil-borát) (0,3 mg/ml) és tiszta klavulánsav (0,05 mg/ml) oldatai.

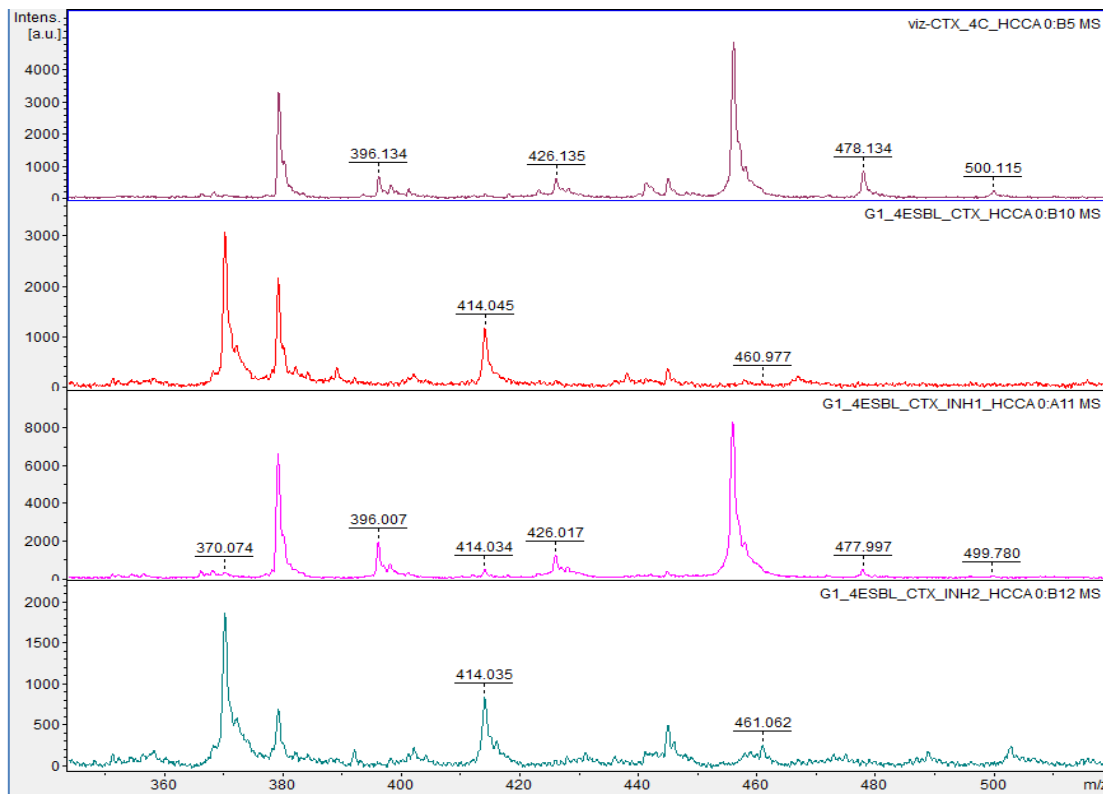
Alsó panel: cefotaxim (0,5 mg/ml) + APBA (0,3 mg/ml) + klavulánsav (0,05 mg/ml), 4°C és 36°C, 180 perc.

Mint az az ábrán látható, sem az APBA, sem a klavulánsav nem képez önállóan olyan pikeket a mérési tartományunkban, melyek zavarnák a reakciók értékelését. Cefotaximmal történt együttes inkubációjuk során szintén nem történt változás a cefotaxim natív formáinak legtöbbszörében. Egy kivétel volt ez alól: az 500 m/z jelű natív forma csak nagyon minimális jelként volt detektálható mindkét párhuzamosnál, de ez a peak már az eddigi mérések során is mindig csak nagyon alacsony intenzitással volt detektálható. Bomlás vagy egyéb, nem biológiai reakció nem történt a hosszú, 180 perces inkubálások során, sem 4°C-on, sem 36°C-on.

Az APBA és a klavulánsav enziminhibitor molekulák. Inhibitor (azaz gátló) aktivitásukat specifikusan, bizonyos béta-laktamáz enzimek ellen képesek kifejteni. Ennek jelentősége abban áll, hogy ha egy enzimátikus reakciót egy enzimspecifikus inhibitorral gátolni tudunk és emiatt elmarad a reakció, akkor bizonyítottan vehetjük, hogy az adott inhibitor molekula által specifikusan gátolható enzim van jelen a vizsgálati anyagunkban (baktériumunkban). Klavulánsavval az Ambler-féle Class A szerin típusú béta-laktamázok (pl. ESBL-ek) gátolhatók specifikusan, az APBA pedig az AmpC típusú béta-laktamáz enzimek specifikus inhibitora. Ha tehát egy reakciópárt vizsgálunk és az egyik reakcióban csak az enzim és antibiotikum szubsztrátja van, a másik reakcióban ugyanezek, plusz a specifikus inhibitor, akkor ha csak az elsőből kapunk a fentiekben ismertetett, enzimátikusan módosított, hidrolizált termékeket, a másodikból pedig nem, akkor biztosan tudhatjuk, hogy az a bizonyos enzim működik a vizsgált baktériumban, aminek specifikus inhibitora meggátolta a második párhuzamosban a reakció lezajlását. Ha az adott baktériumról nem tudjuk, hogy ESBL- vagy AmpC-termelő-e, akkor három párhuzamos reakciót indítva ez elméletileg kideríthető. Következő kísérleteinkben ezeket a lehetőségeket jártuk körül.

Az első kísérletet a már használt és láthatóan masszív béta-laktamáz aktivitással rendelkező, cefotaximra már bizonyítottan rezisztens G1/4 *E. coli* törzssel végeztük el. A reakciók összeállítása eddigi munkaprotokollunk alapján történt: a baktérium 24 órás tenyészetéből vett minta 0,5 mg/ml cefotaxim oldatban történő inkubálása 36°C-on 180 percig. (A paramétereket itt még megtartottuk az irodalmi adatoknak megfelelően.) A négy párhuzamos ugyanazon körülmények között (+ a kötelező negatív kontrollok!):

1. 0,5 mg/ml cefotaxim
2. *E. coli* + 0,5 mg/ml cefotaxim
3. *E. coli* + 0,5 mg/ml cefotaxim + 0,05 mg/ml klavulánsav
4. *E. coli* + 0,5 mg/ml cefotaxim + 0,3 mg/ml APBA



43. ábra

G1/4 *E. coli* + cefotaxim és inhibitorokkal végzett kísérletek spektrumai.

A 43. ábrán látható panelek közül a legfelső a tiszta cefotaxim, alatta a baktérium + cefotaxim reakció, alatta a baktérium + cefotaxim + klavulánsav, legalul pedig a baktérium + cefotaxim + APBA látható. Az eredmények táblázatban talán szemléletesebben összefoglalhatók:

	370	396	414	426	456	461	478	500
tiszta CTX	-	+	-	+	+	-	+	+/-
G1/4 + CTX	+	-	+	-	-	+/-	-	-
G1/4 + CTX + klav	+/-	+	+/-	+	+	-	+	+/-
G1/4 + CTX + APBA	+	-	+	-	-	+	-	-

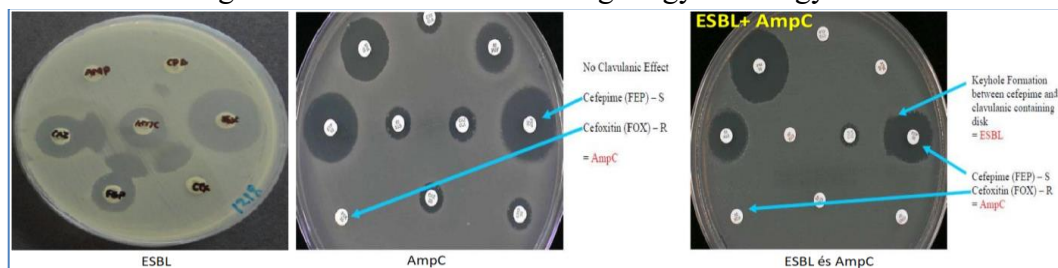
7. táblázat

G1/4 *E. coli* reakciói inhibitorok jelenlétében.

A baktériumtörzs a cefotaximmal szemben egyértelmű enzimaktivitást mutat, ha csak a baktérium és a cefotaxim van jelen. Ha a cefotaxim mellett még ESBL-enzimre specifikus inhibitor anyag is van a reakcióban, akkor az enzimaktivitás rendkívül nagy mértékben visszaesik, a natív antibiotikum formák nagy mennyiségben megmaradnak a reakció után is, enzimatis bomlástermékek csak nagyon kis mennyiségben mutathatók ki (370 és 414 m/z). Ha nem az adott enzimre specifikus inhibitor van a rendszerben, akkor az enzim nem gátlódik, a reakció zavartalanul végbemegy.

A vizsgálattal bebizonyítottuk, hogy a G1/4 jelű *Escherichia coli* izolátum cefotaxim rezisztenciájáért ESBL enzim felelős. Mellékadatként megtudtuk, hogy ESBL enzime mellett valószínűleg nem tartalmaz AmpC típusú béta-laktamáz enzimet. Legfőképpen pedig megtudtuk, hogy egy ilyen összeállítású, néhány párhuzamos reakcióból álló teszttel egy izolátumról bizonyító adat nyerhető ESBL enzim termelő képességéről. A reakció itt 3 órás volt, korábbi vizsgálatainkból tudjuk, hogy a G1/4 *E. coli* ennél sokkal kevesebb idő alatt is képes ezeket az eredményeket mutatni ilyen körülmények között, azaz kijelenthető, hogy néhány óra alatt interpretálni tudjuk egy izolátumról a klinikus felé MALDI-TOF MS módszerünkkel, hogy ESBL-termelő-e vagy sem. Az egyetlen cefotaximos és inhibitoros antibiotikum vizsgálatból egyrészt tehát bizonyítottuk, hogy ESBL-termelés interpretálható, másrészt mindez azzal a következménnyel is jár, hogy szintén interpretálható, hogy ez ellen a baktérium ellen nem használhatók sem az egyszerűbb penicillinszármazékok, sem a béta-laktamázgátlóval kombinált aminopenicillinek (pl. Augmentin), sem cefalosporinok, sem pedig monobactam antibiotikumok (pl. aztreonam). 1 antibiotikum méréséből körülbelül 10-15 egyéb antibiotikum interpretálása válik lehetővé ebben az esetben. Nagy valószínűséggel karbapenemek alkalmasak lennének a terápia során, mert más enzimtevékenység nem látszik a vizsgálatokból, de ezt még biztosan kijelenteni nem lehet, mert ennek megerősítéséhez vagy kizárásához az eddigi tesztek mellett még egy párhuzamos reakció is szükséges (lásd később).

ESBL és AmpC enzimtermelő izolátumok között különbségek állapíthatók meg a hagyományos antibiogramon látható *in vitro* eredmények alapján is (a nem mindig egyértelmű kulcslyuk fenotípuson kívül), pl.: AmpC: cefepim-É, cefoxitin-R; ESBL: cefepim-R, cefoxitin-É, de ezek az antibiotikum korongok nem képezik az alapvetően vizsgálandó panel részét *Enterobacteriaceae*-nél, vagyis egy újabb antibiogram készítendő emiatt és ha a fenti fenotípusos jegyek (44. ábra) nem láthatóak egyértelműen, akkor kétséget kizáróan még ezek ismeretében sem tudható, hogy milyen béta-laktamáz enzim van jelen (ezeken kívül még egyéb enzim is lehetséges és akár többféle is lehetséges egyszerre ugyanazon baktériumban!).



44. ábra

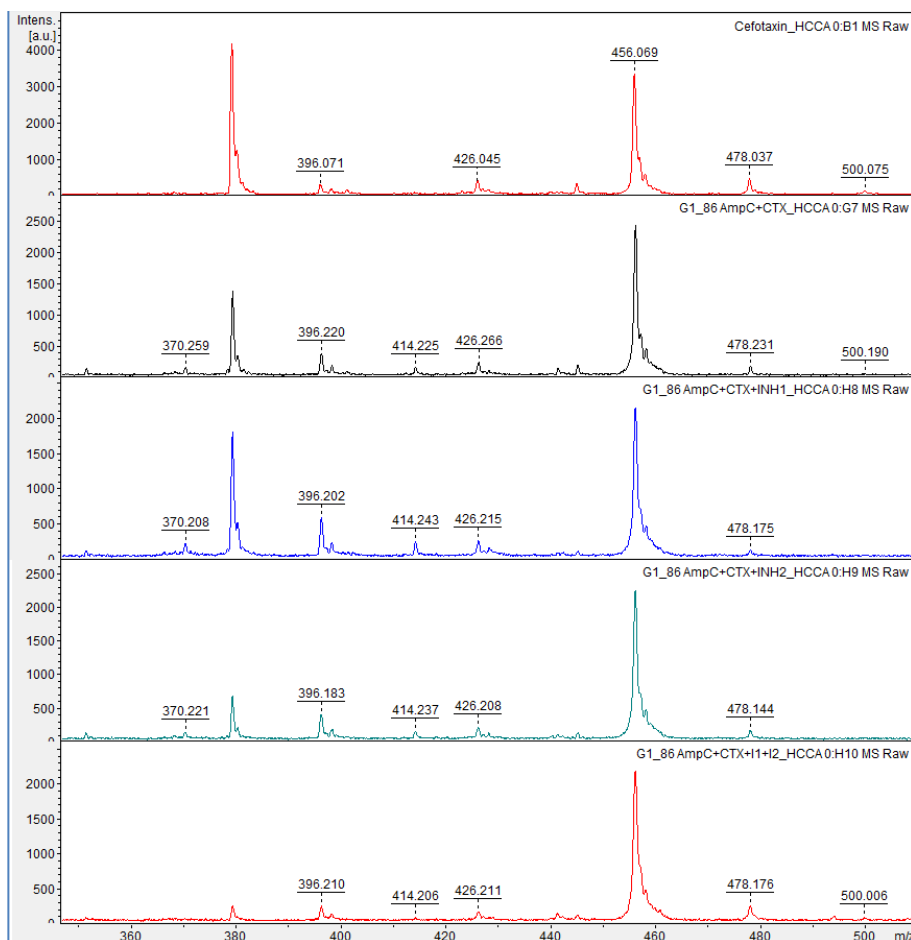
ESBL-termelő [128]: cefepim R, cefoxitin É, ceftazidim R, klavulánsav felé kulcslyuk fenotípus.

AmpC-termelő [129]: cefepim É, cefoxitin R.

ESBL- és AmpC-termelő [130]: cefepim É, cefoxitin R, klavulánsav felé kulcslyuk fenotípus.

Az AmpC-termelés kimutatását az ESBL-termelés kimutatásához hasonló módszerrel próbáltuk meg elvégezni. Korábbi vizsgálatainkból ismert volt, hogy a G1/86 jelű *Enterobacter asburiae* klinikai izolátumunk AmpC termelő (lásd 14. oldal: 11. ábra). A párhuzamos MALDI-TOF MS vizsgálatokat itt is az előző paraméterekkel és inhibitorokkal végeztük el egy olyan kiegészítéssel, hogy egy plusz reakcióban mind a két inhibitor is jelen volt egyszerre:

1. 0,5 mg/ml cefotaxim
2. *E. asburiae* + 0,5 mg/ml cefotaxim
3. *E. asburiae* + 0,5 mg/ml cefotaxim + 0,05 mg/ml klavulánsav
4. *E. asburiae* + 0,5 mg/ml cefotaxim + 0,3 mg/ml APBA
5. *E. asburiae* + 0,5 mg/ml cefotaxim + 0,05 mg/ml klavulánsav + 0,3 mg/ml APBA



45. ábra

G1/86 *Enterobacter asburiae* AmpC-termelésének vizsgálata inhibitorokkal.

	370	396	414	426	456	461	478	500
tiszta CTX	-	+	-	+	+	-	+	+/-
G1/86+CTX	+/-	+	+	+	+	-	+	+/-
G1/86+CTX+klav	+	+	+	+	+	-	+	-
G1/86+CTX+APBA	+/-	+	+	+	+	-	+	-
G1/86+CTX+klav+APBA	-	+	+/-	+	+	+/-	+	+/-

8. táblázat

G1/86 *Enterobacter asburiae* AmpC-termelésének vizsgálata inhibitorokkal.

A 45. ábrán és 8. táblázatban látható eredmények alapján nem tudtuk egyértelműen eldönteni, hogy ezzel a metodikával az AmpC-termelés kimutatható volna. Az izolátum láthatóan rendelkezik béta-laktamáz enzimmal, mellyel a cefotaximot hidrolizálni képes, de (ilyen körülmények között a G1/4 ESBL-termelő *E. coli* enzimaktivitásához képest jóval szerényebb hatásfokkal) a hidrolitikus termékek jeleinek intenzitása nagyon alacsony, a natív termékeké pedig nagyon magas. A hidrolitikus termékek mindegyik, inhibitorral gátolt reakcióban megjelentek, tehát elméletileg nem ESBL és nem AmpC enzimtermelő törzssel van dolgunk, de az előzetes vizsgálatok alapján mégis AmpC-termelőnek kellene lennie (D68C teszt: 11. ábra/3. kép). A klavulánsavval végzett reakcióban kissé emelkedettebb és egyértelműbb eredményeket látunk a hidrolitikus aktivitás nyomait illetően. Ezt magyarázhatja az, hogy az AmpC típusú enzimeket a klavulánsav nem gátolja, hanem éppen ellenkezőleg, kis mértékben indukálhatja is termelődésüket. Ez azonban itt csak közvetett és nem is elégséges bizonyíték az AmpC termelés igazolásához.

Érdekes jelenség még a kísérletben a mindkét inhibitorral tartalmazó reakció: mindegyik hidrolitikus termék jele még az eddigi szinthez képest is jelentősen visszaesett, viszont megjelent a spektrumon az eddig itt nem tapasztalt (és más reakciókban is egyelőre szabálytalanul megjelenő) 461 Da-os enzimatikusan módosított cefotaxim termék. A 461 Da-os termék kialakulásával kapcsolatban elképzelhető, hogy kisebb affinitással rendelkeznek a némely béta-laktamázok az 500 Da-os natív forma spontán deacetilálódott formájához és ezért jelenik meg főleg olyankor a 461 m/z termék, amikor a két másik (379 és 414 m/z) eltűnik vagy jelintenzitása lecsökken.

Az eddigi módszer szerint több törzs screenelő tesztelését végeztük el párhuzamosan, a törzsek között ismert és ismeretlen rezisztenciamechanizmusú izolátumok is szerepeltek. Eredményeiket a 9. táblázat szemlélteti, egyes spektrumaik a 7. Függelékben találhatóak meg.

	370	396	414	426	456	461	478	500	
G1/49 + CTX	-	+	-	+	+	-	+	+/-	ATCC 25922 <i>E. coli</i>
G1/49 + CTX + klav	-	+	-	+	+	-	+/-	-	
G1/49 + CTX + APBA	-	+	-	+	+	-	+	+/-	
G1/28 + CTX	+	-	+	+/-	-	-	-	-	ESBL <i>E. coli</i>
G1/28 + CTX + klav	+/-	+	+/-	+	+	-	+	-	
G1/28 + CTX + APBA	+	-	+	-	-	-	-	-	
G1/20 + CTX	+	-	+	+/-	-	-	-	-	ESBL <i>E. cloacae</i>
G1/20 + CTX + klav	+/-	+	+	+	+	-	+	+/-	
G1/20 + CTX + APBA	+	-	+	-	-	-	-	-	
G1/7 + CTX	+	-	+	-	-	-	-	-	ESBL <i>E. coli</i>
G1/7 + CTX + klav	-	+	+	+	+	-	+	-	
G1/7 + CTX + APBA	+	-	+	-	-	-	-	-	
G1/54 + CTX	-	+	+	+/-	+	+	+/-	-	MDR <i>C. koseri</i>
G1/54 + CTX + klav	-	+	+	+/-	+	+	+	-	
G1/54 + CTX + APBA	-	+	+/-	+	+	+/-	+	-	
G1/45 + CTX	+	+	+	-	-	+/-	-	-	ESBL+!? <i>P. aeruginosa</i>
G1/45 + CTX + klav	+/-	+	+	-	-	-	-	-	
G1/45 + CTX + APBA	+/-	+	+	-	-	-	-	-	

9. táblázat

Különböző törzsek cefotaxim rezisztencia vizsgálata enziminhibitorok mellett (lásd 7. Függelék).

A 7. Függelékben látható spektrumok eredményeit a 9. táblázatban foglaltuk össze. A tesztek során már ismert rezisztenciamechanizmusú és ismeretlen törzseket is felhasználtunk. Elsőként – az adatai alapján béta-laktamáz enzim negatívként igazolt – ATCC 25922 *E. coli* referenciatörzset vizsgáltuk, garantált negatív kontrollként. Az eredmények ennek megfelelően alakultak: a natív formák jelei voltak csak kimutathatók mindegyik esetben, a baktérium ezek alapján is igazoltan érzékeny cefotaximra. Az eddigi tapasztalataink alapján csak kisebb intenzitású jelekként megjelenő 478 és 500 m/z peakek intenzitásbeli ingadozásán kívül más jelenség nem is volt tapasztalható. Ezek alapján viszont megállapítható, hogy ezek az apróbb intenzitásváltozások az egyébként is alacsony intenzitású peakeknél nem feltétlenül függenek csak a vizsgált baktérium bármilyen aktivitásától, hanem a műszeres detektálás minőségében történő kisebb-nagyobb változásoknak is betudhatók.

Következőként két *Escherichia coli* (G1/28, G1/7) és egy *Enterobacter cloacae* (G1/20), ismert ESBL-termelő törzsek összehasonlítását végeztük el. Mindhárom törzs egyértelműen ESBL-termelőnek bizonyult a kísérletek tanulsága szerint, klavulánsavas inhibíciójuk mindegyiknél szinte teljes volt. A kapott spektrális peak-mintázatok szinte tökéletesen egyformák voltak, még a táblázatos ábrázolásban is szemléletes a hasonlóság mindhármuknál.

A G1/54 *Citrobacter koseri* törzsről előzetes vizsgálataink alapján csak annyit tudtunk, hogy multirezisztens: karbapenemeken, fluorokinolonokon és Sumetrolimonon kívül gyakorlatilag mindenre tökéletesen rezisztens. Izolálásakor az AmpC gyanú merült fel, de ezt a D68C teszttel nem lehetett igazolni: a teszt alapján se ESBL, se AmpC. MALDI-TOF MS vizsgálatunkban látható, hogy jelen van valamilyen béta-laktamáz, mely révén rezisztens cefotaximra, de kimutatni, hogy ezt milyen enzim okozza, ezzel a teszttel sem sikerült, az ESBL-termelés viszont már biztosan kizárható mindezek alapján. A bomlástermékek jelenléte egyértelmű, de jelen vannak a natív formák is, illetve általános jelenség a 370 m/z forma hiánya is, azaz ebben a baktériumban az eddigiektől biztosan eltérő enzimtevékenységek folyhatnak, sajnos azonban ebből a kísérletsorból csak ennyi állapítható meg.

A G1/45 jelű *Pseudomonas aeruginosa* törzsről tudtuk, hogy ESBL-termelő, fenotípusosan (antibiogram) egyértelműen annak volt értékelhető, ez alapján interpretálható is volt széleskörű béta-laktám rezisztenciája. MALDI-TOF MS tesztünkkel viszont az eredmények nem ezt mutatták (7. Függelék, jobb alsó panel): a 414 m/z értékű peak intenzitása bármelyik inhibitor mellett ugyanolyan maradt, a 370 m/z peak pedig gyakorlatilag mindekketben minimálisan észlelhető szintre esett vissza. Ez alapján elvileg ez a baktérium nem ESBL-termelő, de mivel a hagyományos antibiogram fenotípusos jegyei egyértelműek voltak (klavulánsav felé mutató kulcslyuk torzulás), ezért feltételezhetjük, hogy ez a baktérium az ESBL enzimen kívül más, a cefotaxim rezisztenciáért felelős enzim termelésére is képes. Az ismert, hogy a *Pseudomonas*-ok alacsony szintű AmpC-termeléssel rendelkeznek, de az APBA-val végzett kísérletek ezt itt látszólag kizárták (bár az eddigi AmpC mérések általános bizonytalansága miatt, ez erősen vitatható is). Ilyen esetben tehát egy olyan specifikus inhibitor anyag használata volna evidens egy párhuzamos reakcióban, mely azt a bizonyos enzimet is tudja valóban gátolni, de sajnos nem ismerjük, hogy mi is lehet ez a bizonyos másik béta-laktamáz aktivitású enzim, vagyis ilyen helyzetben, amikor

lehet, hogy egyszerre több enzimet is termel a baktérium, a MALDI-TOF MS egyszerűbb néhány inhibitoros vizsgálata sem elegendő minden információ megszerzésére. Ráadásul maga az ESBL-termelés „első ránézésre” még cáfolható is volna a spektrumok alapján, ha nem ismernénk a hagyományos eljárás előzetes eredményeit. Ez alapján azt állapíthatjuk meg, hogy a tömegspektrometriás módszer sem elegendő önmagában ilyen izoltámok megfelelő értékelésére, de a felhasznált inhibitoros párhuzamosok kibővítésével ezt a problémát lehet, hogy feloldhatjuk, vagy legalábbis csökkenthetjük.

Abban a ritka esetben, ha a hagyományos korongdiffúziós és egyéb eredmények (kulcslyuk torzulás, cefoxitin-É, cefepim-R, ceftazidim-R, D68C) nem mutatják egyértelműen vagy egybehangzóan a jellegzetes ESBL fenotípust, ettől függetlenül még mindig fennáll annak lehetősége, hogy ESBL enzimet termel az izoláltum, ilyenkor még egy ún. IRT, azaz inhibitor rezisztens TEM típusú ESBL enzim is lehet az ellentmondás megoldása (Class A 2br) [61, 62, 63]. És ebben a ritka, de valójában nem kizárható esetben még az inhibitorokkal kiegészített MALDI-TOF MS kísérletek sem vezethetnek semmilyen eredményre.

Következő panelként ismét hat baktériumot screeneltünk az előzőekben leírtak szerint:

	370	396	414	426	456	461	478	500	
G1/36 + CTX	+	-	+	-	-	-	-	-	ESBL <i>E. coli</i>
G1/36 + CTX + klav	-	+	+/-	+/-	+	+/-	-	-	
G1/36 + CTX + APBA	+	-	+	-	+/-	+/-	-	-	
G1/38 + CTX	+	-	+	-	-	+/-	-	-	ESBL <i>K. pneumoniae</i>
G1/38 + CTX + klav	+/-	+	+	+	+	+	+/-	-	
G1/38 + CTX + APBA	+	-	+	-	-	+	-	-	
G1/46 + CTX	+	+	+	+	+	-	+	-	ESBL <i>E. cloacae</i>
G1/46 + CTX + klav	+/-	+	+/-	+	+	-	+	-	
G1/46 + CTX + APBA	+	+	+	+	+	-	+	-	
G1/57 + CTX	+	+	+	+/-	+	-	+/-	-	ESBL <i>E. cloacae</i>
G1/57 + CTX + klav	-	+	+/-	+	+	-	+/-	-	
G1/57 + CTX + APBA	+	+	+	+/-	+	-	+/-	-	
G1/101 + CTX	-	+	-	+	+	+	+	-	BLPACR <i>H. parainfluenzae</i>
G1/101 + CTX + klav	-	+	-	+	+	+	+	-	
G1/101 + CTX + APBA	-	+	-	+	+	+	+	-	
G1/84 + CTX	+	+	+	+	+	+	+	-	NDM <i>E. coli</i>
G1/84 + CTX + klav	+	+	+	+	+	+	+	-	
G1/84 + CTX + APBA	+	+	+	+/-	+	+	+/-	-	

10. táblázat

Különböző törzsek cefotaxim rezisztencia vizsgálata enziminhibitorok mellett (lásd 8. Függelék).

Az első négy izolátum ESBL-termelőként került a vizsgálatokba. Az eddigi ESBL-termelő *Enterobacteriaceae* baktériumok spektruma (peak-mintázata) gyakorlatilag nem mutatott említésre méltó különbséget egymáshoz képest. Ugyanebbe a csoportba tartozik az itt vizsgált két első baktérium is (G1/36 *E. coli* és G1/38 *K. pneumoniae*) azzal a különbséggel, hogy a 461 m/z értékű peakek kisebb-nagyobb intenzitással előfordulnak a

hidrolitikus termékek között. Ez különösen a G1/38 *K. pneumoniae* törzsre igaz, amelynél a csak cefotaximot tartalmazó reakcióelegyben, illetve a cefotaximot és ESBL enzimére nem specifikus gátlószert tartalmazott, ezeknél ez a 461 Da-os termék már határozottan jól detektálható volt, ami ismét arra utalhat, hogy enzim és enzim között kisebb-nagyobb különbségek fedezhetők fel termékek alapján is. Ez a magyarázat könnyen elfogadható annak ismeretében, hogy a 3 nagy csoportra felosztható ESBL enzimeket több mint 200 eddig ismert enzimtípus alkotja [131]. Egy másik megközelítés szerint feltehetjük még azt is, hogy az ESBL enzimen kívül még egy klavulánsavval nem gátolható, de viszonylag gyenge hatásfokú egyéb enzim is jelen van a baktériumban. Ennek eldöntésére ez a gyors diagnosztikai MALDI-TOF MS vizsgálat nem elegendő.

A két következő ESBL-termelő *E. cloacae* izolátum (G1/46 és G1/57) látványosan nagy különbségeket mutat peak-mintázatában minden eddigi ESBL aktivitási eredményhez képest. Mindkét törzsnél mindegyik reakcióban végig megmarad mindegyik natív forma jele is. A natív formájában mindig nagy intenzitással jelen lévő 456 Da-os termék gyakorlatilag az eddig vizsgált összes ESBL enzimmél szinte mindig tökéletesen eltűnt az enzimaktivitás nyomán, itt ez egyáltalán nem figyelhető meg (lásd 8. Függelék, bal alsó és jobb felső panelek). A 461 Da-os hidrolízis termék pedig még nyomnyi mennyiségben sem észlelhető egyik reakcióban sem. Ezeknél tehát nyilvánvalóan ESBL, de más típusú ESBL enzim van jelen. Azaz a módszerünk alkalmas arra is, hogy a hasonló peak-mintázatok összehasonlítása alapján felvetődjön bennünk a gyanú, hogy az egyes vizsgált baktériumokban más és más ESBL típusok vannak jelen.

A G1/101 *Haemophilus parainfluenzae* izolátumról ismertük, hogy BLPACR, azaz béta-laktamáz pozitív amoxicillin/klavulánsav rezisztens törzs (nitrocefín pozitivitás mellett Augmentin rezisztens). Ebbe a vizsgálatba tulajdonképpen negatív kontrollként került be (a cefotaxim és a ceftriaxon a *Haemophilus*-ok elleni terápiás protokollok részét is képezik), de az eredmények erre bizonyos mértékben rácsafolni látszanak: a cefotaxim egyik natív formájával szemben (2Na^+ -ionos forma) láthatóan valamennyi hidrolitikus aktivitást képes kifejteni (461 m/z jelű hidrolizátum) a baktérium és erre az enzimaktivására a klavulánsavnak és az APBA-nak nincsen gátló hatása. ESBL enzimek leginkább az *Enterobacteriaceae* csoportban fordulnak elő, *Haemophilusok*-ban elméletileg lehetséges az előfordulásuk (ampicillin rezisztenciáért felelős génjeik is az *Enterobacteriaceae* csoportból származnak), de a gyakorlatban ez nagyon nagyon ritka jelenség [132, 133], AmpC hordozásról pedig ismereteink szerint még eseteírás sem született. Cefotaximra a *Haemophilus*-ok általánosan érzékenyek, a jelenséget egyelőre nem tudjuk megmagyarázni. Feltételezésünk szerint a sejtben lévő béta-laktamáz aktivitás módosítani képes bizonyos mértékben az antibiotikumot (lásd 461 Da-os forma kialakulása), de a natív formák nagy mértékű megmaradása miatt valószínűleg nem ez elegendő mértékű ahhoz, hogy ezzel megvédje a baktériumot az antibiotikus hatástól.

Végül az eddigiektől egy teljesen eltérő enzimet termelő baktériumot vizsgáltunk: a G1/84 *Escherichia coli* izolátumról úgy tudtuk, hogy NDM karbapenemáz enzimet termel (NDM = New Delhi metallo-béta-laktamáz) (a törzs a Szent László Kórház ajándéka a kísérleteinkhez). Ez az enzim gyakorlatilag szinte minden béta-laktám típusú antibiotikummal

szemben rezisztensé teszi az azt termelni képes baktériumot, ez alól egyetlen kivétel van: az aztreonam. A metallo-béta-laktamázok az Ambler-féle Class B csoportba tartoznak, béta-laktám gyűrűvel történő hidrolitikus reakciójuk is eltér a „hagyományos” (Class C) szerin típusú béta-laktamázokétól [134]. Klavulánsavval nem gátolhatók (de EDTA-val igen), az APBA hatása vitatott, de eredményeink alapján ez sincs rá hatással. Mind a spektrumain (8. Függelék, jobb alsó panel), mind az eredményeket szemléltető táblázatban jól látható, hogy a G1/84 *E. coli* által termelt béta-laktamáz enzim aktivitása, működése teljesen más az eddig látottaktól. Mindegyik hidrolitikus termék peakjének intenzitása erős és egyértelmű, de emellett erősek maradtak a natív formák jelei is. Egyik inhibitor sem fejtett ki semmilyen hatást az enzimre, sem gátlás, sem indukció nem történt, a vizsgált enzim biztosan nem ESBL vagy AmpC típusú enzim (bár ez utóbbi a korábbi kísérleteink tanulsága szerint bizonytalan), az viszont bizonyítható a kísérlettel, hogy valamilyen béta-laktamáz termel, mely révén cefotaximra rezisztens. Metallo-béta-laktamázokat specifikusan gátló anyaggal (EDTA) ez a kérdés megválaszolható lenne.

Jellegzetesen jól látható mindegyik reakcióban a 461 Da-os hidrolízis termék jele is, tehát ez az enzim is nagyobb hatásfokkal képes ezt a terméket generálni, vagyis megállapíthatjuk, hogy bizonyos termékek megjelenése és intenzitása nem csak az optimalizációtól vagy a körülményektől függ, hanem magától a vizsgált baktériumban termelődő enzim típusától is, annak különböző mértékű affinitásától a különböző natív formákhoz.

Az optimalizáló kísérletek eredményei és eddigi tapasztalataink alapján már leírhattunk egy olyan protokollt, mellyel laboratóriumunkban jó hatásfokkal reprodukálhatóak a cefotaximmal kapcsolatos gyors diagnosztikai MALDI-TOF MS vizsgálatok, elsősorban az ESBL-termelőkre vonatkozóan:

1. Optimális reakciótér fogat: 20 µl; cefotaxim koncentráció: 0,25 mg/ml; klavulánsav koncentráció: 0,05 mg/ml. (APBA koncentráció: 0,3 mg/ml.)
Reakcióelegyek összeállítása az egyértelműen feliratozott és steril, gömbölyű aljú Eppendorf-csővekben steril fülke alatt, majd mindezek és a megmaradt törzsoldatok lefagyasztása (-70°C). (eltarthatóság: ~3 hónap)
2. A MALDI-TOF MS mérést végző kollégák értesítése arról, hogy sürgős mérés következik, a kísérletsorozat tervének elküldése xls formátumban.
3. A különböző inkubációs körülmények beállítása (termosztát hőmérsékletének ellenőrzése), centrifuga működésének ellenőrzése.
4. A vizsgálatokhoz 24 órás primokultúrák szükségesek.
5. A kísérlethez előzőleg összeállított, megfelelő mennyiségű Eppendorf-cső párt és kontrollokat -70°C-ról elővesszük, szobahőmérsékletűre engedjük:
 - csak víz vak kontroll (egy plate-en egy elegendő)
 - csak CTX negatív kontroll (egy plate-en egy elegendő)
 - víz + CTX + ESBL pozitív kontrollként használt törzs (egy plate-en egy elegendő)
 - csak víz + tesztorganizmus negatív kontroll
 - víz + CTX + tesztorganizmus reakcióelegy
 - víz + CTX + klavulánsav + tesztorganizmus inhibíciós reakcióelegy

6. A részletesen kidolgozott vizsgálati terv alapján az egyes Eppendorf-csővekbe steril műanyag fogpiszkálók segítségével körülbelül mákszemnyi mennyiségű friss baktériumsejtet teszünk és homogenizálunk el a reakcióelegyekben.
7. A kísérletek elindítása. A reakcióidő pontos mérése.
8. Optimális inkubációs hőmérséklet: $36\pm 1^\circ\text{C}$, inkubációs idő: 120 perc.
9. 3 perc centrifugálás 13.000 rpm fordulatszámon (szobahőn).
10. A lecentrifugált minták víztiszta felülúszóiból 2-2 μl -t mérünk a kísérleti tervet követve a megfelelő MALDI-TOF target plate spotokra (steril pipettahegyekkel!). Első három spot üresen marad a kalibrátorok számára!
11. A felpipettázott mintákat száradni hagyjuk (~10 perc). A száradás sürgetése levegőáram segítségével nem ajánlott!
12. Beszáradás után a plate-et MALDI-TOF MS-hez visszük ($+4^\circ\text{C}$).
13. A MALDI-TOF műszeres mérést végző kolléga a kalibrátorokat is felméri a plate-re, majd beszáradás után a mátrix oldatot is rámeri a mintákra is.
14. Beszáradás után mérés: először kalibráció, majd a tesztek.
15. A mérési eredmények kiértékelése MALDI Biotyper® flexAnalysis szoftver segítségével.
16. Eredmények interpretálása („ESBL termelés megállapítható” „-nem állapítható meg”).

A cefotaximmal kapcsolatos egyik legalaposabban kidolgozott irodalmi forrás [120] adataival megegyezően mi sem találtuk meg méréseink során azt az enzimátikus bomlásterméket, amelynek elméletileg a 456 Da molekulatömegű natív protonált forma $[\text{M}+\text{H}]^+$ közvetlen hidrolíziséből kellene származnia: $456+18=474$ Da. Valószínűsítjük, hogy a deacetilálódás még a hidrolízis előtt lejátszódik és alakul ki a hidrolizált, deacetilálódott, protonált forma (414 Da) $[\text{M}_{\text{hidr}}-\text{Ac}+\text{H}]^+$.

Ugyanebben az átfogó tanulmányban a cefotaxim kis mértékű spontán hidrolízisét is leríjják, mely révén natív cefotaxim mintákban is előfordulhat a 414 Da-os termék. Ezt a megállapítást is alá tudjuk támasztani, de ez az intenzitás kísérleteink során mindig szinte csak minimális volt, ha előfordult (lásd 36. ábra, legfelső panel): például a 36. ábrán látható natív cefotaxim két nagyobb intenzitású 396 és 426 m/z értékű peakjei közti apró jelek figyelhetők meg, melyek közt valóban 414 m/z-nél is van egy ilyen kis intenzitású jel (az alsó panel erős 414 m/z jele segítségével beazonosítható). Több volt azonban az olyan mérésünk a natív cefotaximmal, ahol ez a jel egyáltalán nem is volt észlelhető.

A tanulmány arról is ír, hogy a 396 Da-os termék teljes eltűnése figyelhető meg minden általuk vizsgált cefotaxim rezisztens baktérium esetében (vagyis ez alapján definiálják a cefotaximra is kiterjedő béta-laktamáz pozitivitást). Ezt mi határozottan cáfolni tudjuk: sok cefotaxim rezisztens törzsnél találtuk meg ezt a terméket a hidrolizált termék mellett is, például az ismeretlen béta-laktamáz tartalmazó G1/54 *Citrobacter koseri* (9. ábra, 7. Függelék), vagy a két ESBL termelő *Enterobacter cloacae* izolátumunk (G1/46 és G1/57) (10. ábra, 8. Függelék), de például a metallo-béta-laktamáz termelő G1/84 *E. coli* (szintén 10. ábra, 8. Függelék) is tökéletesen rezisztens cefotaximra (is), ettől függetlenül a mérések során megtaláltuk a hidrolizált termék és a natív formák jeleit is a baktérium reakcióelegyből.

Az ESBL pozitivitás definiálásához nem szükséges feltétel tehát a 396 Da-os termék jelének teljes eltűnése az ESBL-termelő *Enterobacter cloacae* (G1/46, G1/57) izolátumok kísérleteinek tanulságai szerint, és ez valószínűleg más béta-laktamázokra is igaz (G1/84).

A cefotaximra kiterjedő béta-laktamáz pozitivitás definiálásához mi csak megengedő feltételként használtuk a natív formák jeleinek eltűnését a mintákból, de tapasztalataink alapján lehet ez csak intenzitáscsökkenés is (G1/84 karbapenemázánál még ez sem teljesült, pedig ennél szélesebb spektrumú és aktivitású béta-laktamáz enzimmel kísérleteink során nem sikerült dolgoznunk). Szükséges feltételként definiáltuk viszont valamely hidrolizált termék jelének megjelenését, de ez alól kivételt képez a 461 Da-os termék, ha az csak önmagában mérhető más hidrolízistermékek nélkül, mert a G1/101 BLPACR *Haemophilus parainfluenzae* esetében ez karakterisztikusan megfigyelhető volt.

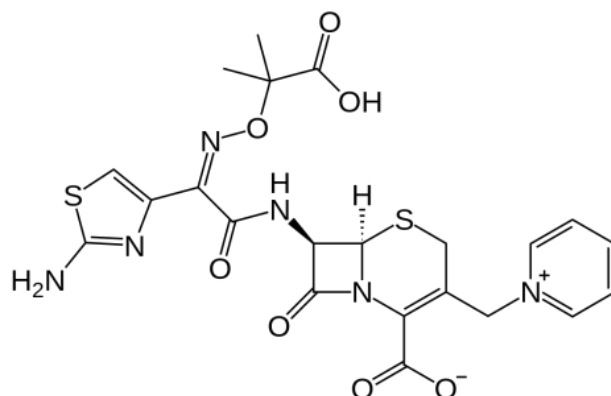
Össességében tehát kijelenthetjük, hogy a cefotaxim és a klavulánsav külön és együtt végzett párhuzamos reakcióelegyeivel jó hatásfokkal detektálható ESBL enzimaktivitás, mely alól azért találtunk kivételeket, mert többszörös és többféle enzim hordozása, vagy ismeretlen béta-laktamáz, vagy IRT ESBL esetén még ez a módszer sem ad megbízható eredményeket. Az AmpC kimutatást ebben a kísérletsorozatban sikertelennek nyilvánítottuk. De mivel az ESBL-termelő baktériumok aránya messze meghaladja az inkább ritkábbnak számító AmpC-hordozást, ezért még mindig nagyon hasznos és nagyon gyors diagnosztikai eszközként tekintünk a cefotaximmal és ESBL-inhibitorral végezhető MALDI-TOF MS MBT-ASTRA tesztekre.

16. MALDI-TOF MS mérések ceftazidim antibiotikummal

A ceftazidim a cefotaxim mellett egy másik fontos, a cefalosporinok harmadik generációját képviselő béta-laktám antibiotikum. Hatásspektruma a cefotaximéhoz képest szélesebb, azaz több olyan baktériumcsoport ellen is van alkalmazhatósági potenciálja, melyek ellen a cefotaxim kevésbé hatásos. Ilyen fontos kórokozócsoportok a *Pseudomonas*-ok és *Burkholderia*-k, melyek ellen más hatékony cefalosporin (a cefoperazonon kívül) nem is szerepel a terápiás eszköztár lehetőségei között. Alkalmazása legtöbbször célzott, ezért fontos laboratóriumi vizsgálat a ceftazidim érzékenység vagy rezisztencia megállapítása és mielőbbi interpretálása. A *Pseudomonas*-ok az általános cefalosporinokkal és penicillinszármazékokkal szembeni rezisztenciáját a bennük intrinsic kódolt, alacsony szinten termelődő AmpC béta-laktamázok biztosítják, az anti-*Pseudomonas* cefalosporinokkal szembeni rezisztenciáknál

ezen enzimek over-expressziója, efflux pumpák tevékenységének növekedése és egyéb enzimek (pl. ESBL) jelenléte lehet még a felelős.

A ceftazidim MALDI-TOF MS MBT-ASTRA inhibíciós vizsgálatai – a cefotaximhoz hasonlóan – lehetőséget biztosíthatnak a különböző béta-laktám aktivitások megkülönböztetésére és így végső soron egyetlen antibiotikum vizsgálatával egész antibiotikum csoportok terápiai interpretálására.



ceftazidim (C₂₂H₂₂N₆O₇S₂, 546,58 Da)

intakt formák	468 Da [M-pir+H] ⁺	547 Da [M+H] ⁺
módosult formák	(spontán) hidrolízis	
	486 Da [M-pir _{hidr} +H] ⁺	
	spontán dekarboxiláció	
	441 Da [M-pir _{hidr} -COO+H] ⁺	

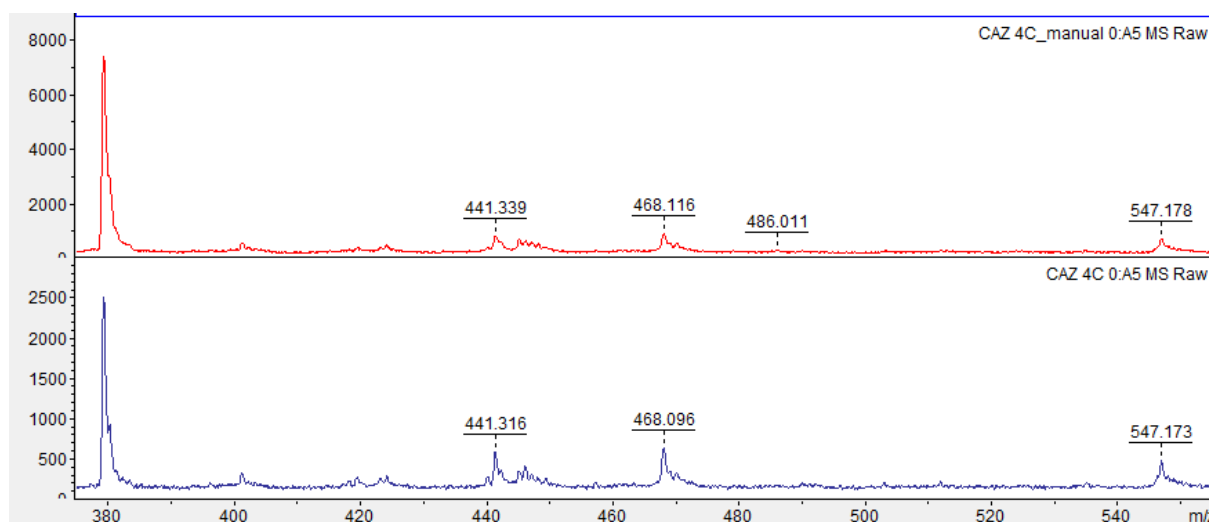
46. ábra

Ceftazidim natív (zöld), és enzimatikusan módosított, módosult (piros) formái.

A ceftazidim nem stabil molekula. A cefotaximnál ezt a jelenséget nem figyelhettük meg, ceftazidimnél viszont fontos tulajdonság, hogy jelentősebb spontán bomlást mutat szobahőmérséklet fölött, ami kisebb részt a béta-laktám gyűrű spontán hidrolízisében, nagyobb részt a béta-laktám gyűrűt védő piridin gyűrű leszakadásában mutatkozik meg. A béta-laktám gyűrű hidrolitikus bomlása az antibiotikus hatás elmaradását is jelenti, a piridin gyűrű elvesztése pedig nemcsak az antibiotikus hatást csökkenti (béta-laktám gyűrűt védő hatása miatt van a molekulán), de a felszabadult piridin még ráadásul vese- és májkárosító hatású is a gazdaszervezetre [132].

A ceftazidim intakt molekulája 546 Da, protonáltan 547 Da. Különböző ionokkal nem képez mérhető formákat. A piridin gyűrű leszakadása egy 468 Da tömegű molekulát eredményez, ennek spontán vagy enzimatis hidrolízise után egy 486 Da-os molekula keletkezik, mely tovább dekarboxilálódik: egy 441 Da-os molekula is létrejön. Ezek alapján tehát a natív ceftazidim oldatból nagy intenzitású jelként várjuk az 547 és 468 m/z értékű peakeket, kisebb intenzitással pedig a degradálódó termékek jeleit: 486 és 441 m/z értékeknél.

A vizsgálatok kivitelezési folyamata az előzőekben leírtaknak megfelelően zajlott ebben az esetben is: ceftazidim oldatokban inkubáltunk különböző baktériumtörzseket, majd a sejtmentes felülúszókból elvégeztük a MALDI-TOF MS méréseket.



47. ábra

- tiszta ceftazidim (0,25 mg/ml) negatív kontroll (A)
- tiszta ceftazidim (0,25 mg/ml) negatív kontroll (B)

Mint az a 47. ábrán látható, már az intakt, 4°C-on tárolt és csak a kísérlet összeállításának 10-15 perces időtartamára szobahőre került ceftazidimben is jelentős spontán események történtek: a 441 m/z értékű peak $[M\text{-pir}_{\text{hydr}}\text{-COO}+\text{H}]^+$ gyakorlatilag összemérhető intenzitású a két másik detektálható peak intenzitásával. Viszont a 486 m/z értékű jel érdekes módon láthatóan nagyon minimálisan van jelen ((A) felső piros spektrum) az ajánlott 0,25 mg/ml antibiotikum koncentráción [120], ha egyáltalán jelen van, ugyanennek a mérésnek a duplikátumában ez a peak egyáltalán nincs is jelen ((B) alatta lévő kék spektrum). A jelek általános intenzitása nem túl magas, valószínűleg az értékeléseknél ez újabb problémákhoz fog vezetni. A mátrix dimer jele most a spektrogramok bal szélére tolódva látható (379 m/z), ez viszont tehát most egyáltalán nincs zavaró hatással. Az antibiotikum legelső méréséből származó spektrumadatok azonban nagyon rosszak, az eredmények egyáltalán nem biztatóak.

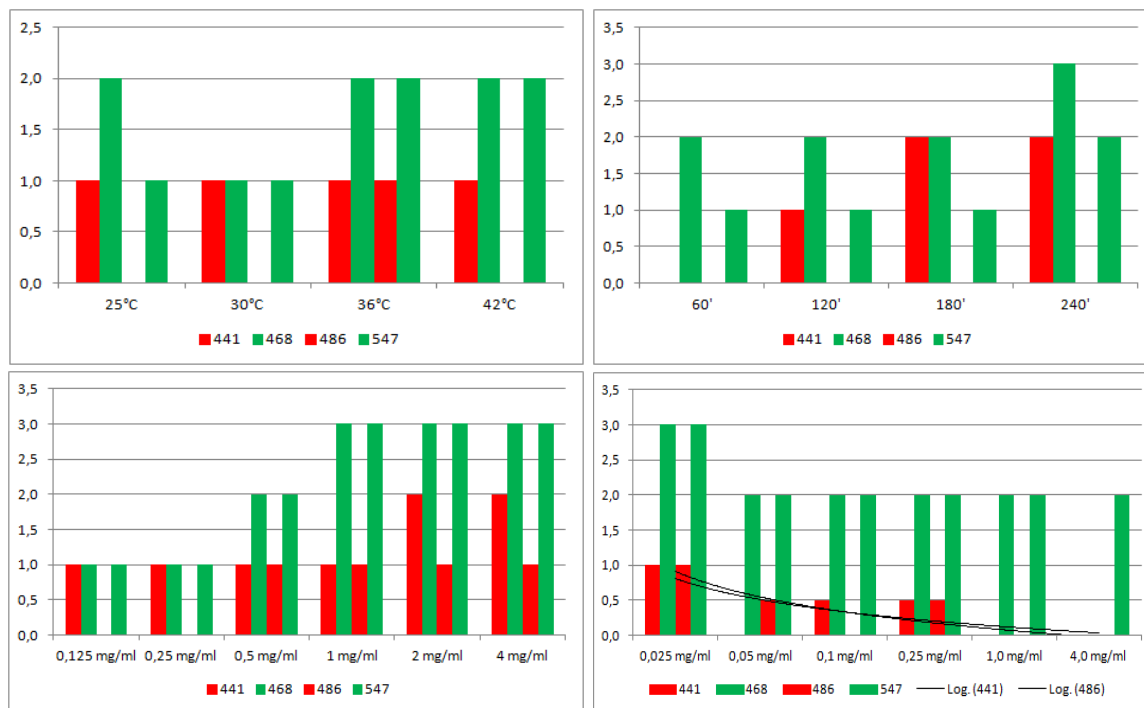
A ceftazidim bakteriális enzimtevékenység melletti viselkedését és mérési lehetőségeit többféle megközelítésből indulva vizsgáltuk meg. Olyan pozitív kontroll törzseket használtunk ennek tesztelésére, melyek az előzetes korongdiffúziós érzékenységvizsgálatban biztos ceftazidim rezisztenciát mutattak. A vizsgálatok célja elsősorban a ceftazidimmel végzett MALDI-TOF MS MBT-ASTRA reakciók optimalizálása, másodsorban pedig a két fontos enzimsalád, az ESBL-ek és az AmpC enzimek tevékenységének valamilyen módon történő megkülönböztetése. Ezekben az előzetes tesztekben végeztük el tehát a ceftazidimes reakciók paramétereinek optimalizálását is: inkubációs hőmérséklet, inkubációs idő, antibiotikum koncentrációk, inhibitorok/induktorok koncentrációja, stb.

T	441	468	486	547
25°C	1	2	0	1
30°C	1	1	0	1
36°C	1	2	1	2
42°C	1	2	0	2

t	441	468	486	547
60'	0	2	0	1
120'	1	2	0	1
180'	2	2	0	1
240'	2	3	0	2

CAZ	441	468	486	547
0,125 mg/ml	1	1	0	1
0,25 mg/ml	1	1	0	1
0,5 mg/ml	1	2	1	2
1 mg/ml	1	3	1	3
2 mg/ml	2	3	1	3
4 mg/ml	2	3	1	3

KLAV	441	468	486	547
0,025 mg/ml	1	3	1	3
0,05 mg/ml	0	2	0,5	2
0,1 mg/ml	0,5	2	0	2
0,25 mg/ml	0,5	2	0,5	2
1,0 mg/ml	0	2	0	2
4,0 mg/ml	0	0	0	2



48. ábra

Ceftazidim reakciók optimalizálása G1/4 ESBL *E. coli* törzsszel.

Az optimalizálási eredmények értékelésére és szemléltetésére itt is az eddigi score-rendszerünket használtuk (nincs peak: 0; nagyon kis intenzitással, de van peak: 1; egyértelmű: 2; kimagasló intenzitású: 3). (Az ide vonatkozó egyes spektrumok a 9. Függelékben láthatók.) A vizsgálatokba rögtön be is építettünk egy a cefotaxim vizsgálataiból következő panelt is: inhibitorok hatását is igyekeztünk felderíteni a tesztelt baktériumok enzimaktivitásánál.

A 48. ábrán (és a 9. Függelékben) látható eredményekből az alábbiakra következtettünk. Először is az a sajnálatos jelenség látszódik szinte mindegyik kísérletben, hogy mind a natív termékek, mind a módosult termékek szinte mindig jelen vannak valamilyen alacsonyabb intenzitású jelként, vagyis tovább erősödik a gyanúnk, hogy ez az antibiotikum nem fogja beváltani a hozzá fűzött reményeket és a túl sok bizonytalanság miatt végül negatívan fogjuk értékelni a vele folytatott kísérletsorozatot.

Az alkalmazott inkubációs hőmérséklet az enzimreakciót nyilvánvalóan befolyásolja és a legrealisabb 36°C-on a legoptimálisabb, de a spontán bomlás mértéke is hasonló volt a bevezető kísérletek tanulsága szerint, így ez tulajdonképpen új adatokkal nem szolgált. Az inkubációs idő a cefotaxim inkubációs idejéhez képest jóval hosszabb, a legoptimálisabbnak

látszó értéken 180 perc. Az alkalmazott ceftazidim antibiotikum koncentráció a vizsgált tartományban láthatóan egyenes arányosságban áll a detektálhatósággal, így valószínűleg a szakirodalmi forrásoktól [120, 121] eltérően mi az 1 mg/ml ceftazidim koncentrációt fogjuk elfogadni optimálisnak. Az inhibíció jelensége működni látszott már 0,05 mg/ml klavulánsav koncentrációtól 1 mg/ml értékig (fölötte már a mérést zavaró volt a magas koncentráció), bár az itt alkalmazott antibiotikum koncentráció még az ajánlás szerinti 0,25 mg/ml volt, amelynél (lásd bal alsó grafikon) még az általánosan alacsony jelintenzitás miatt a még kisebb intenzitású bomlási termékek jelei is kevésbé láthatók és emiatt ezek a kapott jelek még betudhatók spontán bomlástermékek megmaradt jeleinek is. Mindezek alapján, a G1/4 ESBL-termelő *E. coli* izolátum segítségével végrehajtott kísérletek eredményeiből és a megelőző validitásvizsgálatok tanulsága révén nem tudtunk egyértelmű definíciót adni arra, hogy hogyan kellene értékelni a ceftazidim rezisztenciát biztosító béta-laktamáz aktivitást. A natív peakek eltűnése sosem valósult meg, a módosított termékek jeleinek megjelenése pedig a spontán abiotikus eseményektől nem volt egyértelműen elkülöníthető. Ugyanezt a vizsgálatot elvégeztük a G1/86 AmpC *E. asburiae* törzs segítségével is, de az eredmények szinte tökéletesen hasonlóak lettek, mint az imént ismertetettek. A G1/86 *E. asburiae* esetében az inhibitor anyag APBA volt, egy plusz indukciós kísérletben pedig klavulánsavat használtunk, de sem inhibíció, sem indukció nem volt objektíven detektálható az adott baktérium reakcióelegeiből.

Eddig elvégzett kísérleteink alapján úgy tapasztaltuk, hogy a 441 m/z jelű peak körül több olyan kontamináns peak is van, melyeknek az eredetét nem ismerjük ugyan, de jelenlétük ebben az esetben már valóban zavaró.

Az enzimaktivitás egyik esetben sem volt elkülöníthető a spontán kialakuló termékek mintázatától, ezért az optimalizáló lépések alapján már látható, hogy a ceftazidim nem valószínű, hogy megfelelő eszköz lenne egy ilyen, nagyon precíz molekuláris változásokat is észlelő rendszerre épített módszerben.

Mindezek ellenére természetesen screenelési kísérletsort is végeztünk ceftazidim enzimátikus bontásához potenciálisan megfelelő törzsekkel, mely kísérletekből az alábbi eredmények születtek (11. táblázat, az egyes spektrumok a 10. Függelékben láthatók).

#	faj	R	441	468	486	547
G1/49	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	-	+/-	+	+/-	+
G1/101	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPACR	+/-	+	+/-	+
G1/126	<i>Escherichia coli</i>	ampicillin R	+/-	+	-	+
G1/7	<i>Escherichia coli</i> +klavulánsav	ESBL	+/-	+	+/-	+
G1/28	<i>Escherichia coli</i> +klavulánsav	ESBL, MDR	-	+	-	+/-
G1/36	<i>Escherichia coli</i> +klavulánsav	ESBL	+/-	+	+/-	+
G1/46	<i>Escherichia coli</i> +klavulánsav	ESBL	-	+	-	+/-
G1/57	<i>Escherichia coli</i> +klavulánsav	ESBL	+/-	+	-	+
G1/71	<i>Escherichia coli</i> +klavulánsav	ESBL	+/-	+	-	+
G1/79	<i>Escherichia coli</i> +klavulánsav	ESBL	+	+	-	+
			+	+	+/-	+

G1/96	<i>Escherichia coli</i> +klavulánsav	ESBL	+/-	+	-	+/-
G1/20	<i>Enterobacter cloacae</i> +klavulánsav	ESBL	-	+	+/-	+
G1/110	<i>Klebsiella pneumoniae</i> +klavulánsav	ESBL	+/-	+	+	+/-
G1/125	<i>Klebsiella pneumoniae</i> +klavulánsav	ESBL	+/-	+	+/-	+
G1/38	<i>Klebsiella pneumoniae</i> +klavulánsav	ESBL	-	+/-	-	-
G1/45	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> +klavulánsav	ESBL	+/-	+	+	+
G1/44	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> +klavulánsav	ESBL, MDR	+/-	+	-	+/-
G1/53	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> +APBA	indAmpC	-	+	-	+
G1/86	<i>Enterobacter asburiae</i> +APBA	AmpC	+/-	+	+	+
G1/59	<i>Chryseobacterium gleum</i> +klavulánsav	MDR	-	+/-	+	+/-
G1/54	<i>Citrobacter koseri</i> +klavulánsav	MDR	+/-	+	+/-	+
G1/84	<i>Escherichia coli</i> +klavulánsav	karbapenemáz	+/-	+	-	+
G1/56	<i>Morganella morganii</i> +APBA	MDR	-	+/-	-	+/-
			-	+	-	+/-

11. táblázat

Különbozó törzsek ceftazidim rezisztencia vizsgálata enziminhibitorok mellett (lásd 10. Függelék).

A 11. táblázatban szemléltetni próbált eredmények sajnos valóban nem egyértelműek.

A negatív kontrollok esetében zöld színnel emeltük ki az elvárt eseményeket, sárgával a nem vártakat. Egyik negatív kontroll törzs sem mutatott olyan aktivitást, mellyel a natív termékeket elbontotta volna, viszont a bomlástermékek a ceftazidim spontán, nem biológiai bomlása révén szinte mindig jelen voltak kisebb intenzitásokkal.

A pozitívként a kísérletbe került baktériumok mindegyike ceftazidim rezisztens volt. Az elvárt hidrolitikus aktivitás révén létrejött eseményeket piros színnel jelöltük, a nem várt eseményeket pedig itt is sárga színnel. A natív ceftazidim formák jelenléte szinte minden reakcióelegyből (95%!) kimutatható volt ceftazidim rezisztens baktérium esetében (19/20). Az inhibíciós párhuzamosokból mindössze kettő mutatott várt értéket (G1/96 ESBL *E. coli* és G1/110 *K. pneumoniae*) a 441 Da-os termékre vonatkozóan (2/20; 10%), ami viszont közel sem elegendő arány annak elfogadásához, hogy itt valóban az elvárt reakció zajlott volna le, valószínűbb, hogy a mérések kisebb-nagyobb intenzitásbeli ingadozása miatt egyszerűen csak nem volt észlelhető az amúgy is gyenge intenzitású jel. A 486 Da-os termékénél ez az arány valamivel jobb: 6 esetben volt „gátoltnak látszó” a reakció az inhibitorral nem tartalmazó párhuzamosához képest (30%). A G1/110 ESBL *K. pneumoniae* reakciói felelhetnének meg leginkább az elvárásoknak, ha elfogadnánk, hogy akkor pozitív egy reakció ceftazidimmel, ha a natív formák jelenléte mellett megjelennek a bomlástermékek és a bomlástermékek megjelenése inhibitorral gátolható, de sajnos ez az egy reakció csak kivétel a többihez képest.

Tulajdonképpen a negatív és a pozitív kontrollokként használt törzsek eredményei egymástól nem voltak megkülönböztethetőek. A módszer alapjaiban sem volt megfelelő, rutin vizsgálatokhoz a ceftazidim gyors, spontán bomlása miatt nem biztonságos, az enzimaktivitás az abiotikus eseményektől nem volt differenciálható. A cefotaxim vizsgálata mellé terveink szerint kiegészítőnek, sőt alternatívának szánt antibiotikum, a ceftazidim,

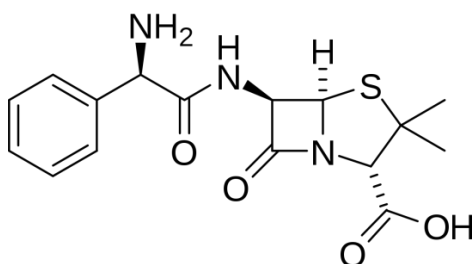
vizsgálataink alapján nem megfelelő kiindulási anyag MALDI-TOF MS MBT ASTRA érzékenységvizsgálatokhoz rutin munkát végző mikrobiológiai laboratórium számára, így ezt a témát további lehetőségek és tervek nélkül lezártuk.

17. MALDI-TOF MS mérések ampicillin antibiotikummal

Az ampicillin az egyszerűbb béta-laktámok közül manapság még talán a leggyakrabban alkalmazott antibiotikum. Az 1960-as évek óta használják, hatásspektruma széleskörű, de sok baktérium rendelkezik már ellene valamilyen enzimatisz védekező mechanizmussal. Azokban az esetekben viszont például, amikor bizonyos Gram-negatív bélbaktériumok nem rendelkeznek ilyen béta-laktamáz enzimekkel, még számításba jöhet az ampicillin is mint terápiás szer. Ennek fontossága abban áll, hogy mivel az erősebb és későbbi fejlesztésű béta-laktám antibiotikumok (cefalosporinok, karbapenemek, monobactamok, stb) túlhasználata egyértelműen hozzájárul az ellenük kialakuló pánrezisztenciák kialakulásához, az egyszerűbb antibiotikumok viszont a gazdaszervezet mikrobiomjára nem helyeznek ekkora szelekciós nyomást, de terápiásan ettől függetlenül még hatásosak lehetnek, ezért – ha erre mód van! –, ezeket az antibiotikumokat érdemes is előnyben részesíteni.

Az előbb említett *Enterobacteriaceae*-n kívül hatásos lehet még az ampicillin *Haemophilus*-ok, *Streptococcus*-ok, *Enterococcus*-ok, *Staphylococcus saprophyticus*, *Listeria*-k, *Pasteurella*-k, *Aerococcus*-ok, *Burkholderia*-k, *Gardnerella*-k, *Salmonella*-k, *Actinomyces*-ek és anaerobok ellen is.

Vizsgálatainkban az ampicillint elsősorban az alapvető béta-laktamáz aktivitás detektálásra, illetve a *Haemophilus*-oknál előforduló különböző béta-laktamáz aktivitások kimutatására és esetleg differenciálására kívántuk használni (BLPAR, BLPACR vs. BLNAR).



ampicillin (C₁₆H₁₉N₃O₄S, 349,40 Da)

intakt formák	350 Da [M+H] ⁺	372 Da [M+Na] ⁺	388 Da [M+K] ⁺	394 Da [M+2Na] ⁺
módosult formák	hidrolízis	hidrolízis		hidrolízis
	368 Da [M _{hidr} +H] ⁺	390 Da [M _{hidr} +Na] ⁺		412 Da [M _{hidr} +2Na] ⁺
	spontán dekarboxiláció			
	324 Da [M _{hidr} -COO+H] ⁺			

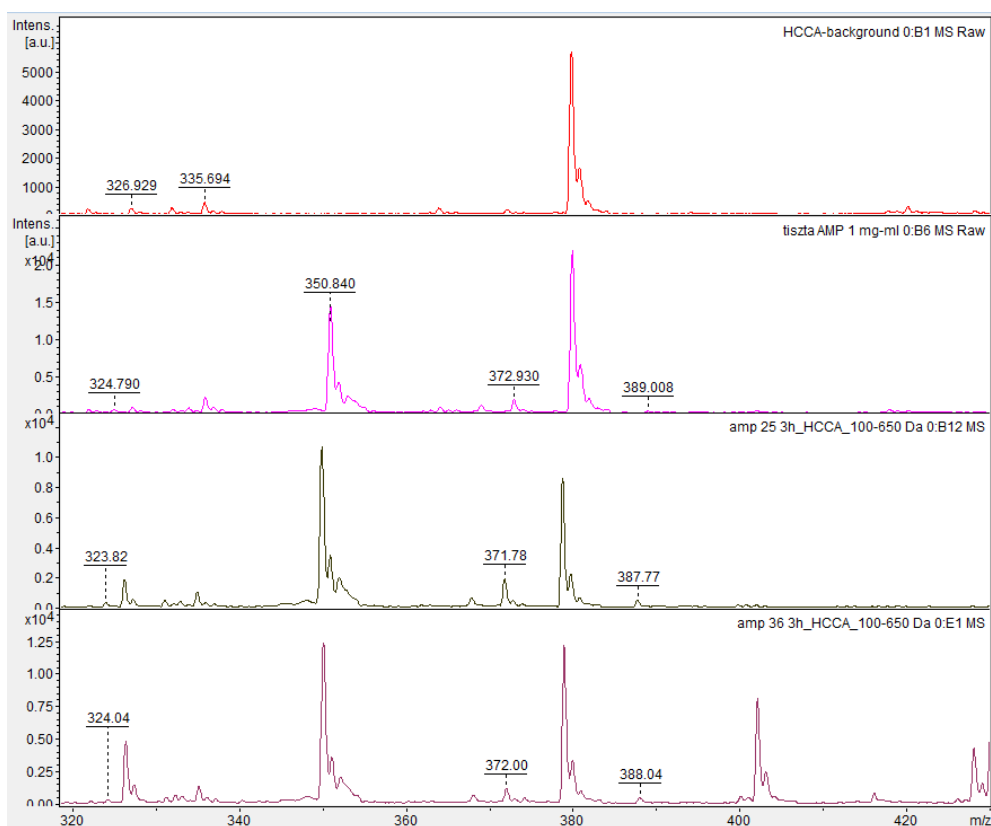
49. ábra

Ampicillin natív (zöld), és enzimatisz módosított (piros) formái

Az ampicillin alapmolekulája 350 Da (protonáltan), különböző egyszeres és többszörös ionokkal kialakított natív formája is létezik természetes vizes oldatban is. Ezen formák legtöbbszörének hidrolízise révén, majd egyikük további spontán dekarboxilációja révén alakulnak ki az enzimatikusan módosított termékek.

Az ampicillin vizsgálatorozatában tehát a natív jelek a 350, 372, 388 és 392 m/z értékeknél keresendők, a módosított és módosult formák pedig a 386, 390, 412 és 324 m/z értékeknél. A vizsgálatok kivitelezési folyamata az előzőekben leírtaknak megfelelően zajlott ebben az esetben is: ampicillin oldatokban inkubáltunk különböző baktériumtörzseket, majd a sejtmentes felülúszókból elvégeztük a MALDI-TOF MS méréseket.

A vizsgálatokat ebben az esetben is a validitás értékelésével kezdtük: vak víz kontroll, natív ampicillin, ampicillin spontán bomlás.



50. ábra

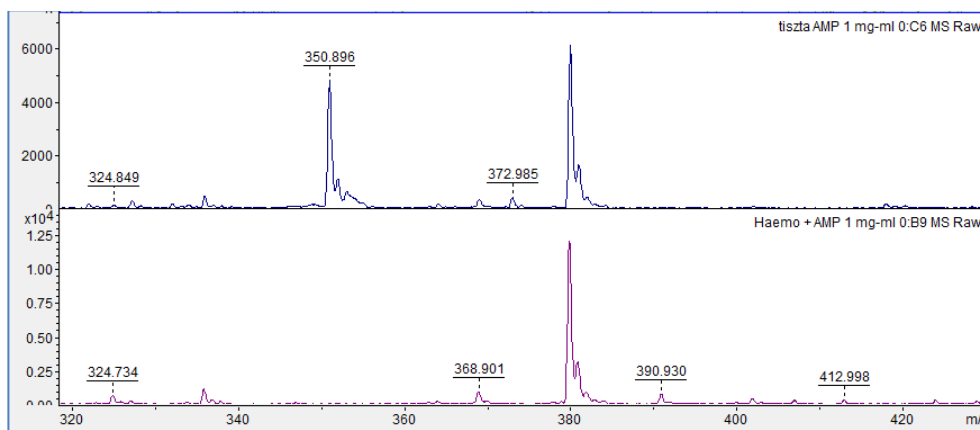
Ampicillin vizsgálatok negatív kontrolljai:

- vak víz kontroll
- tiszta ampicillin (1 mg/ml) negatív kontroll
- tiszta ampicillin (1 mg/ml) spontán bomlás 25°C 3 óra
- tiszta ampicillin (1 mg/ml) spontán bomlás 36°C 3 óra

A 48. ábrán látható spektrumok tanulsága szerint az ampicillin három fontos marker peakje közül a 394 m/z értékű jel $[M+2Na]^+$ csak minimális intenzitással detektálható. A 350 Da-os $[M+H]^+$ natív molekula dominánsan jelen van mindegyik oldatban, az egyszeres Na^+ -ionos 372 Da-os forma $[M+Na]^+$ és az egyszeres K^+ -ionos 388 Da-os forma $[M+K]^+$ detektálhatók, de mindig csak kis intenzitású jelként. Fontos észrevenni, hogy mindegyik alapoldatban jelen van valamennyi spontán bomlásból eredő termék is: még a különböző

inkubációkon át sem esett tiszta ampicillin oldatban is megtalálható alacsony intenzitással a 368 Da-os hidrolízis termék és az ebből keletkező 324 Da-os dekarboxilálódott termék jele is. A 412 Da-os hidrolizátum jelét egyik előzetes mérésben sem tudtuk felismerni. Ezek alapján már a baktériumtörzsekkel végzett kísérletek előtt kijelenthetjük, hogy az ampicillin enzimatis bontásán alapuló MALDI-TOF MS vizsgálatok értékelését nagyon körültekintően kell végezni és nem lehet elégséges feltétel a béta-laktamáz pozitivitás kimondásához, ha egyik-másik bomlástermék a reakcióelegyek méréséből megjelenik alacsony intenzitással.

Pozitív kontrollként előzetes vizsgálatban egy BLPACR *Haemophilus parainfluenzae* baktériumtörzssel (G1/3) végeztük el az enzimatis MALDI-TOF MS mérési reakciót, mely nitrocefín hidrolízis teszttel és hagyományos korongdiffúziós módszerrel is ampicillin rezisztensnek, azaz béta-laktamáz pozitívnek bizonyult.



51. ábra

Ampicillin enzimatis bontásának vizsgálata BLPACR *H. parainfluenzae* (G1/3) törzssel.

A 49. ábrán egyértelműen látható az enzimatis tevékenység révén létrejövő változás az ampicillin oldatának peak mintázatában: a jelenlévő natív formákat képviselő peakek (350, 372 m/z) mindegyike teljes mértékben degradálódott az oldatból, a hidrolitikus termékek intenzitásai viszont kis mértékben emelkedtek, bár ez az emelkedés nem volt jelentős. Emellett fontos részlet még az eddigiekhez képest, hogy a 412 m/z értékű peak is jelen van a hidrolizált oldatban. Az első mérések alapján tehát a béta-laktamáz aktivitás definiálásához ez esetben a natív termékek eltűnésének vagy nagyon jelentős csökkenésének detektálása szükséges. Egyelőre csak feltételezésként állapíthatjuk meg, hogy a 412 Da-os termék megjelenésének is lehet diagnosztikai szerepe.

A módszer optimalizálását is ezzel az ismert BLPACR baktériumtörzssel végeztük el (G1/3 *H. parainfluenzae*). A vizsgált paraméterek itt is az inkubációs hőmérséklet, idő és antibiotikum koncentráció voltak. Optimális paramétereknek a következőket találtuk:

- Optimális hőmérséklet: 25°C, 36°C és 42°C-os hőmérsékleteken 180 percig inkubálva mindegyik vizsgálatban a 47. ábrán lévő eredménnyel gyakorlatilag egyező peakmintázatokat kaptunk: sem intenzitásukban, sem a spektrumok

minőségében nem volt említendő különbség. A *Haemophilus*-ok a legtöbb esetben TEM-típusú béta-laktamáz hordoznak, melyek hőmérsékleti optimuma 37°C [133, 136], így az eleve legrealisabb 36°C-os inkubációs hőmérsékletet itt is elfogadtuk.

- Optimális inkubációs idő: 30', 60', 120', 150' és 180'-es inkubációs időket vizsgálva megállapíthattuk, hogy már a 30 perces inkubációból született mérési eredmények is mutatják az enzimátikus tevékenység jellegzetességeit, a reakció azonban csak a 60 perces inkubációs reakciótól tekinthető teljesnek, így a 120 perces optimumot fogadtuk el. 30 percnél még detektálhatók kis intenzitással a 350 és a 372 m/z peakek, ennél hosszabb inkubációknál már nem (lásd 11. Függelék).
- Antibiotikum koncentráció: az ampicillin alapvető oldhatósági problémái miatt a koncentrációsor csak 1 mg/ml értékig tudtuk megfelelően elkészíteni. Ennél magasabb koncentrációkban már telítődik az oldat, a koncentráció pedig emiatt már nem is lesz pontos. Irodalmi adatok [120] szerint 10 mg/ml volna a megfelelő optimális érték, ezt mi nem tudtuk reprodukálni. Eredményeinkből egyértelműen látható, hogy a reakciók az 1 mg/ml értékkel is tökéletesen működőképesek, és a legegységesebb felbontású spektrumok is ebből a koncentrációból készültek, így ezt az értéket fogadtuk el optimálisként. A MALDI-TOF MS antibiotikum mérések 0,1 mg/ml érték alatt nem mutatták a natív peakeket sem, 1 mg/ml fölötti értékeknél pedig semmilyen pozitív tendencia nem látható (lásd 11. Függelék).

Ezt követően, a kialakított optimális reakciókörülményekkel az ampicillin bontását és annak detektálását kíséreltük meg különböző klinikai izolátumokkal, melyek között az egyszerű ampicillin-rezisztens az ESBL-termelő *Enterobacteriaceae*-kig és multirezisztens *Haemophilus*-okig sokféle baktérium került screenelésre.

				324	350	368	372	388	390	394	412
#	faj	R									
G1/49	amp01 ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i>	ampicillin É	+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-
	amp02 G1/3424/2015	<i>Escherichia coli</i>	ampicillin É	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
	amp21 T/505/E	<i>Escherichia coli</i>	ampicillin É	-	+	-	+	-	-	-	-
	amp03 G1/311/2015	<i>Escherichia coli</i>	ampicillin R	+	-	+	-	-	+	-	+
	amp14 G1/2828/2015	<i>Escherichia coli</i>	ampicillin R	+	-	+	-	-	+	-	+
	amp16 G1/3246/2015	<i>Escherichia coli</i>	ampicillin R	+	-	+	-	-	+	-	+
	amp18 G1/3300/2015	<i>Klebsiella oxytoca</i>	ampicillin intr R	+	-	+	-	-	+	-	+
	amp19 G1/3265/2015	<i>Citrobacter braakii</i>	ampicillin intr R	+	-	+	-	-	+/-	-	+/-
G1/4	amp04 G1/3024/2015	<i>Escherichia coli</i>	ESBL	+	-	+	-	-	+	-	+
G1/20	G1/4119/2017	<i>Enterobacter cloacae</i>	ESBL	+	-	+	-	-	+	-	+/-
G1/38	G1/361/2018	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL	+	-	+	-	-	+/-	-	-
	amp24 G1/4013/2015	<i>Escherichia coli</i>	ESBL	+	-	+	-	-	+	-	+/-
G1/125	G1/6195/2018	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL	+	-	+	-	-	+	-	+
	amp15 QC 51/2015/II	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ESBL	+	-	+	-	-	+	-	-
G1/86	G1/2978/2018	<i>Enterobacter asburiae</i>	AmpC	+	+	+	+/-	-	+/-	+/-	-
G1/84	LK/16616/2018	<i>Escherichia coli</i>	karbapenem-R	+	+/-	+	+/-	-	+	-	-
	amp05 G1/3246/2015	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MDR	+	-	+	-	-	+	-	+
	amp20 G1/3412/2015	<i>Escherichia coli</i>	MDR	+	-	+	-	-	+	-	+
G1/76	amp10 ATCC 9334	<i>Haemophilus influenzae</i>	ampicillin É	+/-	+	+/-	+	+	+	+/-	-
	amp12 G1/246/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	ampicillin É	+/-	+	+	+	+	+	+/-	-
	amp07 G1/3238/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLNAR	+	+	+	+	+	+	+/-	-
	amp13 G1/3256/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLNAR	+/-	+	+/-	+	+	+	+/-	-
G1/3	amp06 G1/3255/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPACR	+	-	+	-	-	+	-	+/-
	amp08 G1/3154/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPACR	+	-	+	-	-	+	-	+/-
	amp17 G1/3235/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPACR	+	-	+	-	-	+	-	+
G1/85	G1/2944/2018	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPAR	+/-	+/-	+	-	-	-	-	-
G1/89	G1/3278/2018	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPAR → BLNAR?	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	-
	amp09 G1/3064/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPACR? → BLNAR	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+/-
	amp11 G1/3270/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	MDR, nem BLPACR	+/-	+	+	+	+	+	+/-	-

12. táblázat

Különböző baktériumtörzsek ampicillin rezisztencia vizsgálata MALDI-TOF MS méréssel (lásd 12. Függelék).

Az ampicillin hidrolízisére nagyon sok egyszerűbb béta-laktamáz enzimtípus is képes, ezért specifikus inhibíciós vizsgálatokat ebben az esetben elméletileg nincs értelme alkalmazni, főleg azért nincs, mert gyakran egyszerre több ilyen enzim is működik egy-egy baktériumtörzsben, és a potenciálisan szóba jövő inhibitor (klavulánsav) több enzimesoporthoz is inhibitora egyidejűleg, mely ampicillináz aktivitású, így a differenciálásuk nem is lenne lehetséges (lásd 9. oldal: 2. táblázat).

Mint az a 12. táblázatból szemléletesen és egyértelműen látszik (az egyes spektrumok a 12. Függelékben megtekinthetők), az ampicillin érzékeny és ampicillin rezisztens izolátumok jellegzetesen és nyilvánvalóan különböző peak-mintázatokat mutatnak.

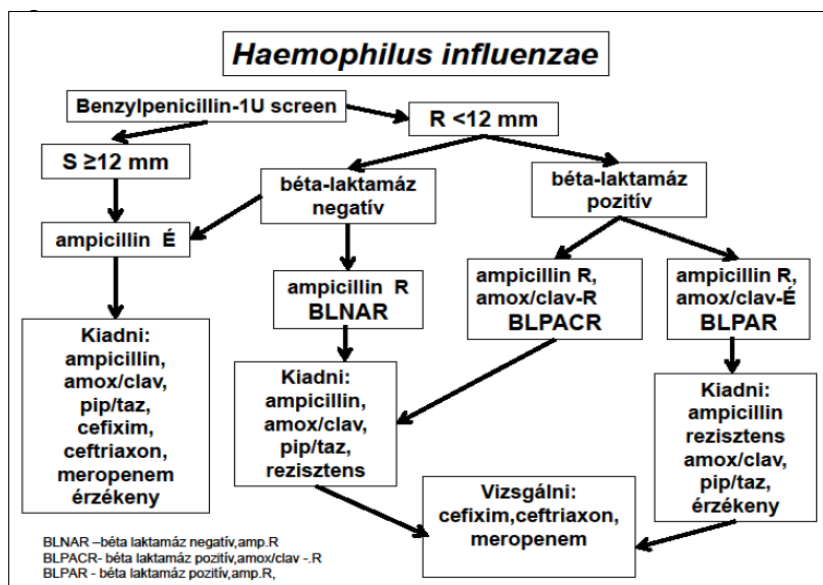
A táblázat nagyobb, felső paneljében az *Enterobacteriaceae* családból származó izolátumok láthatók. A zöld színnel jelölt ampicillin érzékeny fenotípust mutató törzsek (a felső három sor) mindegyike jellegzetes módon és következetesen olyan peak-mintázatot adtak, melyekben a natív termék jelei legtöbbször megtalálhatók, a 350 és 372 m/z értékű formáké pedig valóban mindig. A 388 és 390 m/z értékű termékek csak az esetek egy kisebb részében láthatók egyértelműen (de ez a tiszta ampicillin oldatában is ugyanígy történt). A bomlástermékeket képviselő peakek általában kisebb intenzitással szintén megjelentek, de ez a spontán bomlást vizsgáló kísérletből hozott szabály miatt nem okoz interpretálási zavart, ezek a minták ebben a tesztben is negatívak.

Az ampicillinnel szemben bármilyen rezisztencia fenotípust mutató törzsek esetében viszont (piros sorok a felső panelben) a peak-mintázat az előzőekhez képest karakteresen eltérő: a natív formák peakjei csak két kivételes esetben vannak jelen, a 324 és 368 m/z peakek az összes esetben egyértelműen detektálhatók. Több esetben látható egy 351 m/z értékű peak (lásd 12. Függelék), amelynek eredetét nem ismerjük, valószínűleg kontamináns peak, mert a tiszta oldatokban is jelen kis intenzitással, de az biztos, hogy nem azonos a közeli 350 m/z peakkel; itt nagyon kell figyelni, nehogy összekeverjük a két közeli peaket! A 390 m/z termék peakjei az esetek 80%-ában (12/15) egyértelműek, a maradék néhány esetben bizonytalanul ugyan, de láthatók. A 412 m/z termék peakje itt is, mint ahogy az egész kísérletsorozatban végig, látszólag véletlenszerűen jelenik meg, de előfordulása szinte mindig csak a pozitív izolátumoknál figyelhető meg (csupán egy kivételt találtunk a kísérletek során). Az eddigiek alapján az a szabály lenne megállapítható, hogy az ampicillin bontásán alapuló MALDI-TOF MS mérésekben azok az *Enterobacteriaceae* izolátumok definiálhatók pozitívként, azaz ampicillin bontására képes béta-laktamáz termelőként, amelyeknél a natív peakek közül egy sem marad meg a reakcióelegy felülúszójában, míg a hidrolízis termékek közül a 324 és 368 m/z mindig, a 390 m/z ~80%-ban, a 414 m/z pedig ~70%-ban jelen van, de a legutóbbi nem mindig egyértelműen detektálható intenzitással. Negatívként pedig azokat definiálhatnánk, amelyeknél a natív formák nagy jelintenzitással megmaradnak, a bomlástermékek pedig kis intenzitással a spontán bomlás révén még detektálhatók lehetnek.

A béta-laktamáz pozitív fenotípussal a kísérletbe került izolátumok közül kettőben viszont találunk érdekesebb eltérést is az előzőekhez képest. Az ESBL-termelő és az egyszerűbb aminopenicillinázokat termelő baktériumok által generált peak-mintázat egymástól nem is mutat különbséget, nem megkülönböztethetők. Az AmpC és karbapenemáz

enzimeket termelő két törzs viszont a natív termékek peakjeit is „meghagyták”, azaz az eddigi szabályok alapján akár negatívként is lennének definiálhatók, de a spektrumok alapján látható, hogy a 350 m/z peak csak az AmpC G1/84 törzsnél egyértelmű, a karbapenemáz pozitív G1/86-nál már csak nagyon határozatlan intenzitású peakként van jelen; a 372 m/z értékű peak pedig mindkét esetben csak minimális kis kiugrásként látszik a spektrumokon. Ebből arra következtetünk, hogy a peakek intenzitása ebben az esetben nagyon is fontos tényező az értékelés szempontjából és emiatt kiegészíthető az előzőekben létrehozott „pozitív definíció” azzal, hogy az említett bomlástermék peakjeinek egyértelmű jelenléte mellett vagy nincsenek vagy ritkán csak kis intenzitású jelekként vannak jelen a natív formák peakjei. Ez a két enzim egyébként a 8. és 10. táblázatban (61. és 64. oldal) szereplő eredmények alapján a cefotaxim bontási mintázatában is eltérő (és ehhez hasonlóan eltérő!) mintázatokat mutatott.

A 12. táblázat alsó paneljében a *Haemophilus* törzsek aminopenicillináz termelésének vizsgálati sémája látható. *Haemophilus* törzseknél az ampicillin- és amoxicillin/klavulánsav rezisztencia és a nitrocefin hidrolízis hagyományos eljárásai alapján különíthetjük el az izolátumokat három nagy csoportra: ezek a BLNAR, a BLPAR és a BLPACR. A módszer végeredményeként megismert csoport alapján pedig különbözőképpen interpretálandók az egyes izolátumok (52. ábra):



52. ábra

Haemophilus izolátumok BLNAR, BLPAR és BLPACR csoportjainak elkülönítése és interpretációja [137].

A 12. táblázatunkban szereplő első két törzs negatív kontroll (egy ATCC törzs és egy klinikai izolátum) (szintén zöld színnel jelölve). Ezek eredményei egybevágnak a negatív *Enterobacteriaceae* izolátumok eredményeivel: a natív peakek közül a 350, 372 és 388 m/z értékű peakek nagy intenzitással és mindig jelen vannak, a 394 m/z natív peak mindig, de csak gyenge jelként detektálható. Bomlástermékek jelei szintén az ampicillin enyhe, spontán bomlásának betudható szinten mozognak, szintén az előzőekhez hasonló módon.

BLNAR, vagyis béta-laktamáz negatív, de ampicillin rezisztens törzseknél az ampicillin rezisztencia nem béta-laktamáz aktivitás révén valósul meg (hanem PBP3) [133], vagyis kísérleteinkben itt nem is volt várható pozitív eredmény. Két ilyen vizsgált BLNAR törzs látható a negatív kontrollok után (szintén zöld színnel jelölt sorok). A kapott peak-mintázatok nem mutattak eltérést a negatív kontrolléhoz képest, igazoltuk tehát, hogy e két BLNAR törzsünk valóban nem termel ampicillin hidrolízisére képes béta-laktamáz enzimet.

A következő három izolátum (piros sorkiemelés) a hagyományos módszerek alapján (lásd 52. ábra) BLPACR törzsek, azaz béta-laktamáz pozitivitás mellett rezisztensek amoxicillin/klavulánsavra is, vagyis rendelkezniük kell aminopenicillinek hidrolízisére képes enzimmel. Ez a kísérletek alapján igazolódott is: tökéletesen eltűnt minden natív forma a reakcióelegyekből és szinte kivétel nélkül minden bomlástermék meg is jelent ezzel párhuzamosan (a 412 m/z peak itt is többször, de csak bizonytalanul detektálható).

BLPAR törzsekkel végzett kísérleteink eredményei nem egyértelműek. Már a 324 és 368 m/z bomlástermékek peakjeinek detektálhatósága is problémás, a 390 és 412 m/z peakek pedig nagyon alacsony intenzitásúak. A natív formák ugyanakkor jórészt eltűntek az egyik törzs esetében (G1/85) a reakcióelegyből, a másik izolátumnál viszont (G1/89) sajnos szinte mind jelen voltak az inkubáció után is. Ebből arra következtetünk, hogy ez utóbbi törzs valószínűleg nem BLPAR csoportba tartozó *Haemophilus*, bár a fenotípusvizsgálatok erre utaltak, itt kapott peak-mintázata alapján nagyobb valószínűséggel BLNAR. A G1/85 törzs valószínűleg tényleg BLPAR, de ezt az állítást a MALDI-TOF MS vizsgálattal nem tudtuk sem megerősíteni, sem kizárni: láthatóan van béta-laktamáz aktivitása, de az enzim aktivitása és affinitása különbözőnek tűnik a BLPACR-ekétől.

A 12. táblázat utolsó két sora két olyan izolátum eredményeit szemlélteti, melyekről hagyományos fenotípusos vizsgálatokkal csak nagyon bizonytalan eredmények születtek, de éppen az ilyen bizonytalanságok kiküszöbölése miatt keresünk új módszert ebben a témában is. Mindkét törzs esetében tehát ellentmondásosak voltak a hagyományos tesztek: az „amp09” izolátum esetén végül BLPACR (nitrocefín teszt bizonytalan), az „amp11” esetén pedig BLNAR (nitrocefín teszt negatív) csoportot állapítottunk meg és ezek alapján interpretáltunk a leleteken izolálásuk idején. A MALDI-TOF MS vizsgálatokkal mindkét törzsnél hasonló peak mintázatot nyertünk: mindkét baktérium reakcióegyében megtalálhatók maradtak jól detektálható intenzitással a natív formák peakjei is, a bomlástermékek pedig mind alacsony intenzitású jelekként voltak csak jelen. Ezt a mintázatot a BLNAR és a negatív kontrollként használt *Haemophilus*-ok esetében láttuk, ezek alapján tehát nagyon valószínű, hogy mindkét izolátum BLNAR törzs volt. Ez esetben tehát olyan MALDI-TOF MS méréseket sikerült elvégeznünk, melyek igazolhatóan felül tudták bírálni a hagyományos módszerek bizonytalan eredményeit és megfelelő interpretációra adtak volna lehetőséget (sajnos utólag és nem az izoláláskor tudtuk csak elvégezni a kérdéses törzsből a vizsgálatot).

A MALDI-TOF MS MBT ASTRA vizsgálatról tehát kijelenthetjük, hogy alkalmas arra, hogy a BLNAR és BLPACR/BLPAR *Haemophilus* izolátumokat egymástól egyértelműen és nagy hatékonysággal elkülönítse. Ez különösen fontos amiatt, hogy a leggyakrabban alkalmazott hagyományos módszer szerinti nitrocefín teszt sok esetben nem

teljesen objektív (a változó mértékű színintenzitás és a változó aktivitású vizsgált enzimek miatt), értékelése sokszor bizonytalan. A BLPAR törzsek esetében egyértelmű eredményeket nem sikerült kapnunk, de a BLNAR csoporttól való megkülönböztetésük ezzel a módszerrel is megoldhatónak látszik. BLPAR és BLPACR csoportok esetén láthatók ugyan különbségek a kapott mérési spektrumokon, ezek a különbségek azonban csak kis számú mintából származnak és nem elégséges minőségűek a biztos differenciáláshoz.

Elméleti feltételezésünk volt, hogy mivel a BLPACR törzsek (nevükből is érthető okok miatt) a klavulánsavas gátlásnak ellenállnak, és a BLPAR törzsek klavulánsavval gátolhatók (mivel szerin típusú penicillinázokat tartalmaznak), ezért inhibíciós párhuzamos reakciókkal elvileg e két csoport differenciálható lehet. Megkíséreltük tehát egy olyan vizsgálatot elvégzését, melyben az ampicillin bontási reakcióit inhibitoros párhuzamosokkal kombináltuk. A vizsgálatokba pozitív kontrollokként egyszerű ampicillin rezisztenciával rendelkező és ESBL-termelő *E. coli* izolátumokat is bevontunk, hogy a klavulánsavas inhibíció okozta peak-mintázat változása nyomonkövethető legyen (13. táblázat; az egyes mérések spektrumai a 13. Függelékben megtalálhatók).

#	faj	R	324	350	368	372	388	390	394	412
G1/118 + AMP	<i>Escherichia coli</i>	ampicillin R	+	-	+	-	-	+	-	+
G1/118 + AMP + klav			+/-	+	+/-	+	+	-	-	-
G1/125 + AMP	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL	+	-	+	-	-	+	-	+
G1/125 + AMP + klav			+/-	+	+/-	+	+/-	+/-	-	+/-
G1/101 + AMP	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPACR	+	-	+	-	-	+	-	+/-
G1/101 + AMP + klav			+/-	+	+	+/-	+	+/-	-	-
G1/32 + AMP	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPAR	+	-	+	-	-	+	-	-
G1/32 + AMP + klav			+	+	+	+/-	+	+/-	+/-	-
G1/106 + AMP	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPAR	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	-
G1/106 + AMP + klav			+	+	+/-	+	+	+/-	-	-
G1/85 + AMP	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPAR	+/-	+	+/-	-	-	-	-	-
G1/85 + AMP + klav			+/-	+	+	-	+	-	-	-

13. táblázat

Ismert izolátumok ampicillin bontási és klavulánsavas inhibíciós párhuzamos vizsgálata MALDI-TOF MS méréssel (lásd 13. Függelék).

A vizsgálatok eredményeiből látható, hogy az ampicillin bontásáért felelős szerin típusú béta-laktamázok klavulánsavas inhibícióval egyértelműen gátolhatók, a kísérlet eddig tehát sikeresnek mondható. A csak az egyszerű aminopenicillináz aktivitással rendelkező G1/118 *E. coli* törzs inhibíciója is tökéletesen működött, az inhibitoros párhuzamosban a bomlástermékeknek csak kis intenzitású peakjei voltak detektálhatók, az inhibitormentes párhuzamosban pedig csak a bomlástermékek jelei vannak jelen és mind egyértelmű intenzitással. Az ESBL-termelő *K. pneumoniae* (G1/125) vizsgálata során az előzőhöz nagyon hasonló peak-mintázatot kaptunk, de a inhibíciós reakcióban a 324 m/z értékű bomlástermék viszonylag nagyobb mértékben maradt meg (de még így is alacsony intenzitású).

A hagyományos módszerek alapján BLPACR-ként jellemzett *H. parainfluenzae* törzs (G1/101) szintén nagyon hasonló eredményeket produkált, ami viszont nagyon nem várt eredmény egy BLPACR baktériumnál, hiszen ezek az enzimek klavulánsavval elvileg nem gátolhatók. Emiatt azt gondolhatnánk, hogy a törzs valójában BLPAR enzimet termel, melynek az itt alkalmazott inhibitora – a klavulánsav – gátolja aminopenicillináz aktivitását, ahogy az a MALDI-TOF mérési eredményekből is látható, de a hagyományos eljárások

szerint amoxicillin/klavulánsav antibiotikumkorong módszerrel rezisztens volt. A két eredmény egymásnak ellentmondó, emiatt feltételezzük, hogy talán több enzim is működhet az adott baktériumban (BLPAR és BLPACR egyszerre).

Ugyanezt a mintázatot követi a BLPAR-ként identifikált *H. parainfluenzae* törzs is (G1/32), mely ezek szerint valóban BLPAR enzim termelésére képes.

A két további BLPAR-ként azonosított izolátumunknál (G1/106 és G1/85) (utolsó két sor a táblázatban) nem találtuk értelmezhetőnek az eredményeket.

Mindezek alapján a BLPACR és BLPAR törzsek biztos differenciálása MALDI-TOF MS inhibíciós módszerrel a rendelkezésünkre álló törzsekből nem volt megoldható.

Az ampicillinnel végzett MALDI-TOF MS MBT-ASTRA vizsgálatok a legtöbb esetben egyértelmű és jó értelmezhető eredményeket adtak. Sikerült definíciót alkotnunk a pozitívítás és a negativitás kimondására, azaz hogy az adott törzs rendelkezik-e ampicillin bontására alkalmas enzimaktivitással vagy sem. *Enterobacteriaceae* esetén aminopenicillinázok és ESBL enzimek működése kiválóan kimutatható (de nem megkülönböztethető!), AmpC és karbapenemáz enzimeknek az ampicillin különböző formáit hidrolizáló aktivitása kissé eltér a leggyakoribb béta-laktamázokétól (penicillinázok, ESBL-ek), ezért itt (is) nagy precizitással kell értékelni a nyers adatokat, viszont a módszer mindent egybevetve egyértelműen működőképes és eredményes.

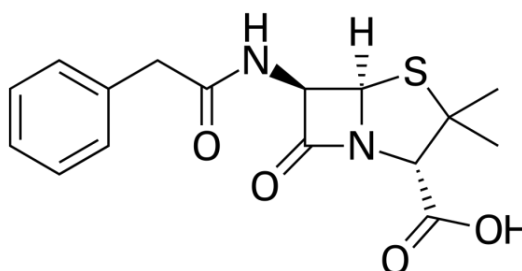
Mindezek ellenére alapvetően megkérdőjelezhető, hogy *Enterobacteriaceae* esetén mennyire releváns egy ilyen vizsgálat a klinikai gyakorlatban, hiszen tulajdonképpen a béta-laktamáz aktivitás igazolásán vagy elvetésén túl nem ad egyéb információt. Gyakorlatilag egy egyszerű ampicillin rezisztenciát okozó aminopenicillináz és egy ESBL enzim ugyanolyan peak-mintázatot és ugyanolyan eredményeket ad ampicillinbontásos MALDI-TOF MS vizsgálatban, sőt klavulánsavas inhibíciós kísérletben is, és egy „béta-laktamáz pozitív” eredmény nyilvánvalóan közel sem elegendő információ sok esetben. Mivel elég népes enzimcsaládról van szó, ezért nagyon nagy jelentősége van annak, hogy milyen enzim is végzi valójában az ampicillin hidrolízisét az adott izolátumnál, mert ez nyilvánvalóan alapvető módon befolyásolja a megfelelő interpretációból származó célzott terápia lehetőségeit a klinikus számára is.

Haemophilus törzsek BLNAR, BLPAR és BLPACR tulajdonságának felderítése hagyományos eljárásokkal is nehézkes, sok esetben nem teljesen objektív a nitrocefin hidrolízis különböző mértéke, sebessége és egyéb tényezők miatt, így a keletkező piros színreakció sem ad mindig egyforma és egyértelműen azonosítható eredményt. Kísérleteink során megpróbáltuk megkülönböztetni e három rezisztens csoportot egymástól MALDI-TOF MS MBT-ASTRA módszerrel is. Eredményként egyelőre kijelenthetjük, hogy a BLNAR és a BLPACR/BLPAR törzsek legtöbbször egyértelmű és szépen differenciálható eredményeket adott, a béta-laktamáz termelő törzseket viszont (BLPAR és BLPACR) egymástól egyelőre nem tudtuk elkülöníteni inhibíciós vizsgálatokkal sem.

18. MALDI-TOF MS mérések penicillin antibiotikummal

A penicillin a legelső olyan antibiotikum volt az emberiség történetében, melyet nagy mennyiségben és célzottan alkalmaztak különböző baktériumok okozta megbetegedések, fertőzések ellen. Hosszú múltja okán ma már alig találunk néhány olyan baktérium csoportot, melyek ellen biztonságosan bevethető lenne maga a penicillin vagy egyszerűbb szintetikus változatai, de azért vannak még ilyen baktériumok: a *Streptococcus pyogenes*, a *Clostridium perfringens* és a *Treponema pallidum pallidum* fertőzései esetén még manapság is az elsődlegesen alkalmazandó szerek között szerepel a penicillin. Az említett három kórokozó penicillinnel szemben mindig érzékeny, tehát a penicillin különböző vizsgálatainak szerepe főleg csak diagnosztikus, más kórokozóknál viszont, ahol alternatívaként lehet használni a penicillint, már van jelentősége. Ezek a baktériumok elsősorban a *Haemophilus*-ok, a *Neisseria gonorrhoeae*, az α - és β -hemolizáló *Streptococcus*-ok és a *Corynebacterium*-ok.

A kísérleteink megtervezését ebben az esetben is az alpmolekula, a penicillin-G, azaz a benzilpenicillin molekula és lehetséges bomlástermékeinek megismerésével kezdtük.



benzilpenicillin (penicillin-G) (C₁₆H₁₈N₂O₄S, 334,40 Da)

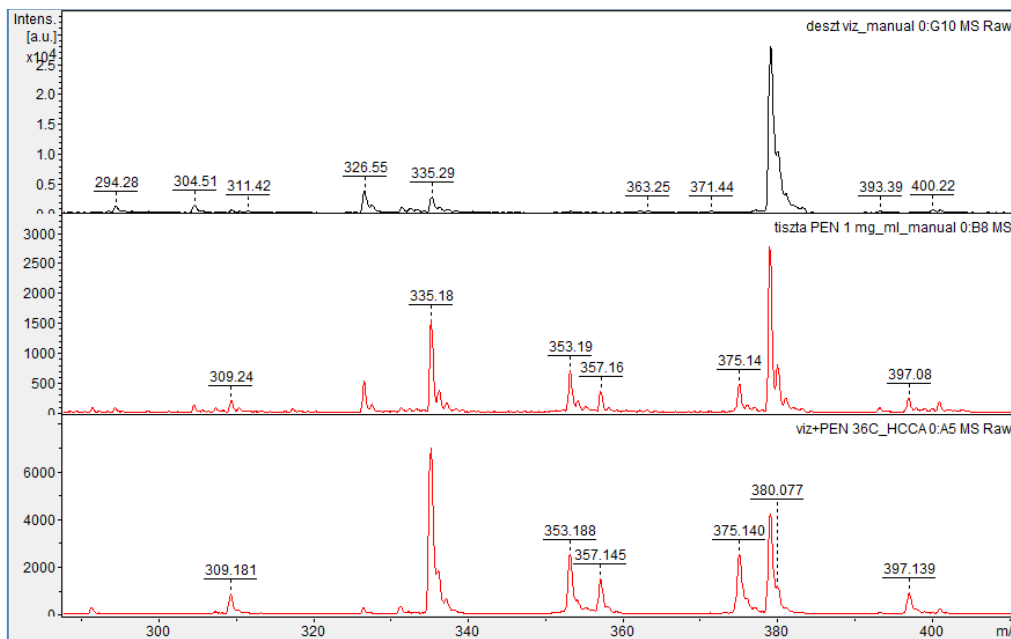
intakt formák	335 Da [M+H] ⁺	357 Da [M+Na] ⁺	380 Da [M+2Na] ⁺
módosult formák	hidrolízis	hidrolízis	hidrolízis
	353 Da [M _{hidr} +H] ⁺	375 Da [M _{hidr} +Na] ⁺	397 Da [M _{hidr} +2Na] ⁺
	spontán dekarboxiláció		
	309 Da [M _{hidr} -COO+H] ⁺		

53. ábra

Benzilpenicillin natív (zöld), és módosult (piros) formái

A benzilpenicillin natív molekulatömege 334 Da, protonált formája 335 Da, nátrium ionokkal alkotott formái pedig 357 és 380 Da. Ezek tehát az intakt penicillin oldatban

detektálható molekulák. Bomlástermékei mindezek hidrolizátumai: 353, 375 és 397 Da, a 353 Da-os $[M_{\text{hidr}}+H]^+$ forma spontán dekarboxilációval pedig tovább módosul egy 309 Da-os molekulává. Előzetes validitásvizsgálatunkban ezeket a peakeket kell keresnünk.



54. ábra

Penicillin validitásvizsgálatok.

Vak víz kontroll; benzilpenicillin 1 mg/ml 4°C; benzilpenicillin 1 mg/ml 36°C 240'.

Mint ahogy az az 54. ábrán látható, a penicillin keresett natív formái mind szépen sorban detektálhatók MALDI-TOF MS mérésel. Sajnálatos módon azonban ezek mellett az összes bomlástermékhez tartozó peak is jelen van ugyanilyen szépen, tehát az értékelés penicillin esetében is várhatóan nehézkes lesz.

A bomlástermékek nagy intenzitású jelenléte mellett (mely az ampicillinnél tapasztaltak mértékét egyébként jóval meg is haladja) két másik problémát is észlelhetünk már ezekből a validáló spektrumokból is:

- Egyrészt a 335 Da-os $[M+H]^+$ alpmolekula egybeesik egy szinte minden kísérletben jelenlévő kontamináns peakkel, mely szintén éppen 335 m/z értéknél található kisebb-nagyobb intenzitással kísérleteink során. Az oldatunkból származó penicillin 335 m/z értékű peakjének intenzitása nyilvánvalóan jóval nagyobb (az ábrán látható mértékben) a kontaminánsétól, de ez az egybeesés komoly problémákat okoz, a két peak ilyen megközelítésű differenciálása nem objektív.
- Másrészt a 380 Da-os $[M+2Na]^+$ forma peakje jelentős átfedésben van a kísérletekben használt α -CHCA mátrix dimer molekula 379 m/z értékű jelével, ami szintén hátráltatja a mérések értékelhetőségét. Sok esetben látható a különbség, a felbontás növelésével ez a különbség jobban is látható, de a mátrix dimer peakjének általában nagyon nagy intenzitása a várhatóan változó intenzitású közeli peak detektálhatóságát erősen ronthatja. Ha mindeképpen szükség volna ilyen penicillines MALDI-TOF MS MBT-ASTRA mérésekre, akkor másfajta mátrix használatát javasoljuk.

Mindezek miatt, ismertén béta-laktamáz pozitív törzsekkel végeztünk egy olyan gyors áttekintésre lehetőséget adó tesztsorozatot, melyben igyekeztünk felmérni, hogy egyáltalán alkalmazható-e, van-e létjogosultsága a felsorolt komoly hátrányok ellenére a penicillinnel végzendő MALDI-TOF MS érzékenységvizsgálatoknak.

				309	335	353	357	375	380	397
#		faj	R							
-	-	-	tiszta penicillin 36°C 240'	+	+	+	+	+	+	+
amp21	T/505/E	<i>Escherichia coli</i>	ampicillin É	+	+	+/-	+	-	+	-
amp19	G1/3265/2015	<i>Citrobacter braakii</i>	ampicillin intr R	+	+	+	+/-	+	+	+
amp15	QC 51/2015/II	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ESBL	+	+	+	+/-	+	+	+
G1/20	G1/4119/2017	<i>Enterobacter cloacae</i>	ESBL	+	+	+	-	+	+	+
G1/38	G1/361/2018	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL	+	+	+	-	+	+	+
G1/4	amp04 G1/3024/2015	<i>Escherichia coli</i>	ESBL	+	+	+	-	+	+	+
G1/84	LK/16616/2018	<i>Escherichia coli</i>	karbapenem-R	+	+	+	-	+	+	+/-
G1/86	G1/2978/2018	<i>Enterobacter asburiae</i>	AmpC	+	+	+	-	+	+	+/-
G1/3	amp06 G1/3255/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPACR	+	+	+	+/-	+	+	+
amp08	G1/3154/2015	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	BLPACR	+	+	+/-	+	-	+	-

14. táblázat

Penicillin enzimátikus bontásának vizsgálata MALDI-TOF MS mérésekkel (spektrumok a 14. Függelékben).

A vizsgálatok eredményei alapján nem találtunk olyan egyértelmű marker peaket, mely révén az enzimátikus tevékenység biztonsággal elkülöníthető volna a penicillin spontán hidrolízisének nyomaitól. Sem a natív formák hiányából, sem a bontási termékek jelenlétéből nem lehet olyan egységes szabályszerűséget alkotni, amely segítségünkre lehet az eredmények megfelelő értékelésében. Egyetlen jellegzetességet észleltünk: a 357 m/z értékű peak a béta-laktamáz termelő törzsekkel való inkubáció után az esetek 55%-ában teljesen eltűnt, 89%-uknál pedig vagy egyáltalán nincs meg vagy maximum csak nyomokban detektálható. Ez valószínűleg jó irány lehet az értékelésben, de a korábbi vizsgálatokban egyértelműen pozitívnak ítélt törzsek közül többnél is kaptunk ellentmondó eredményt erre vonatkozólag is.

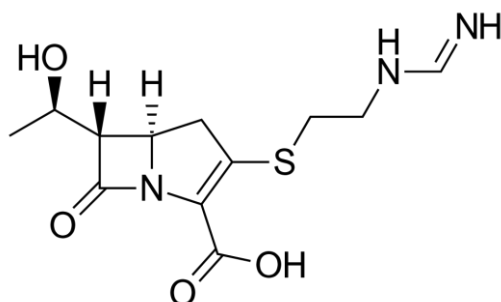
Az alap molekula spontán bomlásának elfogadhatatlanul nagy mértéke és az ebből adódó bomlástermékek állandóan nagy intenzitású jelenléte, a várt peakek átfedése a mátrixként használt molekula jelével, az értékelésnél felmerülő nehézségek és nyilvánvaló ellentmondások, és nem utolsósorban az antibiotikum vizsgálatának alacsony relevanciája miatt azt a döntést hoztuk meg, hogy a benzilpenicillin MALDI-TOF MS MBT-ASTRA vizsgálatokra nem megfelelő.

19. MALDI-TOF MS mérések imipenem antibiotikummal

Az imipenem az egyik legszélesebb körben és valószínűleg a leggyakrabban használt karbapenem antibiotikum. A karbapenemek szintén a béta-laktám antibiotikumok csoportjába tartoznak, hatásmechanizmusuk is ugyanúgy a sejtfallszintézis gátlása révén valósul meg. Szerkezetük kis mértékben különbözik: az 1. helyzetben lévő S-atom helyett itt C-atom van a karbapenem gyűrűben és ebben az öttagú gyűrűben egy telítetlen kötés is megtalálható. Eredetileg *Streptomyces*-termékként fedezték fel a karbapenemeket (thienamycin), ma már szintetikus származékokat használunk (imipenem, meropenem, ertapenem). Klinikai terápiás jelentőségük rendkívül nagy, mert a szélesspektrumú béta-laktamáz enzimek legnagyobb és leggyakoribb csoportjába tartozó ESBL enzimek a karbapenemeken kívül minden egyéb hagyományos béta-laktám antibiotikumra rezisztensek, azaz olyan esetekben, ha ESBL-termelő kórokozó kerül izolálásra, általában karbapenemek jelentik az elsődleges lehetőséget egy sikeres terápia felé.

Karbapenemekkel szembeni rezisztenciát a baktériumok számára, ha a ritkábban előforduló, valamilyen enzimatisz antibiotikum módosítás révén elért rezisztenciáról van szó, a béta-laktamáz enzimescsoportnak főként két típusa képes biztosítani: egyrészt a Class A 2f csoportba tartozó enzimek közül például a KPC *Klebsiella pneumoniae*-ben, másrészt a Class B metallo-béta-laktamázok (pl. VIM, IMP, NDM). A két csoport enzimeinek működése különböző specifikus inhibitorokkal gátolható: az első csoportnál az APBA, a másodiknál az EDTA lehet a specifikus gátlószer.

Az imipenem natív molekulatömege 299 Da, ennek protonált $[M+H]^+$ formája 300 Da (pozitív ionizációs MALDI-TOF MS mérésben a protonált formák mutathatók ki). Hidrolitikus terméke elméletileg 318 Da ($300+18=318$), tehát 318 m/z értékű peak formájában jelentkezhet enzimatisz hidrolízisre utaló jel a spektrumokon. Imipenem esetében nincsenek egyéb természetes formák a natív és intakt imipenem oldatokban sem.



imipenem ($C_{12}H_{17}N_3O_4S$, 299,347 Da)

intakt formák	300 Da $[M+H]^+$
módosított formák	hidrolízis
	318 Da $[M_{hidr}+H]^+$

55. ábra

Imipenem natív (zöld) és enzimatisz módosított (piros) formái.

A spektrometriai mérések értékelése tehát ezek alapján végtelenül egyszerűnek tűnik: míg natív formában a 300 m/z jele, addig hidrolizátum esetén ennek eltűnése és a 318 m/z hidroíziszt termék megjelenése várható imipenem rezisztenciáért felelős enzimaktivitás detektálásakor a MALDI-TOF MS mérés során az elmélet szerint.

Kísérleteinket egy karbapenemáz termelő törzssel kezdtük (G1/84 karbapenemáz termelő *E. coli*), mely a Szent László Kórházban került izolálásra (16616/2018). A törzs (a mi vizsgálataink szerint is) hagyományos korongdiffúziós antibiogramon és módosított Hodge-tesztel is karbapenemáz termelőnek bizonyult.

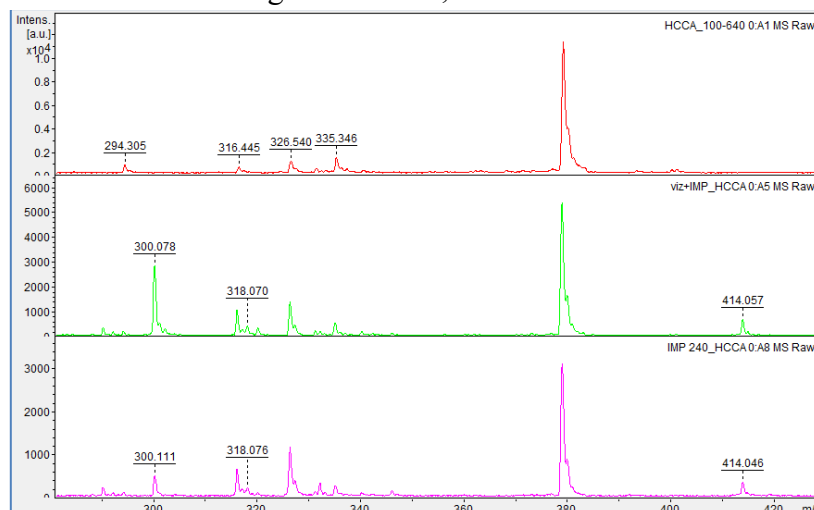


56. ábra (saját fotók)

Balra: Módosított Hodge-teszt karbapenemáz termelő *E. coli* izolátummal (16616/2018, G1/84).

Jobbra: 50 mg/ml EDTA inhibíciós hatása karbapenemáz aktivitásra (MER, ETP, IMP) (16616/2018, G1/84). (10 µl 50 mg/ml EDTA az alsó steril korongra cseppentve, majd száradás után a felkent pázsitra helyezve; a felső korong csak az antibiotikumot tartalmazza)

A kísérletek első lépésében lemértük a vizsgálatok validitásához szükséges teszteket (vak kontroll, natív antibiotikum negatív kontroll, natív antibiotikum inkubálás után).



57. ábra

Imipenem bevezető mérések:

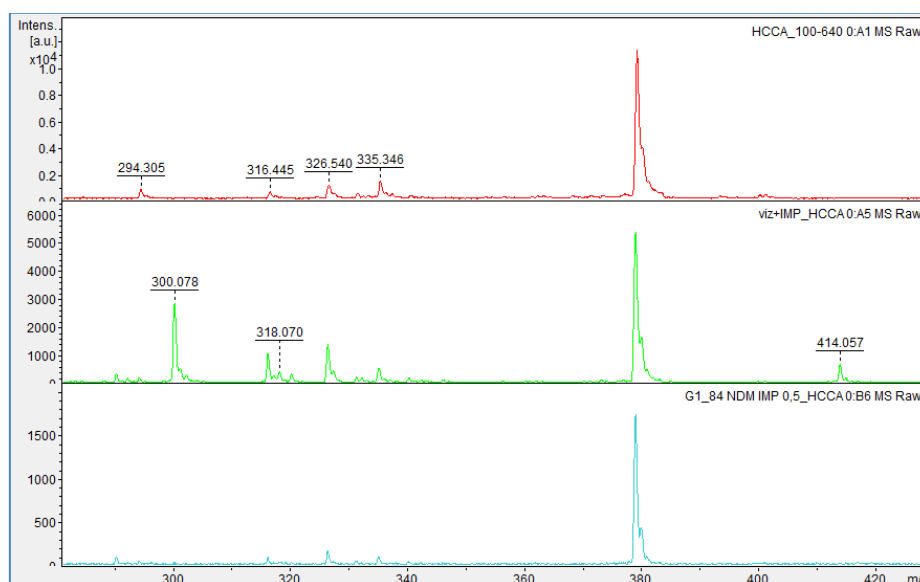
Felső panel: csak víz vak kontroll.

Középső panel: csak imipenem (0,5 mg/ml) intakt oldat.

Alsó panel: csak imipenem (0,5 mg/ml) 36°C-on 240 percig inkubált oldat.

A kezdő mérések eredményeként azonosíthatók a vízben lévő kis intenzitású kontamináns peakek. A natív imipenem oldatában jól látható a 300 m/z értékű $[M+H]^+$ molekula, alacsony intenzitással a spontán hidrolizált forma is kivehető a spektrumon kis jelerősséggel. A 240 percig 36°C-on inkubált tiszta imipenem oldatból ugyanezeket a jeleket mértük. Az intenzitás itt alacsonyabb, de ez az eltérés a műszeres mérésnek tudható be (lásd a spektrumok bal oldali skálabeosztását!). Mindkét mérésnél jelen van még egy 414 m/z értékű jel is imipenem oldatokban, melynek eredetét nem ismerjük. Mindezekből azt a következtetést vontuk le, hogy az imipenemnél kis mértékű spontán hidrolízis tapasztalható, de a hosszú idejű 36°C-os inkubáció ennek mértékét a mérést ellehetlenítő mértékben nem befolyásolja. (379 m/z értékkel, nagy intenzitással, itt is az α -CHCA mátrix dimer peakje látható.)

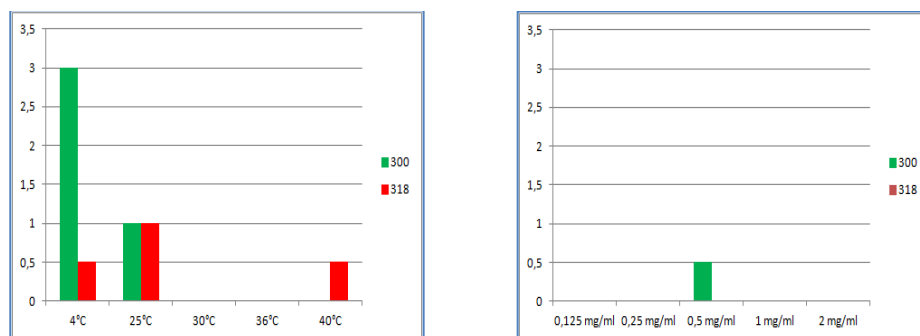
Az 58. ábra alsó paneljén látható az imipenemmel végzett első valós eredmény: a G1/84 tökéletesen elbontotta a 300 Da-os terméket, a hidrolízis termék jele nem volt detektálható.



58. ábra

Karbapenemáz aktivitás detektálása imipenemmel (G1/84 karbapenemáz termelő *E. coli*).

A reakció optimalizáló lépéseit ezzel a törzssel végeztük el és a többi antibiotikummal végzett kísérleteknél is használt score rendszer mintájára értékeltük. Az összesített eredményeket az 59. ábrán szemléltetjük (hőmérséklet és imipenem koncentrációk):

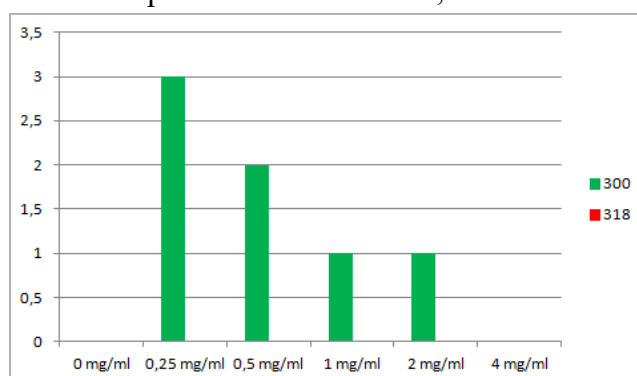


59. ábra

Karbapenemáz aktivitás mérésének optimalizálása (hőmérséklet és imipenem koncentráció) (G1/84).

Az optimalizálás során nyert adatokból látható, hogy az adott karbapenemáz enzim aktivitása 25°C-on még nem teljes, 30 és 36°C-on éri el maximumát. A 40°C-on ismét megjelenő 318 Da-os hidrolízis termék megjelenéséből arra következtetünk, hogy annak eltűnése a reakcióelegyekből valószínűleg további enzimtevékenység eredménye, mely enzimműködéshez ez a hőmérséklet már nem megfelelő. Az optimális koncentráció beállításából kapott eredmények alapján ismét a 0,25 és 0,5 mg/ml koncentrációk a legmegfelelőbbek (egyetlen nagyon kis intenzitású, natív jel volt észlelhető az egyik mérés spektrumában), az 1 és 2 mg/ml-es oldatoknál ismét egyre erősödő és a mérési hatékonyságot már zavaró effektus látszik a spektrumokon. Az inkubációs idő irodalmi leírások alapján [120] már akár 30 perc is lehet, a mi eredményeink is igazolták ezt, vagyis valóban egy gyorsdiagnosztikai eljárásról van szó itt is. Ennek ellenére továbbra is ragaszkodtunk az eddigi 120 perces inkubációs időhöz, mert nem csak a specifikus karbapenemázok kimutatása lehet célunk, de azoknak az enzimeknek is, melyek lassabban ugyan, de mutathatnak karbapenemáz aktivitást.

Megkíséreltünk egy APBA inhibitoros vizsgálatot is a törzssel, noha az APBA nem specifikus inhibitora az NDM típusú metallo-béta-laktamázoknak. Az eredmények viszont megkérdőjelezték, hogy a törzsben valóban metallo-béta-laktamáz enzim működik-e, ugyanis valódi, gátolt reakciókat kaptunk alacsonyabb APBA koncentrációkon, ezek alapján felmerült, hogy a hordozott enzim valójában a Class A 2f csoportba tartozik, azoknál lehetséges ugyanis az inhibíció előidézése APBA-val. Ennek tisztázására elvégeztük a metallo-béta-laktamáz enzimek specifikus inhibitorával, EDTA-val is az előzőeket:



60. ábra

Karbapenemáz aktivitás gátlása APBA emelkedő koncentrációiban (G1/84 *E. coli*).

Az elvégzett vizsgálatok alapján kijelenthető, hogy az adott törzsben egy olyan enzim is működik, mely APBA-val gátolható, ilyen enzimek a Class A 2f típusú karbapenemázok. Következtetésünk szerint az adott *E. coli* izolátumban kétféle karbapenemáz is működik: egyrészt a gyorsan, gyors diagnosztikai eszközökkel is kimutatható NDM metallo-béta-laktamáz, másrészt egy Class A 2f karbapenemáz.

Mindezek után egy screen jellegű vizsgálatot hajtottunk végre olyan további, törzsgyűjteményi izolátumainkkal, melyeknél az előzőleg elkészített hagyományos antibiogramjaikon felmerült az imipenemmel szembeni rezisztencia vagy csökkent érzékenység.

	300	318			300	318		
G1/49 + IMP	+	-	<i>E. coli</i>	G1/28 + IMP	+	-	<i>E. coli</i>	
G1/49 + IMP + APBA	+	-	ATCC 25922	G1/28 + IMP + APBA	+/-	-	ESBL, MDR, IMP-É	
G1/2 + IMP	+	-	<i>E. cloacae</i>	G1/60 + IMP	+	-	<i>P. aeruginosa</i>	
G1/2 + IMP + APBA	+	+/-	IMP-M	G1/60 + IMP + APBA	+	-	IMP-R	
G1/5 + IMP	+	-	<i>E. coli</i>	G1/86 + IMP	-	-	<i>E. asburiae</i>	
G1/5 + IMP + APBA	+/-	-	IMP-R	G1/86 + IMP + APBA	+	-	AmpC, IMP-M	

15. táblázat

Karbapenemáz aktivitás screen különböző baktériumtörzseken.

A vizsgálat eredményeit a 15. Függelék is szemlélteti. A negatív kontrollként használt ATCC 25922 *E. coli* természetesen teljesen negatív reakciót mutatott: sem a csak imipenemet, sem az imipenemet és APBA gátlószert tartalmazó reakcióelegyből sincs hidrolízisre utaló jel.

A G1/28 *E. coli* törzs *in vitro* imipenem érzékenyként ismert izolátumunk, de széleskörű egyéb MDR jellege miatt került be a vizsgálatba, mint érdekesebb negatív kontroll. A csak imipenemet tartalmazó reakcióelegyben nem volt képes bontani az imipenemet, a natív forma jelintenzitása csökkent a gátlószertel kiegészített párhuzamosban, de hidrolizátum jele egyik esetben sem detektálható. Azaz ez a baktérium is negatív ebben a vizsgálatban, valóban nem termel karbapenemáz aktivitású enzimet.

Mivel a törzsek legtöbbje a csak imipenem antibiotikummal való inkubálás utáni reakcióelegyből nem adott semmilyen, a hidrolízisre utaló peakmintázatot, ezért ezekről kijelenthető, hogy imipenem rezisztenciájukat nem béta-laktamáz aktivitás alapján nyerik, hanem valószínűleg egy összességében egyébként is gyakoribb karbapenem rezisztencia-mechanizmus révén: egy porin fehérje hiánya vagy jelentősen csökkent expressziója váltja ki rezisztenciájukat vagy csökkent érzékenységüket (ennek eredményeként semennyi vagy csak kevesebb antibiotikum jut be a sejtbe). Ezt *Pseudomonas*-oknál az OprD porin fehérje [138], *Enterobacteriaceae* tagjainál az Omp fehérjékhez tartozó porinok génjeinek elvesztése vagy expressziójuknak főleg különböző genetikai okok miatt történő visszaesése okozza [139]. Ilyen, porin fehérje eltérés okán imipenem rezisztens vagy csökkent érzékenységet mutató törzsek tehát: a G1/2 *E. cloacae*, a G1/5 *E. coli* és a G1/60 *P. aeruginosa* izolátumok.

A G1/86 *Enterobacter asburiae* esetében azonban olyan eredményt látunk, amelyet a kísérlet megtervezésekor vártunk (ilyen jelmintázatot produkált a pozitív kontrollként az optimalizálásnál és előzetes vizsgálatoknál használt G1/84 karbapenemáz pozitív *E. coli* törzs is). Előzetes D68C tesztünk alapján tudjuk, hogy a törzs AmpC-termelő, bár ezt a cefotaxim + APBA inhibíciós MALDI-TOF MS kísérletek során nem sikerült a műszeres módszerrel is igazolni (lásd a 61-62. oldalon). A most kapott spektrumokon (15. Függelék) a csak imipenemet és baktériumot tartalmazó reakcióelegyből tökéletesen eltűnt a 300 m/z értékű peak, azaz volt imipenem ellen irányuló hidrolitikus enzimaktivitás, míg az APBA-t is tartalmazó reakcióelegyben megmaradt ennek a 300 Da-os natív formának a jele hidrolitikus termék pedig nem volt, azaz a reakciót sikerült gátolni. Ez pedig bizonyíték arra, hogy APBA-val gátolható enzim révén történt az első reakcióban lezajlott tökéletes hidrolízis. Ez azonban itt még nem elégséges bizonyíték arra, hogy ez az enzim valóban karbapenemáz lenne!

Az APBA-val gátolható enzimek, melyek képesek karbapenemeket hidrolizálni a Class A 2f csoport tagjai. Ismert volt törzsünkről megbízható D68C teszteredmény révén, hogy AmpC-termelő, vagyis Class C csoportba tartozó enzimmel rendelkezik, amelyik viszont szintén gátolható APBA-val (vagyis most az APBA itt nem „elégge” specifikus inhibitor). Főleg *Pseudomonas aeruginosa*-nál ismert [140], de *Enterobacteriaceae* tagjainál is előfordul [141] az a jelenség, hogy az AmpC enzim nagyon nagy mennyiségű termelésével, ún. over-expressziójával a baktérium karbapenem rezisztenciát vagy csökkent érzékenységet is tud szerezni. Az over-expresszió indukciója pedig valamilyen antibiotikum is lehet. Feltételezésünk szerint, az imipenem itt így viselkedhetett.

Nagyon nagy jelentősége van annak a ténynek, hogy az AmpC enzimek túltermelése karbapenem rezisztenciát vagy csökkent érzékenységet hozhat létre egyes baktériumokban, mert az ESBL és az „egyszerűbb” AmpC termelő izolátumoknál az elsőként felmerülő lehetséges terápiás irány a karbapenemek használata. Vagyis mindenképpen eldöntendő kérdés az, hogy az AmpC-termelés túltermelés-e, mely a többi béta-laktám antibiotikummal szembeni rezisztencián kívül okozhat karbapenemekkel szembeni rezisztenciát is!

A kísérletek alapján tehát a karbapenemáz aktivitás igazolható ugyan APBA és EDTA gátlószerek alkalmazásával MALDI-TOF MS és más vizsgálatokban, de ha az APBA inhibíciós reakcióiból kapunk pozitív eredményeket, és összesen csak ennyi információ áll rendelkezésünkre, akkor még ez nem elegendő annak eldöntésére, hogy vajon Class A 2f karbapenemáz enzim, vagy overexpresszált Class C AmpC enzim működik-e az adott izolátumban, mely a karbapenem rezisztenciát előidézi.

Ha viszont a vizsgálati módszereket kombinálva használjuk, és tudjuk, hogy izolátumunk AmpC-termelő (pl D68C teszt), hagyományos korongdiffúzióval imipenemre csak mérsékelten érzékeny, esetleg még a nem túl megbízhatónak tartott módosított Hodge-teszttel is kétes, de pozitívnak tűnő eredményt ad, mindezek mellett pedig MALDI-TOF MS inhibíciós módszerrel bizonyítjuk, hogy imipenem hidrolízisre képes a törzs, mely APBA-val gátolható, akkor az eddigi adatokból nagy valószínűséggel megállapítható, hogy az izolátum AmpC over-expresszálo és ellene emiatt semmilyen karbapenemet nem szabad használni, mert az biztos terápiás kudarcot jelentene az így kezelt betegnél.

Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy az imipenem enzimatis hidrolízisén alapuló MALDI-TF MS módszer önmagában kiválóan működik, specifikus inhibitor párhuzamos reakciók alkalmazása azonban mindig kötelező a csak imipenemet tartalmazó reakcióelegyek mellett. Akár AmpC over-expresszálo, akár valós karbapenemáz aktivitású a vizsgált törzs, egyik esetben sem indulhat nála karbapenem terápia, de nem szabad abba a tévedésbe esni, hogy karbapenemázként interpretálunk egy AmpC túltermelő izolátumot.

A kérdés itt azért nem csak elméleti szörszálhasogatás, mert ennek a tesztnek a hagyományos szerepén túl (vagyis azon kívül, hogy megállapítsuk vele egy izolátumról, hogy van-e benne imipenem hidrolízisére alkalmas enzim vagy nincs), még arra a célra is nagyon fontos eszköz lehet, hogy az AmpC enzimekről megállapíthassuk azok további típusát az

adott baktériumban. És mint láttuk, AmpC gyanús törzsek esetében erre szükség is lenne, hogy elkerüljünk egy terápiás kudarcot, ha karbapenemet kap a beteg, de a kórokozó AmpC enzime over-expresszált és ezt az over-expressziót az imipenem még indukálja is.

A cefotaximmal és APBA-val végzett vizsgálatok során nem sikerült igazolni a D68C teszt révén AmpC-termelőként ismert G1/86 *Enterobacter asburiae* törzsünkről, hogy valóban AmpC-enzim termelő volna vagy sem. Voltak közvetett jelek ezekben a MALDI-TOF MS vizsgálatokban is arra, hogy valóban az, de biztosan igazolni ott még nem tudtuk. A konkrét bizonyíték érdekes módon itt, az imipenemmel folytatott kísérletek során került elő.

Az imipenem MALDI-TOF MS érzékenységvizsgálati módszer önmagában tehát tökéletesen működőképes, de nagy figyelemmel kell lenni az inhibitoros párhuzamosokkal kapott eredményekre és ezek tükrében szabad csak biztosan karbapenemáz enzim termelését interpretálni az eredmények alapján.

Emellett, mint láthattuk, az imipenem MALDI-TOF MS érzékenységvizsgálat nem csak az imipenem rezisztenciák közvetlen kimutatására lehet alkalmas, hanem eredményeit más tesztek eredményeivel kombinálva, végül sokkal részletesebben is megismerhetjük a vizsgált baktériumok rezisztenciaviszonyait.

20. MALDI-TOF MS mérések ciprofloxacin antibiotikummal

A fluorokinolok napjainkban talán az egyik leggyakrabban alkalmazott antibiotikumok világszerte az összes antibiotikum közül. Akár Gram-negatív, akár Gram-pozitív kórokozóról legyen is szó, a fluorokinolonok szinte minden esetben a potenciálisan alkalmazható szerek listájában szerepelnek. A Gram-negatív bélbaktériumoktól egészen az MRSA-ig hosszan sorolhatók volnának azok a baktériumok, melyeknél lehet terápiás szerepe ennek az antibiotikumcsoportnak. Rövidebb a lista azokról a baktériumokról, melyek természetes

rezisztenciával rendelkeznek némelyik vagy mindegyik fluorokinolonnal szemben: anaeroboknál találunk intrinsic rezisztenseket, Gram-pozitív baktériumok mind intrinsic rezisztensek az 1. generációs fluorokinolonokra (nalidixsav), *Streptococcus*-ok ellen csak a ≥ 3 . generációs fluorokinolonok hatásosak (pl. levo- és moxifloxacin), *Enterococcus*-ok ellen általánosan gyenge hatásúak a fluorokinolonok és az alkalmazás során gyakran és gyorsan ki is alakulhat ellenük erőteljes rezisztencia [142, 143, 144, 145].

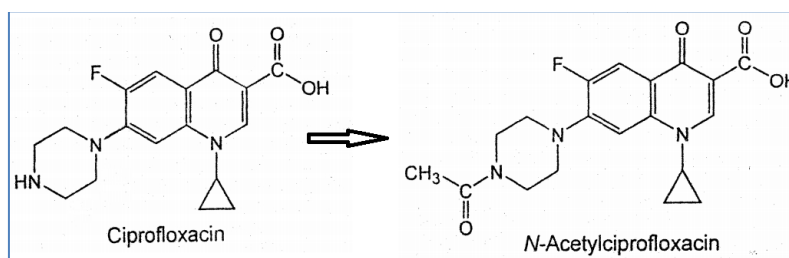
A kinolon rezisztencia gyakoribb formái a mutáció útján kialakuló és az ún. szerzett rezisztenciák. A kinolon antibiotikumok hatásmechanizmusának lényege, hogy képesek kötődni a DNS molekula le- és feltekerésében szerepet játszó két fontos bakteriális enzimhez: a DNS-girázhoz és a topoizomeráz IV-hez. A különböző kinolonok különböző affinitással tudnak kötődni targetjeikhez, illetve általánosan jellemző, hogy a Gram-negatív baktériumoknál gyakoribb a giráz ellen irányuló hatás, Gram-pozitívaknál pedig a topoizomeráz IV ellen erősebb a hatás. Ezen enzimek mutáció révén olyan még funkcióképes változásokon mehetnek át, mely formákhoz a kinolonok már kisebb affinitással tudnak kapcsolódni, és így elmaradhat a kinolonok általános DNS-replikációs gátlása és a kötődésük miatti konkrét és letális DNS-károsodás [146].

Ritkább előfordulásúak azok a rezisztenciamechanizmus típusok, amelyeknél a baktériumok plazmidokon szereznek olyan géneket, melyek termékei nagyon hatékonyan juttatják ki a sejtekből a kinolon antibiotikumokat (efflux-pumpák), vagy pedig olyan géneket, melyek fehérjetermékei a kinolonok módosítására és ezáltal hatástalanítására képes enzimek. Ezek azok az enzimek, amelyek most kísérleteink szempontjából most nekünk is nagyon fontosak. Ezeknek az enzimeknek az a különleges érdekessége, hogy eredetileg más antibiotikumok, az aminoglikozidok módosítására hivatott enzimek, de néhány aminosavnyi módosulásuk révén fluorokinolonok ellen is hatásosakká váltak, és természetesen el is terjedtek. A jelenséget 2003-ban fedezték fel egy sanghaji *E. coli* izolátum kapcsán [147], a plazmidok útján történő rendkívül sikeres terjedésnek köszönhetően viszont mára már világszerte is elterjedt, viszonylag gyakori rezisztencia mechanizmusról van szó [148].

Különösen nagy jelentősége van annak is, hogy igen gyakran társul ez a rezisztenciamechanizmus ESBL termelés mellé, mert általánosan is nagyon gyakori az a jelenség, hogy ugyanazon az egy plazmidon kerül be egy baktériumba két, vagy akár több, rezisztenciáért felelős génkazetta is. Ez az ESBL mellé társuló rezisztenciagén pedig gyakran az a bizonyos *aac(6')-Ib-cr* gén is lehet, melyről a kinolok módosítására alkalmas és a fluorokinolon-rezisztenciáért felelős acetiltranszferáz enzim íródik át [146].

Az enzimátikus folyamat ebben az esetben, melyet ez az enzim végrehajtani képes, az előzőekben tárgyaltaktól eltérően nem hidrolitikus reakció, hanem acetiláció. A mindezért felelős enzim az AAC(6')-Ib-cr nevezetű enzim, mely tehát egy acetiltranszferáz, vagyis acetilcsoportot köt target molekulájára, esetünkben a ciprofloxacín piperazin gyűrűjének amino N-atomjára, ennek hatására pedig az antibiotikum természetesen hatástalanná válik. Szerencsére nem minden fluorokinolon molekuláján képes végrehajtani ezt a módosítást az enzim, de ilyen módosításra alkalmas amino N-atomot tartalmaz a leggyakrabban alkalmazott

fluorokinolon antibiotikum, a ciprofloxacin és a norfloxacin is (de pl. a levofloxacint és a moxifloxacint védettebb N-atomjuk miatt nem képes így acetilálni).



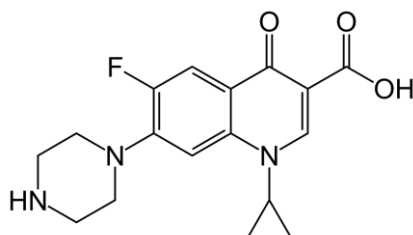
61. ábra

Ciprofloxacin és N-acetil-ciprofloxacin [150].

(A 61. ábrán bemutatott képek a hivatkozott forrásban szereplő ábrának csak feldolgozott részletei.)

(A témához kapcsolódóan esetleg érdekes lehet, hogy a ciprofloxacin molekula emlős szervezetben történő, több úton zajló lebontásának egyik terméke többek közt ugyanez az N-acetil-ciprofloxacin [149], de ez a metabolikus út és termék egy *Mucor* fajtól is ismert [150].)

A ciprofloxacin rezisztenciáért felelős bakteriális AAC(6')-Ib-cr enzim tehát módosítást végez a ciprofloxacin molekulán. Ez a módosítás acetiláció, mely egyértelműen meghatározható tömegnövekedéssel jár az eredeti molekula tömegéhez képest. A változás mindezek alapján tehát MALDI-TOF MS MBT ASTRA módszerrel nyomon követhető, vagyis az enzimatikusan módosított termék spektrometriásan detektálható (62. ábra).



ciprofloxacin (C₁₇H₁₈FN₃O₃, 331,346 Da)

intakt formák	332 Da [M+H] ⁺	354 Da [M+Na] ⁺	370 Da [M+K] ⁺
módosított formák	acetiláció	acetiláció	acetiláció
	374 Da [M+Ac+H] ⁺	396 Da [M+Ac+Na] ⁺	412 Da [M+Ac+K] ⁺

62. ábra

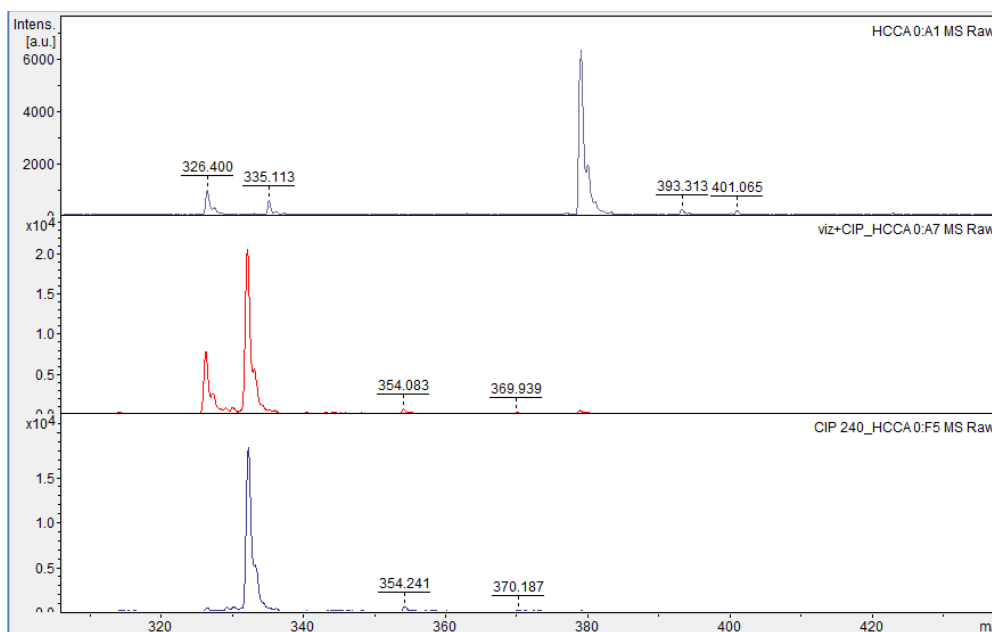
Ciprofloxacin natív (zöld) és enzimatikusan módosított (piros) formái.

A ciprofloxacin MALDI-TOF MS mérések értékelése a következők szerint történik. Az acetiláció +42 Da-os eltolódást eredményez minden esetben. A ciprofloxacin natív, intakt ionos formái a 332, 354 és 370 m/z értéknél jelentkező peakek ([M+H]⁺, [M+Na]⁺ és [M+K]⁺ ionos natív formák jelei), az acetiláció általános szabályszerűsége értelmében az enzimatikusan módosított, acetilált formák a 374, 396 és 412 m/z értékeknél keresendők.

Kísérleteinkhez itt is a törzsgyűjteményünkben fagyasztva tárolt klinikai izolátumok szolgálták kiindulási pontként. A most kiválasztott és a vizsgálatokban letesztelt törzsek mindegyike ciprofloxacinnal vagy más fluorokinolon antibiotikummal szembeni rezisztenciát

mutatott hagyományos korongdiffúziós eljárásban. A kísérletekben arra kerestük a választ, hogy a ciprofloxacin rezisztens fenotípust mutató törzsek közül egyáltalán kimutatható-e AAC(6')-Ib-cr enzim hordozás, termelés és aktivitás, milyen mértékű ennek elterjedtsége, és a MALDI-TOF MS MBT ASTRA módszernek van-e gyors diagnosztikai létjogosultsága ennek a rezisztenciamechanizmusnak a detektálásában.

A validálási folyamatokban ismét teszteltük a hígítások során használt tiszta dH₂O-t, az intakt antibiotikum oldatot, annak esetleges spontán bomlását, módosulásait. A víz vak kontrollban ennél a mérésnél egy 326 m/z értékű peak is látható, mely az éles mérések során is elég gyakran megjelent, sőt néha kifejezetten nagy intenzitású peakeket is generált, de szerencsére viszonylag messze esik a marker peakektől. Nagyobb aggodalomra ad okot a 335 m/z értéknél általában előforduló kontamináns, mely most is jelen van alacsony intenzitással a ddH₂O-ben is, de a natív antibiotikum spektrumainkat vizsgálva láthatjuk, hogy a 332 m/z értékű natív [M+H]⁺ molekula messze túlhaladja intenzitásában az említett kontaminánst, így jelenléte itt sem mondható zavarónak.



63. ábra

Bevezető validálási mérések. Felső panel: víz vak kontroll; Középső panel: tiszta ciprofloxacin oldat (0,5 mg/ml) 4°C; Alsó panel: tiszta ciprofloxacin oldat (0,5 mg/ml) 36°C 240 perc inkubáció.

A ciprofloxacin natív oldatainak vizsgálatokor azt a jelenséget figyeltük meg, hogy egy rendkívül nagy intenzitású peak formájában jelenik meg minden esetben a 332 Da-os [M+H]⁺ natív forma, az intenzitás ennél a peaknél körülbelül tízszeres az eddig megszokott intenzitásokhoz képest (lásd 63. ábra középső és alsó paneljének bal oldali skálabeosztását). Valószínűleg emiatt is, a 354 és 370 Da-os Na⁺ és K⁺ ionos formák peakjeinek detektálása a tiszta oldatban nehézkesnek tűnik, de azért jelen van mindkettő, ha csak arányosan kisebb jelként is. A natív és +4°C-on tárolt antibiotikum oldat spektrumában természetesen nincsenek meg az enzimatis reakcióból várt termékekre utaló jelek.

A hosszú ideig +36°C-on inkubált tiszta ciprofloxacín oldat peak-mintázata semmilyen eltérést nem mutatott a +4°C-on tartott mintához képest, vagyis nincs detektálható spontán bomlásra vagy módosulásra utaló jel ciprofloxacín esetében. A keresett peakok speciális reakció eredményei, tehát ezek megjelenése spontán nem is várható, de ezek mellett más új jel sem jelent meg az inkubált ciprofloxacín oldatából, azaz valóban nincs spontán módosulási folyamata.

Érdekes jelenség, hogy a nagyon nagy ciprofloxacín [M+H]⁺ intenzitásból eredő egyéb jelek mellett mennyire alacsony bármi más peak is ennél a méréssornál. Különösen érdekes jelenség az α-CHCA mátrix dimerjének 379 m/z értéknél lévő peakjének alacsony intenzitása, mely általában a legmagasabb peak szokott lenni a mérések során.

Kérdéses volt, hogy a mátrix dimer 379 m/z értékű peak-je nem zavarja-e majd a 370 m/z értékű natív forma [M+K]⁺ és a 374 m/z értékű módosult forma [M+Ac+H]⁺ jeleit. Az eddigiek alapján viszont a natív formánál ilyen zavaró hatás nem észlelhető.

Az eddigi protokollunktól eltérően, mivel nem volt ismert és igazoltan AAC(6')-Ib-cr hordozó baktériumtörzsünk, ezért szokatlan módon itt elsőként a screenelési vizsgálatokkal kellett elkezdjük a folyamatokat. A vizsgálatba olyan izolátumokat válogattunk össze, melyek hagyományos antibiogram tesztben ciprofloxacín rezisztenciát mutattak. Érdekes megfigyelni, hogy a ciprofloxacín rezisztens *Enterobacteriaceae*-be tartozó 11 törzsünk közül 9 a fluorokinolon rezisztenciája mellett ESBL-termelő is, azaz az ESBL-termelés mellé a törzsek 81%-ánál társult fluorokinolon rezisztencia is. A statisztikai minta ebben az esetben természetesen véletlenszerű és egyáltalán nem is tekinthető reprezentatívnak, de a korreláció látható.

Az AAC(6')-Ib-cr enzim hordozását vizsgáló tesztleírásunkat tehát nem optimalizáló folyamattal kezdtük, elvégeztük ugyan a folyamatot (hőmérséklet, inkubációs idő, ciprofloxacín koncentráció), de az ehhez a gyanúnk szerint kiválasztott törzs (G1/126. ciprofloxacín rezisztens *E. coli* izolátum) nem volt megfelelő (lásd később). Screenelő vizsgálatunkhoz a megfelelő paraméter értékeket szakirodalmi forrásból [125] nyertük. Ennél a vizsgálat típusnál jelenlegi tudásunk szerint nem áll rendelkezésre specifikus inhibitor molekula, mellyel az AAC(6')-Ib-cr enzim aktivitása specifikusan gátolható volna. A screenelő vizsgálat eredményeit a 16. táblázat mutatja szemléletesen, az egyes mérési spektrumok a 16. Függelékben tekinthetők meg.

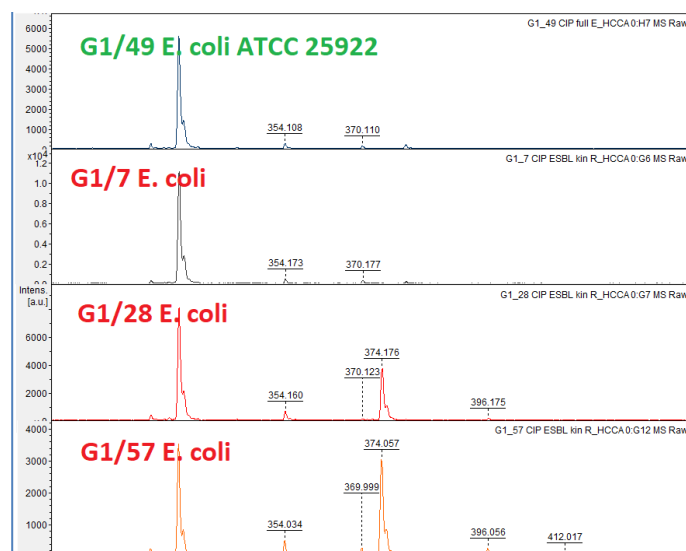
#	faj	R	natív			acetilált		
			332	354	370	374	396	412
G1/49	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 (neg. kontroll)	+	+	+	-	-	-
G1/7	<i>Escherichia coli</i>	ESBL + fluorokinolon-R	+	+	+	-	-	-
G1/28	<i>Escherichia coli</i>	ESBL + fluorokinolon-R	+	+	+/-	+	+	-
G1/36	<i>Escherichia coli</i>	ESBL + fluorokinolon-R	+	+	+	-	-	-
G1/38	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL + fluorokinolon-R	+	+	+	-	-	-
G1/44	<i>Pseudomonas monteilii</i>	MDR, fluorokinolon-R	+	+	+	-	-	-
G1/46	<i>Escherichia coli</i>	ESBL + fluorokinolon-R	+	+	+	-	-	-
G1/57	<i>Escherichia coli</i>	ESBL + fluorokinolon-R	+	+	+	+	+	+

G1/71	<i>Escherichia coli</i>	ESBL + fluorokinolon-R	+	+	+	-	-	-
G1/125	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL + fluorokinolon-R	+	+	+	-	-	-
G1/79	<i>Escherichia coli</i>	ESBL + nal-R, cip-É, mox-É	+	+	+	-	-	-
G1/109	<i>Escherichia coli</i>	fluorokinolon-R	+	+	+	-	-	-
G1/126	<i>Escherichia coli</i>	fluorokinolon-R	+	+	+	-	-	-
G1/110	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL	+	+	+	-	-	-
G1/84	<i>Escherichia coli</i>	karbapenem-R	+	+	+	-	-	-
G1/32	<i>H. parainfluenzae</i>	BLPAR + fluorokinolon-R	+	+	+	-	-	-
G1/62	<i>H. parainfluenzae</i>	BLNAR + fluorokinolon-R	+	+	+	-	-	-
G1/101	<i>H. parainfluenzae</i>	BLPACR + fluorokinolon-R	+	+	+	-	-	-
G231/2018	<i>Enterococcus faecalis</i>	norfloxacin-R	+	+	+	-	-	-

16. táblázat

Ciprofloxacin rezisztens és negatív kontroll törzsek screenelése ciprofloxacint módosító enzimaktivitásra.

A 16. táblázat a 16. Függelékben megtalálható spektrumok eredményeit szemlélteti. Két törzs esetében találtuk meg a keresett enzimaktivitást, mindkét törzs *E. coli* és ESBL-termelő is. A G1/28 vizelet-, a G1/57 hüvelymintából került izolálásra laboratóriumunkban 2018-ban. Ezek kiemelt spektrumait a következő, 64. ábrán külön is bemutatjuk.



64. ábra

Ciprofloxacin AAC(6['])-Ib-cr enzimmel történő acetilációja és kimutatása MALDI-TOF MS módszerrel.

1. ATCC 25922 *E. coli*, negatív kontroll → acetiltranszferáz enzim negatív
2. G1/7 *E. coli* (ESBL + fluorokinolon rezisztens) → acetiltranszferáz enzim negatív
3. G1/28 *E. coli* (ESBL + fluorokinolon rezisztens) → acetiltranszferáz enzim POZITÍV
4. G1/57 *E. coli* (ESBL + fluorokinolon rezisztens) → acetiltranszferáz enzim POZITÍV

A 16. táblázatban szereplő negatív törzsek esetén a három natív peak mindig jelen volt (zöld színű kiemelés), a 332 Da-os forma jelentős intenzitásfölénye ellenére a másik két ionos forma is detektálható volt minden esetben. A 379 m/z értékű mátrix dimer intenzitását is elnyomta a 332 m/z peak.

Pozitív esetben egyértelmű és erős intenzitású jelekként megjelentek az acetilált formákhoz tartozó peakek is, a natív formák eltűnése nem volt észlelhető egyik esetben sem. A két pozitívnek talált izolátum közül a G1/28 *E. coli*-nál a 370 m/z jelű natív [M+K]⁺ formát csak nagyon gyenge intenzitású jelként sikerült a mérésben kimutatni, ennek megfelelően az

ebből keletkező 412 m/z értékű acetilált forma $[M+Ac+K]^+$ már nem is volt mérhető. Ettől eltekintve a mérési eredmények egyértelműen és világosan mutatják a két pozitív mintánál a keresett AAC(6')-Ib-cr enzim specifikus transzacetiláz aktivitását a ciprofloxacin egyes natív formáin (64. ábra). A 379 m/z értékű mátrix dimer peakje a 332 m/z értékű peak nagy intenzitása miatt pozitív minták esetében sem volt zavaró egy esetben sem.

Optimalizált vizsgálataink a következő paraméterekkel történnek: inkubációs hőmérséklet: 36°C, inkubációs idő optimum: 60 perc, ciprofloxacin koncentráció: 0,5 mg/ml.

A ciprofloxacin rezisztencia acetiltranszferáz által kialakított típusának kimutatása vizsgálataink alapján kiválóan működik az alkalmazott MALDI-TOF MS MBT-ASTRA módszerünkkel. A vizsgálatba beválogatott 10 ciprofloxacin rezisztens *Enterobacteriaceae* törzs (+1 *Pseudomonas*) közül 2 *E. coli* izolátumot találtunk, melyek ezt a rezisztenciátípust hordozzák. Ezen a nem reprezentatív mintán ez az arány ~20%, ami elég magasnak mondható annak ismeretében, hogy maga a rezisztenciamechanizmus is még csak 16 évvel ezelőtt került először leírásra Délkelet-Ázsiában... !

Az AAC(6')-Ib-cr acetiltranszferáz pozitivitás definiálásához elegendő feltételként elfogadtuk a specifikus reakcióban létrejövő acetylálódott termékek jelenlétét, emellett megállapíthatjuk, hogy a natív termékek intenzitása a létrejövő termékekhez képest nem kell, hogy csökkenést mutasson ebben az esetben. A negativitás definiálásához elegendő feltétel, ha a hagyományos ciprofloxacin rezisztencia megállapítás ellenére nem jönnek létre reakcióelegyeinkben a specifikus enzim által generált termékek, a natív antibiotikum molekulák viszont ugyanúgy jelen vannak a spektrumokban.

Ennek a típusú ciprofloxacin rezisztenciának a kimutatása és gyorsdiagnosztikus jelentősége természetesen fontos, de az egyelőre elterjedtebb „hagyományos” fluorokinolon rezisztenciák magasabb aránya miatt nem lehet szűrővizsgálat jellegű. A hagyományos mikrobiológiai fluorokinolon rezisztencia kimutatás mellett, vagy mivel elég ritkán fordul elő kétes vagy bizonytalan eredmény ezeknél a teszteknel ciprofloxacin esetében, inkább azt kiegészítve ajánljuk a MALDI-TOF MS vizsgálatot. Az ehhez megfelelő törzsek kiválogatásában szerepet játszhat az is, ha az antibiogram elkészítésekor a ciprofloxacin mellett levofloxacin és moxifloxacin antibiotikum korongokat is használunk, ezekre ugyanis a már említett okok miatt az AAC(6')-Ib-cr enzimet hordozó ciprofloxacin rezisztens baktériumok érzékenyek (ez persze csak akkor van így, ha csak egyféle fluorokinolon rezisztencia van jelen az adott törzsben).

Mindezek alapján a ciprofloxacin alapú MALDI-TOF MS tesztet kiválóan és egyértelműen értelmezhetőnek értékeltük, gyors diagnosztikai szerepe az így kimutatható rezisztenciátípus alacsonyabb előfordulása miatt viszont nem olyan nagyon jelentős.

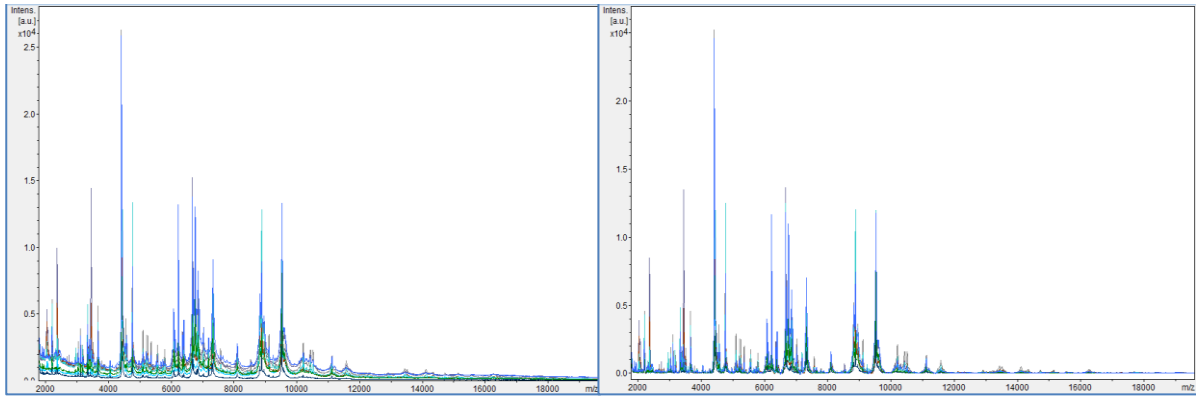
21. MALDI-TOF MS vizsgálatok vancomycin rezisztens (VRE) és érzékeny *Enterococcus faecalis* törzsekkel

Az *Enterococcus*-ok az állati (és emberi) flórának hasznos és alapvetően nagy számú tagjai, melyek azonban igen gyakori kórokozók is lehetnek elsősorban antibiotikumterápia során vagy után kialakuló másodlagos infekciókban. Ezek az infekciók az egyszerűbb húgyúti fertőzésektől a súlyos szepszisekig nagyon sokféle kórképet jelenthetnek, melyekben tehát az opportunistá patogén *Enterococcus*-ok ágensként szerepelnek. Súlyos esetekben, például

szepszisben, az ellenük felmerülő elsődleges és gyors terápiás lehetőség a glikopeptidek alkalmazása (vancomycin, teicoplanin). Glikopeptid rezisztens törzsek először az USA-ban jelentek meg az 1980-as években (lásd 10. oldal, 6. ábra), ahol azután nagyon gyakorivá is váltak (20-30%), nálunk még csak sporadikusan fordultak elő több esetben [88].

A szerzett glikopeptid rezisztenciát hordozó *Enterococcus* törzsek nagyon komoly veszélyt jelentenek, mert az ellenük felvonultatható terápiás lehetőségek száma rendkívül kicsi is lehet, ezért minél gyorsabb kimutatásuk nagyon fontos laboratóriumi feladat. MALDI-TOF tömegspektrometria segítségével sikerült már olyan peakeket azonosítani vancomycin rezisztens *Enterococcus* (VRE) izolátumokban, melyek megbízható és egyedi markerei ennek a típusú rezisztenciának a hordozásában [109]. Ebben a vizsgálatban tehát nem valamilyen antibiotikum + baktérium reakcióelegyében található marker peakek megjelenését illetve eltűnését keressük, hanem magának az izolátumnak a „hagyományos értelemben vett” MALDI-TOF MS identifikációja során használt mérési metódust használjuk. Az említett irodalmi hivatkozás *E. faecium* törzseket vizsgált, mi vizsgálatainkban vancomycin rezisztens és érzékeny *E. faecalis* törzsek spektrumait vetettük alá a módszernek és igyekeztünk aprólékosan utánakeresni, hogy léteznek-e olyan különbségek a két csoport között (VRE és non-VRE *Enterococcus faecalis* izolátumai között), melyek releváns markerek lehetnek a differenciálásukban. A kísérletek célja itt az, hogy a MALDI-TOF MS identifikációs vizsgálatra küldött sejtes mintákban az identifikáció során felvett fehérjeprofíl spektrumából meg tudjuk esetleg állapítani, hogy vancomycin rezisztens vagy vancomycin érzékeny izolátummal van-e éppen dolgunk. Ennek szerepe a fentebb leírtak alapján nyilvánvalóan nagyon nagy, mert a gyors és nagyon precíz MALDI-TOF identifikációval egyidőben lenne lehetséges interpretálni a glikopeptid rezisztenciát az adott törzsnél, ez pedig alapvetően megváltoztathatja a terápiát a klinikum oldalán.

Az izolált telepből megmintázott baktériumsejtek MALDI-TOF MS plate-re való fogszikkalós felvitele és száradása után egyszerű hangyasavas feltárását alkalmaztunk, a hangyasav beszáradása után következett a mátrix (α -CHCA) felvitele, majd ennek beszáradása után a mérés maga. Az eredményeket tartalmazó „raw” fájlokat itt is a MALDI-BioTyper® flexAnalysis szoftverrel értékeltük. A kísérlet során nem a már megszokott „List view” analízis módot használtuk a szoftverben, hanem az „Overlaid view” nagy felbontású módot, itt ugyanis nagy mennyiségű peak egyidejű áttekintése szükséges egy nagyon széles mérési tartományon belül. Ez a mérési intervallum ~2000 m/z és ~15000 m/z értékek között található és minden, az egyes baktériumfajok beazonosításához szükséges körülbelül 80-120 kisebb-nagyobb peak [151], valamint ezeken kívül megtalálhatók benne még az identifikáláshoz nem elégséges, nem szükséges, de jelenlévő, egyéb fehérje eredetű peakek is. És ami itt most számunkra a legfontosabb: esetleg megtalálhatók ezekben a spektrumokban azok a marker peakek is, melyek révén vancomycin rezisztenciára következtethetünk *Enterococcus* izolátumaink esetében.



65. ábra

Nyers (bal oldal) és „Baseline subtracted” (jobb oldal) spektrumok *E. faecalis* törzsekről „Overlaid” analízis módban MALDI-BioTyper® flexAnalysis szoftverben.

A vizsgálatokat természetesen az egyes izolátumok nagyon megbízható identifikálásával kellett kezdenünk, hogy biztos egy fajhoz (*E. faecalis*) tartozó törzseket vizsgáljunk. Ennek során az alábbi izolátumok és referenciatörzsek kerültek felhasználásra, a nyilak után jelzett név a BioTyper által adott fajnév, a score érték pedig az identifikáció minőségét hitelesíti:

- ATCC 29212 *E. faecalis* → *E. faecalis* (BioTyper score: 2,453)
- G1/4285/2018 *E. faecalis* → *E. faecalis* (BioTyper score: 2,493)
- G1/SIné *E. faecalis* → *E. faecalis* (BioTyper score: 2,519)
- G1/6 QC 32/2017 *E. faecalis* → *E. faecalis* (BioTyper score: 2,278)

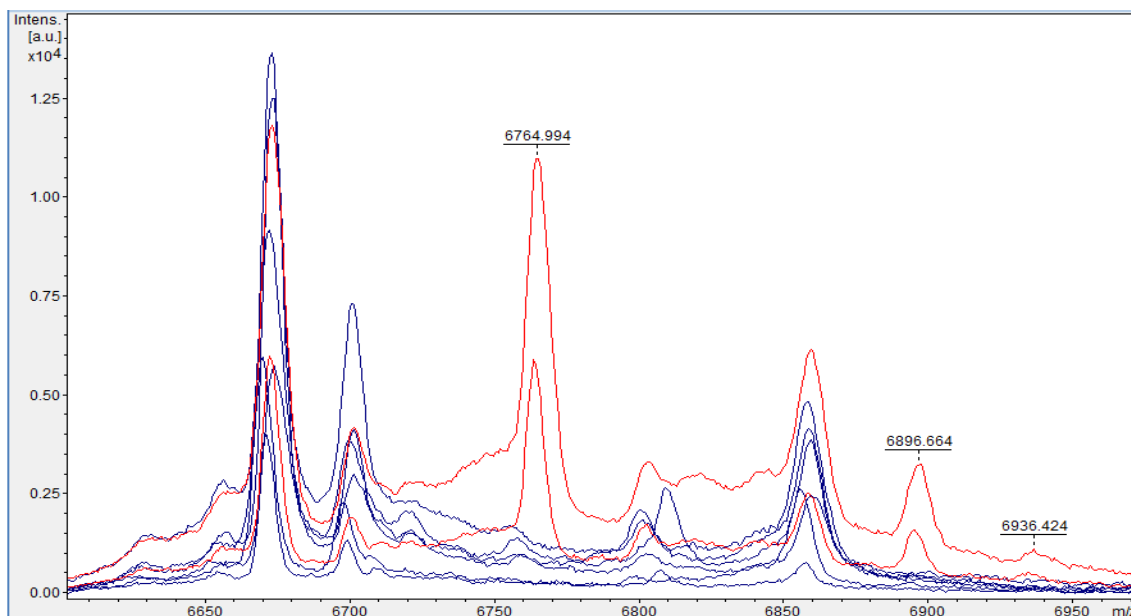
Ezek alapján a felhasznált törzsek biztosan *E. faecalis* törzsek, összehasonlításuk tehát spektrumaik alapján megkezdődhetett. A duplikátumokban elvégzett identifikáló mérések spektrumainak kiértékelése során kapott spektrumok összehasonlítását végeztük el tehát a szoftverben, egyelőre manuálisan, azaz az overlaid módban végigböngészve az esetleges eltéréseket és azonosságokat. Az eredmények alapján ezek az eltérések többfélék is voltak: voltak egyedi eltérések, amelyeknél csak az egyik csoport (VRE vagy non-VRE) képviseltette magát, és voltak mindkettőnél jelen lévő peakek, melyek viszont az egyik csoport mindegyik tagjában és mindegyik mérésében jelentősen különböző intenzitással jelentkeztek a másik csoporthoz képest. Mindezek alapján az alábbi eredmények születtek [m/z]:

egyedi non-VRE	non-VRE, de csak intenzitás különbség	egyedi VRE	VRE, de csak intenzitás különbség
2032	2385	3382	6936
2053	2401	6765	7360
2070	2746	6896	
2364	2829	6936	
	7059	~8565	

17. táblázat

VRE és non-VRE *E. faecalis* törzsek lehetséges differenciáló marker peakei vizsgálataink szerint (17.Függelék).

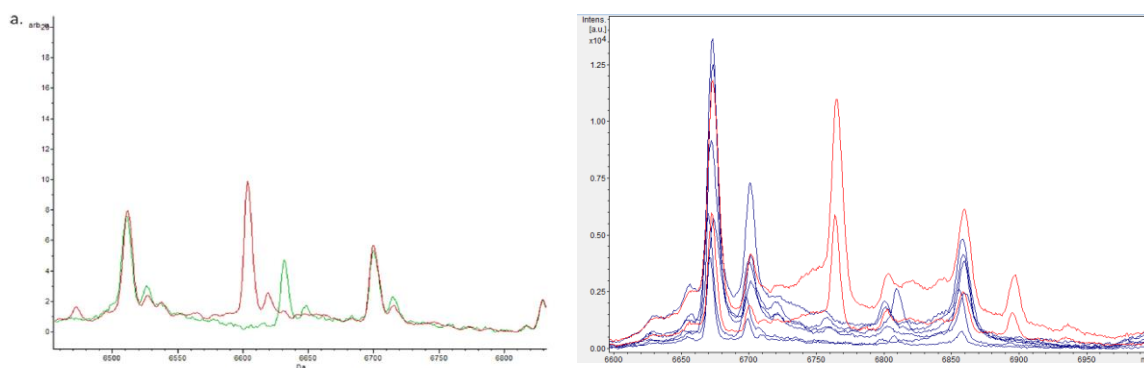
A 17. táblázatban feltüntetett eredményekből látható, hogy valóban léteznek olyan marker peakek, melyek csak az adott csoportra jellemző egyedi tulajdonságok, de léteznek olyan markerek is, melyek csak intenzitási különbséget (intenzitásukban nagyobbak) mutatnak a másik csoporttal szemben. Az egyes spektrumokat a 17. Függelék tartalmazza részletesen, az egyedi VRE peakek közül a legszemléletesebbek itt, a 66. ábrán is láthatók:



66. ábra

VRE (piros) és non-VRE (kék) törzsek overlaid összehasonlítása: egyedi VRE peakek.

A hivatkozott irodalmi forrás [109] eredményei között szerepel egy vanA és vanB elkülönítést célzó kísérlet is, melyben a 66. ábránkon látható régióhoz nagyon közeli tartományt vizsgáltak és amelyben a kapott spektrális eredmények erős hasonlóságot is mutatnak a mi spektrumainkkal. Ez természetesen csak szubjektív észrevétel és messzemenő következtetések nem vonhatók le belőle, de a spektrumlefutások hasonlósága nyilvánvaló (lásd 67. ábra). A peakek számszerű m/z eredményeinek eltérése (kis mértékű „elcsúszása”) azzal is magyarázható lehet, hogy a nagyon szélesen vizsgált spektrális tartományok kalibrálása nem volt tökéletesen egyező a két esetben.



67. ábra

Hasonló spektrális tartományok (~6500-7000 m/z) hasonló spektrális tartalommal. [109]: (VRE *E. faecium*) és saját eredmények (VRE *E. faecalis*) szubjektív hasonlósága egy kritikus VRE-specifikus régióban.

A hivatkozott irodalmi forrás [109] eredményei nyilvánvalóan azért sem egyeznek számszerűen a mi eredményeinkkel, mert ott egy másik fajt, az *Enterococcus faecium*-ot vizsgálták, *Enterococcus faecalis* ilyen irányú vizsgálatából VRE és non-VRE differenciáló eredmények még sosem születtek. Terveink között szerepel természetesen több VRE *E. faecalis* ugyanilyen vizsgálata is, de egyelőre (és szerencsére) még csak nagyon ritkán

előforduló baktériumtípusról van szó hazánkban. Több VRE *E. faecalis* törzs párhuzamos vizsgálatával kiszűrhetők lennének az itt csak véletlenszerűen detektált klón-specifikus peakek és a valóban a VRE-kre jellemző marker peakek.

A kísérletek során sikerült olyan VRE *E. faecalis* specifikus marker peakeket felfedeznünk, melyek a vizsgált non-VRE *E. faecalis* törzsek egyikében sem volt detektálható. Ezek az egyedi VRE-specifikus marker peakek, melyek megbízható és egyértelmű intenzitással voltak jelen, a: 3382, 6765, 6896, 6936, ~8565 m/z markerek. A ~8565 m/z peak pontos értéke bizonytalan 8561 és 8565 m/z között, ugyanis a duplikátum egyes tagjai itt egymástól is kis mértékű eltérést mutattak. A többi kiemelt peak elhelyezkedése az m/z skálán egyértelműen meghatározható volt és egyértelmű intenzitással jelentkezett.

Legtöbbször bizonytalanabban, de non-VRE-kkel szemben egyértelmű intenzitásbeli fölénytel feltűnő VRE *E. faecalis* specifikus peakek voltak a 6936 és 7360 m/z. Ebben a két esetben láthatóan nagyobb intenzitással van jelen az összes non-VRE izolátumhoz képest a VRE törzs, de a peak amazokban is kimutatható alacsonyabb intenzitással. Ezek mellett olyan peakeket is találtunk, melyek csak a non-VRE *E. faecalis* izolátumokra voltak jellemzőek: 2032, 2053, 2070, 2364 m/z. Ezek a peakek tehát a VRE *E. faecalis* esetében sosem volt detektálható.

Vizsgálataink ezen a területen még csak kísérletes jellegűek, de az eredmények ígéretesnek tűnnek. A kísérleti mérések kiemelt spektrumai a 17. Függelékben láthatóak.

Mindezekből a későbbiekben összefoglalva egy olyan szoftveres analízis kivitelezését tervezzük, mely az egyes peakek jelenlétét vagy hiányát a megfelelő előjellel pontozza és az így összeálló score-értékkel jellemzi egy adott izolátum VRE-valószínűségét MALDI-TOF MS spektrum analízis alapján.

A vancomycin rezisztencia hagyományos laboratóriumi kimutatása időigényes folyamat. Ha nem specifikus vancomycin tartalmú szelektív táptalajon tenyésztik párhuzamosan az izolátumokat (és a legtöbb laboratóriumban ilyen táptalaj nem elérhető), akkor az elfogadott metódus alapján az izolálás után 24-48 óra elteltével igazolható a glikopeptid rezisztencia vagy csökkent érzékenység. Az első 24 óra alatt, amikor a klinikusnak még csak a kitenyésztett fajról van tudomása, a first line terápiás protokoll szerint vancomycint kell alkalmaznia. Vancomycin rezisztencia gyanú esetén természetesen azonnal vancomycin Etest indítása is szükséges, aminek eredménye szintén még plusz 16-24 óra inkubáció után születhet csak meg. MALDI-TOF MS módszerrel, ha igazolást nyer, hogy ezzel a módszerrel valóban lehetséges volna a VRE – non-VRE differenciálás, akkor mindez lecsökkenthető lenne néhány munkaóránnyira, melyről például súlyos fertőzések esetén nem túlzás azt kijelenteni, hogy valóban életmentő lehetne.

22. Általános tapasztalatok a kísérletes munkában

Kísérletes munkánk során sok olyan gyakorlati ismeretet is szereztünk, mely részletek nélkül valószínűleg nem is tudtuk volna megvalósítani és folyamatos minőségben produkálni a kísérleteket. Tapasztalataink emellett hasznosak és mindenképpen előnyösek is lehetnek későbbi munkák során is hasonló témákban. Ezek a kisebb részletek tapasztalataink szerint valójában nagyban segíthetik a munka egyes fázisainak gördülékenységét és precizitását, nagyban befolyásolják a munka végeredményének minőségét. Kicsi, de fontos részletek, melyek nélkül nem állítható össze valóban megfelelően a teljes kép.

- A MALDI-TOF MS MBT-ASTRA vizsgálatokat antibiotikum oldatokban végezzük el. Ezek az antibiotikum oldatok vizes oldatok. Célunk is volt, hogy minél egyszerűbben kivitelezhető folyamatokkal dolgozzunk, minél egyszerűbb oldatokat állítsunk össze, hogy megtudjuk, hogy valóban kivitelezhetőek-e ezek a vizsgálatok az egyébként csak rutin mikrobiológiai tevékenységet folytató laboratóriumokban is, ezért használtunk vizes oldatokat. Látható volt a kísérletes leíró folyamatoknál, hogy több antibiotikumnál vizes oldatokban spontán bomlási folyamatok is elindulhatnak, mely folyamatok az idő előrehaladtával nyilván egyre teljesebbé válnak, azaz ezeknek a spontán bomlásra hajlamos antibiotikumoknak az oldatai minőségükben fokozatosan romlanak. Természetesen mindezt a tárolási hőmérséklet is nagyban befolyásolja, szobahőn egyik ilyen oldatot sem szabad tárolni, +4°C néhány óráig, -20°C-on fagyasztva pedig maximum néhány hétig lehetséges a minőség megőrzése, ezért minden esetben törekedni kell a minél frissebb antibiotikum oldatok használatára. Tapasztalataink szerint ez a leromlási folyamat jelentősen csökkenthető, azaz a tárolási idő ezeknél sokkal jobban megnyújtható -70°C-os mélyfagyasztott tárolással. Irodalmi utalások szerint [127] -80°C-on egy hónapig tárolhatóak ilyen célra az antibiotikum oldatok. A mi tapasztalataink szerint (csak cefotaxim esetében vannak erről adataink) ez 2-3 hónap is lehet a mi -70°C-os tárolónkban.
- Ugyanúgy, ahogy a hagyományos érzékenység vizsgálatokhoz, a MALDI-TOF MS-sel végzett érzékenységvizsgálatokhoz is friss tenyészetek szükségesek (-70°C-ról felvett 24 órás tenyészetek vagy izolátumok primokultúrából). A MALDI-TOF MS identifikációs vizsgálatok minősége is egyre romlik az egyre idősebb tenyészetekből, ugyanígy a nem friss baktériumtelepek használata ehhez a műszeres érzékenységvizsgálathoz szintén rontja a megfelelő eredmények elérésének esélyeit.
- A MALDI-TOF MS-sel végzett érzékenységvizsgálatokat nagyon kis reakció térfogatokban végezzük el. Általában 20 µl térfogatokat használtunk, optimalizálási folyamataink alapján is ezt találtuk a legmegfelelőbbnek. Ezt a 20 µl-t kell lecentrifugálnunk és a sejtes üledék fölül lepipettázni a teljesen víztiszta felülúszóból 2 µl-t. Ez a művelet gyakorlattal nem nehéz, de úgy is előfordul, hogy a minta ritkán felkavarodik és akkor centrifugálhatjuk újra a reakcióelegyet. Ezek miatt, tapasztalataink szerint a gömbölyű aljú Eppendorf-csövek alkalmasabbak ezekhez a kísérletekhez, mert a hegyes-kúpos aljúaknál a sejtek a cső kúposan kialakított végébe centrifugálódnak, e fölött található a felülúszó, ahonnan a mintát kellene levonnunk úgy, hogy a pipettahegygel meg sem közelítjük a sejtes üledéket (bár ilyenkor a

folyadékoszlop magassága is nagyobb valamivel). Gömbölyű aljú Eppendorf-csövek esetén a centrifuga dőlési szöge miatt a sejtekből álló üledék nem a cső legalján lesz az üleptetés után, hanem kissé oldalt attól, így a minta kivételénél a csövet kissé megdöntve, sokkal könnyebb tényleg tiszta felülúszót pipettázni még ilyen kicsi térfogatú oldatcseppekből is. Ráadásul sokkal kevésbé kell óvatosan pipettázni a biztosan víztiszta felülúszót és emiatt a munkafolyamat gyorsabb is lesz.

- A reakcióelegyek összeállítása és a reakciók indítása precíz és körülményes munkafolyamat. A bevitt mákszemnyi inokulum mennyisége nem „gépesíthető”, ez a folyamat manuálisan steril műanyag fogpiszkálók segítségével történik. A hegyes fogpiszkálók használata azért előnyös, mert ezekkel le lehet venni a tápralajról nagyon kis méretű telepeket is és mert ezekkel tényleg csak azt a telepet tudjuk levenni, melyet szeretnénk. Mikrobiológiai fém vagy műanyag oltókacsok erre a célra nem alkalmasak, mert méretük túl nagy, a telepek levétele nem teljesen precíz, a sokszorosan égetéssel sterilizált fém kacsok analitikai tisztasága pedig erősen megkérdőjelezhető. A fogpiszkálók használata azért előnyös, mert az általunk használt típus (lásd Eszközök és anyagok, 2. Függelék) vége hajlított, mely nagyban segíti a precíz telepfelvételt a táptalajról és biztosan nem viszünk be a reakcióelegyünkbe semennyi táptalajanyagot sem. A fogpiszkáló műanyag mivolta azért fontos, mert reakcióelegyeink nagyon kis térfogatúak (20 µl) és fa fogpiszkálók használata esetén ebből elég sokat felszívna a fogpiszkálók a minta homogenizálásakor, ami nyilván kerülendő dolog. Ráadásul a fa fogpiszkálók analitikai tisztasága szintén megkérdőjelezhető, nem ismert, hogy milyen bevonatok, pácanyagok, tartósítószeranyagok találhatóak bennük vagy felületükön. A homogenizálás folyamata jól megoldható volt a műanyag fogpiszkálók segítségével is, de mindig ügyelni kell arra is, hogy a szuszpenziót ne kenjük szét az ehhez képest nagy térfogatú Eppendorf-csőben, mert reakcióelegyként egy egységes térfogatot kellene vizsgálnunk. Vortexelni szintén nem ajánlott ugyanezen okok miatt.
- A MALDI-TOF MS plate-re reakcióelegyeink felülúszóiból 2-2 µl-t viszünk fel spotonként. Megpróbáltuk tovább javítani a mérési hatékonyságot azzal, hogy esetleg nagyobb mennyiségeket viszünk fel a spotokra az egyes mintákból, de ilyen esetekben a beszáradási idő is növekszik, ami pedig a mi szempontunkból káros, ugyanis esetünkben a beszáradás, azaz a víz elvonása állítja le a biokémiai folyamatokat a mintákban, az eredmények tekintetében pedig nem tapasztaltunk javulást nagyobb térfogatok felvitele esetén sem. Azt a változatot is teszteltük, hogy egymás után többször vittünk fel 2-2 µl-t egy spotra (azaz az első 2 µl gyors beszáradása után egy újabb 2 µl-t), de ez sem okozott semmilyen irányú változást a spektrumok minőségében.
- A felvitt 2 µl-es analitok beszáradása körülbelül 10-15 perc. E rövid idő során a plate-eket kikapcsolt sterilfülke alatt tároltuk, a fülke légáramát nem használtuk. A légáram használat nem gyorsította meg jelentősen a beszáradási folyamatot (és a manuális „legyezgetés” sem), ráadásul többször tapasztaltuk, hogy ilyenkor az egyes cseppek

nem kör alakban száradnak be, hanem a légáramnak megfelelően eltorzulva kristályosodnak ki, ami a műszeres vizsgálatnál jelentősen meg is nehezíti a méréseket, mert az ionizációs lézer a spotok közepére irányul és ilyenkor manuálisan kell a lézer célját korrigálni. Szintén ügyeltünk arra is, hogy se a sterilfülke saját világítása, sem pedig egyéb fény ne érje túlzottan a száradó spotokat vagy az inkubálódó Eppendorf-csőveket. Közvetlen fénysugárzástól mindig védtük mintáinkat, de ezt teljes mértékben nem tudtuk kontrollálni.

- Az elkészített, reakcióelegyeink felülúszóinak beszárított mintáit tartalmazó kész plate-ek a MALDI-TOF mérésre készen állnak. A MALDI-TOF MS viszont előfordulhat, hogy nem áll készen azonnal, mert éppen valamilyen más jellegű munkafolyamat zajlik rajta. Ilyenkor a plate-et tapasztalataink szerint ebben az állapotában eltárolhatjuk +4°C-on száraz helyen néhány óráig egészen biztosan (a plate külön erre kialakított műanyag tárolódobozában és mindez még egy zárható műanyagzacskóban is), amíg a tömegspektrométeren befejezik az egyéb tevékenységeket és következhet a „mi plate-ünk” a méréshez. Úgy tapasztaltuk, hogy ez a rövid idejű tárolás egyáltalán nincs befolyással a kapott eredményekre. Hosszabb idejű tárolás szükségessége esetén -20°C-on lefagyasztjuk a plate-et (szintén zárt dobozban és zárt zacskóban), majd mérés előtt szobahőre engedjük sterilfülke légárama alatt, így elkerülhetjük a párakicsapódást a fémllemezen és ezzel a minták egybemosódását. Éles helyzetben, azaz fontos izolátumok érzékenységvizsgálatakor természetesen előzetes értesítés és egyeztetés révén a MALDI-TOF MS mérést azonnal meg tudjuk oldani, kísérletes folyamatokban megengedett csak az esetleges egy-két órás tárolása anyagainknak.
- A MALDI-TOF MS identifikációs folyamatoknál alapvetően ajánlott mindig duplikátumokat alkalmazni, mert a mérések eredményei kisebb-nagyobb szórással adják csak a megfelelő eredményeket. Tapasztalataink szerint ezekre a duplikátumokra éles minták érzékenységvizsgálatának műszeres mérésekor is mindenképpen szükség van, de a kísérletes munkában mindez nem feltétlenül szükséges, mert a mérési eredmények nagyon jó hatásfokkal készülnek, ritkán tapasztaltunk csak „üres” vagy „túl zavaros” spektrumokat. Ez természetesen annak is betudható, hogy a mérést végző kollégák kiválóan uralni tudják a mérések folyamatos minőségének fenntartását, probléma esetén manuális plusz mérésekkel azonnal korrigálják a műszeres hibákat.
- Az érzékenységvizsgálati módszer során nagyon sok olyan apró tényező lehetséges, mely befolyásolja a spektrumok minőségét. Ezért nagyon fontos az, hogy a tesztekhez mindig használjuk azokat a kontrollokat, melyek az eredmények minőségének folyamatos fenntartásában segítik a munkánkat:
 - Fontos a vak ddH₂O kontrollok használata, mert ebből láthatjuk az esetleges kontamináns anyagok peakjeinek helyzetét és intenzitását (mely vízből oldatainkat is készítjük), azaz ezeket a peakeket kell negligálni az értékelés során minden esetben. A kontamináns peakek jelenléte sajnos tapasztalataink

szerint elkerülhetetlen, de intenzitásuk általában alacsony, elhelyezkedésük néhány esetben viszont kritikus lehet, ha egybeesnek valamely keresett marker peakünkkel. Ilyenkor természetesen új oldószert (ddH₂O) kell találnunk (minden oldatunkhoz!), mely nem tartalmazza ezeket a kis intenzitású, de zavaró kontaminánsokat. Ugyanez a szabály érvényes a mátrix oldatokra is.

- Minden esetben szükség van a csak tiszta antibiotikumot tartalmazó negatív kontroll használatára, mert ezzel kontrolláljuk, hogy melyek azok a natív peakek, melyeket módosítani szeretnénk izolátumaink enzimeivel. Illetve fontos annak is a kontrollálása, hogy még alkalmas-e az antibiotikumunk a vizsgálatokra (nincs-e benne spontán bomlás, ha alapvetően létezik spontán bomlása, akkor az nem túlzott mértékű-e, stb.)
 - Ugyanezen okok miatt szükséges egy olyan antibiotikum negatív kontroll is, melyet az „éles mintákkal” egyező körülmények között és azonos ideig inkubálunk, hogy megfigyelhessük, hogy vannak-e abiotikusan lejátszódó események magában a tiszta antibiotikumoldatban is enzimtevékenység nélkül.
 - Fontos baktérium kontrollok alkalmazása is, melyekről ismerjük, hogy milyen reakciót fognak produkálni az adott antibiotikummal. Azaz kell használnunk egy enzimatikusan negatív kontroll és egy pozitív kontroll törzset is. Ezekkel ellenőrizhetjük a reakciókörülmények, a reakció, a felhasznált antibiotikum, a felhasznált törzsek, a mérés, a kalibráció és még sok egyéb apró paramétert, mely a vizsgálat minőségét végeredményben alapvetően meghatározza.
 - Ha egy izolátumot tesztelünk valamely enzimaktivásra, akkor ennek az izolátumnak az antibiotikumtól mentes párhuzamosát is el kell készíteni és azt ugyanazon paraméterek mellett kell inkubálni, mint a reakcióelegyet, hogy megtudjuk, hogy az adott izolátum nem termel-e valami olyan, ebben a spektrális tartományban észlelhető anyagot, mely zavarhatja az antibiotikum módosítási reakcióinak értékelhetőségét.
 - Nem utolsó sorban pedig nagyon fontos az egyes mérések kalibrálása is, amikor is különböző ismert m/z értékkel jelet generáló kalibrátor anyagokat mérünk le minden mérés (azaz minden egyes plate) esetén és csak ezután kezdhetjük el lemérni a tesztelt analitokat. Emiatt (előzetes megállapodás alapján) a felhasznált plate-jeink első három-négy spotját mindig szabadon kell hagyni, hogy ezen spotokon a méréseink előtt a kalibráció elvégezhető legyen. Ez azért fontos, mert a precíz kalibráció alapvetően meghatározza az m/z tengely mentén elhelyezkedő jelek egyes pontos értékeit, azaz tulajdonképpen a mért analitjaink mérési eredményeinek állandóságát biztosítjuk ezzel.
 - Ha mindezeket a kontroll vizsgálatokat elvégezzük és megfelelőnek találjuk, csak akkor nevezhetjük validnak eredményeinket ezekben a vizsgálatokban.
- A mérések értékelése során megfigyelhetjük, hogy a külön méréseken, külön spektrumokon nem mindig pontosan ugyanazzal az m/z értékkel szerepelnek a már ismert peakjeink. Ez a nagyon kis mértékű „csúszkálás” betudható az egyes kalibrációk kisebb eltéréseinek, de ezen túl nagyon kis eltérések a mérés természetéből adódóan mindig előfordulnak. A mérés eredményeként három tizedesjegy

pontossággal látjuk az egyes peakek értékeit, tapasztalataink szerint körülbelül $\pm 0,3$ m/z, maximum $\pm 0,5$ m/z eltérés még elfogadható ezeknél az értékeléseknél egy peak többszörös mérése során.

23. A kísérletes munka összefoglalása és az eredmények értékelése

Vizsgálataink gyakorlati kivitelezését egy általános protokoll alapján végeztük el, ennek részletesen kidolgozott, munkánkhoz adaptált és általunk végzett lépései a következők:

1. A kísérletben vizsgálni kívánt baktériumtörzsek kiválasztása
2. A kísérletben vizsgálni kívánt antibiotikumok kiválasztása
3. A kísérlet elméleti megtervezése/megszervezése
4. A tesztorganizmusok kioltása/izolálása
5. A vizsgálni kívánt antibiotikum törzsoldatok elkészítése
6. A kísérletsor antibiotikum hígítási sorainak és egyéb oldatainak összeállítása
7. A MALDI-TOF MS mérést végző kollégák értesítése
8. A MALDI-TOF MS műszer gépbeállításainak elvégzése
9. A tesztorganizmusok növekedésének ellenőrzése
10. Az inkubációs körülmények beállítása, műszerek működésének ellenőrzése
11. Inokulumok bevitele az egyes reakcióelegyekbe
12. A vizsgálat sorozat elindítása
13. Az inkubációs idők lejártakor a reakcióelegyek centrifugálása
14. A sejtmentes felülúszókból az analitok felvitele a plate-re
15. A felpipettázott mintákat száradni hagyni
16. Mátrix felvitele és beszáradása
17. Kalibráció
18. Analitok MALDI-TOF MS mérése
19. A mérési eredmények kiértékelése, jegyzőkönyvezése
20. Az eredmények mérlegelése és interpretációja

23.1. Tapasztalatok és eredmények a cefotaximmal végzett mérés sorozatokból

A cefotaximmal végzett kísérleteink a talán leglátványosabb eredményt adó tesztjeink. Gram-negatív bélbaktériumok (*Enterobacteriaceae*) esetén a harmadik cefalosporin generációba tartozó cefotaxim bontására képes enzimeinek detektálása kiváló hatásfokú volt. Ideális körülmények között körülbelül másfél óra alatt megszülethet egy ilyen típusú eredmény egy primokultúrában kitenyészett baktériumtelepből, ha rendelkezésre és készen állnak anyagok és eszközök a vizsgálat lefolytatásához. Sajnos azonban, mivel nem minden enzim dolgozik „egyforma gyorsan”, azaz hasonlóan nagy aktivitással, és mivel a vizsgálat kezdetén elvileg nem tudjuk, hogy milyen enzimet tartalmaz az adott kórokozó, ezért ennél hosszabb reakció ajánlott általánosságban (120 perc) itt is, hogy a kisebb aktivitású enzimek lassabb folyamatai ne hogy fals negatív eredményeket adjanak.

Az optimalizálás révén el tudtunk készíteni egy olyan szilárd protokollt, mellyel nagy hatékonysággal tudunk szűrővizsgálatszerűen, nagy mennyiségű baktériumot vizsgálni cefotaximmal végzett reakciókban. Az optimalizálási folyamatok egyértelmű értékeléséhez bevezettünk egy olyan értékelést segítő score-rendszert, mellyel nagyon jó közelítéssel tudtuk nyomon követni a reakcióelegyeinkben történő változásokat közvetve, azaz a megjelenő enzimikus termékek vagy éppen a megmaradó natív molekulák mennyiségéből, relatív intenzitáskülönbségeiből. A score-rendszerben a keresett marker peakeknek nem a számítható intenzitásának vagy AUC értékének eredményeit vettük figyelembe, mert mindezeket nem találtuk elegendően konstans tényezőknél a mérési párhuzamosok alapján, hanem a peakek egyértelműségét, egész spektrogramhoz való viszonyát, rutin vizsgálatokban való könnyű felismerhetőségét értékeltük és rendeltük hozzá egy egyszerű számsorhoz:

- nincs peak: 0
- nagyon kis intenzitással, de van peak: 1
- egyértelmű peak: 2
- kimagasló intenzitású peak: 3

Az optimalizálási folyamatokat duplikált mérésekkel végeztük el a mérési bizonytalanságok kiküszöbölése okán, az így kapott score értékek emiatt tovább finomodtak. Emellett kimutattuk, hogy az apróbb intenzitásváltozások az egyébként is alacsony intenzitású peakeknél nem feltétlenül függnek csak a vizsgált baktérium bármilyen aktivitásától, hanem a műszeres detektálás minőségében történő kisebb-nagyobb változásoknak is betudhatóak, de azt is tapasztaltuk, hogy bizonyos termékek megjelenése és intenzitása nem csak az optimalizációtól vagy a körülményektől függ, hanem magától a vizsgált baktériumban termelődő enzim típusától is, annak különböző mértékű affinitásától a különböző natív formákhoz (lásd pl 461 Da-os hidrolízis termék cefotaxim esetén). Cefotaxim esetén a spontán bomlás nagyon kis mértékű volt hosszú idejű inkubációk esetén is (414 Da-os termék).

Az optimalizálási folyamat során megfelelő inkubációs időnek a 120 percet, megfelelő inkubációs hőmérsékletnek a $36\pm 1^\circ\text{C}$ -ot, optimális cefotaxim végkoncentrációnak pedig a 0,25 mg/ml értéket állapítottuk meg. Ez utóbbi a szakirodalmi ajánlásnál kicsivel alacsonyabb koncentráció, de tapasztalataink szerint az értékelhetőség e koncentráción egyértelműbb volt. A reakcióterfogat tesztelését a cefotaxim reakciók optimalizáló folyamataiban végeztük el, és mivel az eredmények teljesen egyértelműek voltak, ezt az itt megállapított 20 μl -es végtérfogatot fogadtuk el más reakcióelegyeink standardjaként is.

A kidolgozott módszerrel 2-3 munkaóra után interpretálni tudjuk egy friss izolátumról cefotaxim enzimátikus módosítási reakció és klavulánsavas inhibíciós párhuzamos vizsgálat segítségével, hogy ESBL-termelő-e vagy sem. Ez az interpretáció körülbelül 15 egyéb béta-laktám antibiotikum azonnali rezisztensként való interpretációját is maga után vonja, vagyis ezen izolátumok ellen nem használhatók sem az egyszerűbb penicillinszármazékok, sem a béta-laktamázgátlóval kombinált aminopenicillinek (pl. Augmentin), sem cefalosporinok, sem pedig monobactam antibiotikumok (pl. aztreonam). A tesztről mindenképpen kijelenthető, hogy nagy hatásfokú és valóban gyors diagnosztikai vizsgálat.

Vizsgálataink során azt is tapasztaltuk, hogy enzim és enzim között kisebb-nagyobb különbségek fedezhetők fel termékeik alapján is. A hasonló működésű és talán azonos enzimesaládba is tartozó egyes enzimtípusok affinitása és aktivitása nyilvánvalóan különböző lehet egyes szubsztrátok iránt, ezért a hidrolízis után kapott peakmintázatok is kis mértékű eltéréseket mutathatnak. Ilyen esetekben az egyes enzimek megkülönböztetésére ez a MALDI-TOF MS metodika már sajnos nem elegendő. A módszer viszont alkalmas lehet arra, hogy a különböző peak-mintázatok összehasonlítása alapján felvetődjön a gyanú, hogy az egyes vizsgált baktériumokban más és más enzim- pl. különböző ESBL-típusok vannak jelen.

Előfordulhatnak olyan ritka esetek, amikor a hagyományos korongdiffúziós és egyéb eredmények (kulcslyuk torzulás, cefoxitin-É, cefepim-R, ceftazidim-R, D68C) nem mutatják egyértelműen vagy egybehangzóan a jellegzetes ESBL fenotípust, ettől függetlenül még mindig fennállhat annak lehetősége, hogy ESBL enzimet termel az izolátum, ilyenkor még egy ún. IRT, azaz inhibitor rezisztens TEM típusú ESBL enzim is lehet az ellentmondás megoldása (Class A 2br). Ebben a ritka, de valójában nem kizárható esetben még az inhibitorokkal kiegészített MALDI-TOF MS kísérletek sem vezethetnek itt eredményre: a pozitívítás itt is látható lesz a cefotaxim béta-laktamáz aktivitású enzim általi módosításán, de az inhibíciós vizsgálat nem fogja igazolni az ESBL-enzim jelenlétét.

Olyan eseteket is tapasztaltunk, ahol felmerült a gyanú, hogy egyszerre több enzimet is termel az adott baktérium, ilyenkor a MALDI-TOF MS néhány inhibitoros vizsgálata sem lehet elegendő minden információ megszerzésére, azaz ilyen esetekben nem biztos, hogy egyértelmű eredményeket kapunk vizsgálatainkból. Ezek miatt azt kell megállapítanunk, hogy a módszer teljes biztonsággal úgy használható, ha mellette párhuzamosan a hagyományos metodikák laboratóriumi folyamatait is elindítjuk és mindezeket együtt értékelve adunk végleges eredményt a klinikum felé. A módszert finomíthatja, ha sikerülne olyan specifikus inhibitorokat találnunk, melyek segítségével valóban képesek lehetnénk kiszűrni a többszörös enzimtermelő vagy ritkább enzimeket termelő törzseket is MALDI-TOF MS vizsgálattal.

AmpC-termelés esetén például az irodalomból ismert AmpC-inhibitor APBA nem váltotta be a hozzá fűzött reményeket, ismertén AmpC-termelő törzseinkről nem tudtuk APBA inhibíciós párhuzamos vizsgálattal bizonyítani, hogy a cefotaxim rezisztenciájuk hátterében AmpC enzim termelése áll. Közvetett bizonyítékokat találtunk, de egyértelműen nem volt eldönthető ez a kérdés a használt módszerrel.

A cefotaximmal kapcsolatos egyik legalaposabban kidolgozott irodalmi forrás [120] adataival megegyezően mi sem találtuk meg méréseink során azt az enzimátikus

bomlásterméket, amelynek elméletileg a 456 Da molekulatömegű natív protonált $[M+H]^+$ formának a közvetlen hidrolíziséből kellene származnia: $456+18=474$ Da. Valószínűsítjük, hogy a deacetilálódás még a hidrolízis előtt lejátszódik és alakul ki a hidrolizált, deacetilálódott, protonált forma (414 Da) $[M_{\text{hydr-Ac}}+H]^+$.

E tanulmány arról is ír, hogy a 396 Da-os termék teljes eltűnése figyelhető meg minden általuk vizsgált cefotaxim rezisztens baktérium esetében (vagyis ez alapján definiálják a cefotaximra is kiterjedő béta-laktamáz pozitivitást). Ezt mi határozottan cáfolni tudjuk: sok cefotaxim rezisztens törzsnél találtuk meg ezt a terméket a hidrolizált termék mellett is, például az ismeretlen béta-laktamázt tartalmazó G1/54 *Citrobacter koseri* (9. ábra, 7. Függelék), vagy a két ESBL termelő *Enterobacter cloacae* izolátumunk (G1/46 és G1/57) (10. ábra, 8. Függelék), de például a metallo-béta-laktamáz termelő G1/84 *E. coli* (szintén 10. ábra, 8. Függelék) is tökéletesen rezisztens cefotaximra (is), ettől függetlenül a mérések során megtaláltuk a hidrolizált termék és a natív formák jeleit is a baktérium reakcióelegyéből. Az ESBL-pozitivitás definiálásához sem szükséges feltétel tehát a 396 Da-os termék jelének teljes eltűnése az ESBL-termelő *Enterobacter cloacae* (G1/46, G1/57) izolátumok kísérleteinek tanulságai szerint, és ez valószínűleg egyéb béta-laktamázokra is igaz (G1/84).

A cefotaximra kiterjedő béta-laktamáz pozitívitás definiálásához mi csak megengedő feltételként használtuk a natív formák jeleinek eltűnését a mintákból, de tapasztalataink alapján lehet ez csak intenzitáscsökkenés is. Szükséges feltételként definiáltuk viszont valamely hidrolizált termék jelének megjelenését, de ez alól kivételt képez a 461 Da-os termék, ha az csak önmagában mérhető más hidrolízistermékek nélkül.

Összességében tehát kijelenthetjük, hogy a cefotaxim és a klavulánsav külön és együtt végzett párhuzamos reakcióelegyeivel nagyon jó hatásfokkal detektálható ESBL enzimaktivitás, mely alól azért találtunk kivételeket, mert többszörös és többféle enzim hordozása, vagy ismeretlen béta-laktamáz, vagy IRT ESBL esetén még ez a módszer sem adhat megbízható eredményeket. Az AmpC kimutatást ebben a kísérletsorozatban sikertelennek nyilvánítottuk. De mivel az ESBL-termelő baktériumok aránya messze meghaladja az inkább ritkábbnak számító AmpC-hordozást, ezért nagyon hasznos és nagyon gyors diagnosztikai eszközként tekintünk a cefotaximmal és ESBL-inhibitorral végezhető MALDI-TOF MS MBT-ASTRA tesztekre.

23.2. Tapasztalatok és eredmények a ceftazidimmal végzett mérésorozatokból

A ceftazidimmal végzett vizsgálatok eredményei általánosságban kifejezetten kiábrándítóak lettek. Az optimalizáló folyamatokat elindítottuk, melyekben optimális értékekhez közelítő paraméter értékeket találtunk is (hőmérséklet: $36\pm 1^\circ\text{C}$, inkubációs idő: 180 perc (hosszabb mint a cefotaximnál!), optimális ceftazidim antibiotikum koncentráció: 1 mg/ml), de a detektálhatóság végig alapvető problémákat mutatott a kísérletsorozat folyamán. A ceftazidim gyors, intenzív és spontán bomlása miatt a vele való vizsgálat nem volt biztonságosnak tekinthető, az enzimatis aktivitás az abiotikus eseményektől nem is volt differenciálható. A detektálható jelek általános intenzitása viszonylag alacsony is volt, ami az értékelést is sok esetben megnehezítette.

Az optimalizáló érzékenységvizsgálati reakciókból, és a már a validitásvizsgálatban is „elbukott” ceftazidim tesztekéből végül nem tudtunk olyan egységes szabályrendszert alkotni, mely alapján egyértelmű definíció lett volna adható arra, hogy miként értékelendő az itt ceftazidim rezisztenciát biztosító béta-laktamáz aktivitás. A natív peakek eltűnése sosem valósult meg, a módosított termékek jeleinek megjelenése pedig a spontán abiotikus eseményektől nem volt egyértelműen elkülöníthető. Sem ESBL-termelés, sem AmpC-termelés kimutatására nem találtuk alkalmasnak a módszert, és sajnos alapvetően még magának a béta-laktamáz aktivitásnak az igazolásához sem volt elegendő. Az inhibíciós kísérletekben gátló hatást nem sikerült megfigyelnünk, de indukció sem történt.

Tulajdonképpen már a negatív és a pozitív kontrollokként használt törzsek eredményei sem voltak egymástól megkülönböztethetőek. A módszer alapjaiban sem volt megfelelő, rutin vizsgálatokhoz a ceftazidim gyors, spontán bomlása miatt nem biztonságos, az enzimatis aktivitás az abiotikus eseményektől nem differenciálható. A cefotaxim vizsgálata mellé eredeti terveink szerint kiegészítőnek, sőt alternatívának szánt antibiotikum, a ceftazidim, vizsgálataink alapján nem megfelelő kiindulási anyag MALDI-TOF MS MBT ASTRA érzékenységvizsgálatokhoz rutin munkát végző mikrobiológiai laboratórium számára.

23.3. Tapasztalatok és eredmények az ampicillinnel végzett mérésorozatokból

Az ampicillin szintén rendelkezik olyan, esetünkben ismét hátrányos tulajdonsággal, hogy spontán abiotikus bomlás játszódik le intakt oldatában is, de itt ennek mértéke nem olyan nagyon nagy mértékű, mint a ceftazdim esetén. Ennek ellenére az ampicillin enzimátikus bontásán alapuló MALDI-TOF MS vizsgálatok értékelését nagyon körültekintően kell végezni és ezek miatt már a validáló folyamatokban eldőlt, hogy nem lehet elégséges feltétel a béta-laktamáz pozitivitás kimondásához, ha egyik-másik bomlástermék a reakcióelegyek méréséből megjelenik alacsony intenzitással.

A kísérleti és screenelő mérések alapján a béta-laktamáz aktivitás definiálásához ez esetben a natív termékek eltűnésének vagy nagyon jelentős csökkenésének detektálása szükséges. *Enterobacteriaceae* izolátumok esetén azok a törzsek voltak definiálhatók pozitívként, azaz ampicillin bontására képes béta-laktamáz termelőként, amelyeknél a natív peakek közül egy sem marad meg a reakcióelegy felülűszójában vagy csak nagyon kis intenzitású jelként marad meg, míg a hidrolízis termékek közül a 324 és 368 m/z mindig, a 390 m/z ~80%-ban, a 414 m/z pedig ~70%-ban jelen volt, de a legutóbbi nem mindig egyértelműen detektálható intenzitással. Negatívként pedig azokat definiálhattuk egyértelműen, amelyeknél a natív formák nagy jelintenzitással megmaradtak, de a bomlástermékek kis intenzitással a spontán bomlás révén még detektálhatók lehetnek.

A cefotaxim kísérletében látottakhoz hasonlóan itt is felfedezhettük, hogy a különböző enzimek különböző affinitással és aktivitással viselkednek az egyes natív szubsztrát molekulák iránt. Erre közvetett bizonyítékként azt állapíthattuk meg, hogy több esetben látható volt, hogy ezek a bontási peak-mintázatbeli különbségek a különböző antibiotikum kísérleti sorozatokon átívelő módon egymáshoz az azonos törzseknél mégis hasonlóak voltak, vagyis az egyes enzimek működése a különböző antibiotikumok esetén bizonyos mértékű hasonlóságokat is mutattak.

Az ampicillinnel végzett vizsgálatok során sikerült olyan módszerhez jutnunk, mellyel nagyon jó hatásfokkal tudtuk elkülöníteni a hagyományos laboratóriumi módszerekkel csak elég szubjektív megítélésű módon megkülönböztethető *Haemophilus* rezisztenciacsoportok közül a BLNAR és a BLPACR törzseket. Mindez az ampicillin MALDI-TOF MS bontási kísérleteivel tehát kivitelezhető. A két béta-laktamáz pozitív *Haemophilus* csoport, a BLPACR és a BLPAR egymástól nem voltak biztonságosan elkülöníthetőek a módszerrel. BLPAR és BLPACR csoportok esetén láthatók ugyan különbségek a kapott mérési spektrumokon, ezek a különbségek azonban csak kis számú mintából származnak és nem voltak elégséges minőségűek a biztos differenciáláshoz. A BLPAR törzsekkel végzett kísérleteink eredményei nem voltak egyértelműek, de a BLNAR csoporttól való megkülönböztetésük ezzel a módszerrel is megoldhatónak látszott. A módszer tehát nem teljes, de mivel elsősorban a hagyományos tesztek lassúsága és bizonytalansága miatt keresünk új módszereket e témában is, így az elért részeredményeket is nagyra értékeltük.

Két olyan *Haemophilus parainfluenzae* kórokozó izolátumot is sikerült találnunk kísérletsorozatunk során, melyekről bizonyítható volt MALDI-TOF MS ampicillin vizsgálattal, hogy nem abba a csoportba tartoznak, melyekbe előzetesen a hagyományos tesztek alapján interpretálva lettek. Az ampicillinnel végzett MALDI-TOF MS béta-laktamáz

aktivitás detektálási reakció révén az egyik törzs, mely BLNAR-ként került leírásra, bizonyítottuk, hogy béta-laktamáz termelő, tehát nem BLNAR, egy BLPAR törzsként leírtról pedig, hogy nem rendelkezik béta-laktamáz aktivitással, vagyis BLNAR törzs. Sajnálatos módon ezek a törzsek vizsgálataink előtt jóval korábban lettek interpretálva, így klinikai következményt már nem vont maga után, de az mindenképpen pozitívan értékelendő, hogy ebben a MALDI-TOF MS vizsgálat típusban egy valóban megbízható és egyszerű béta-laktamáz detektáló teszt áll rendelkezésünkre eszköztárunkban. Itt megjegyzendő még azonban, hogy a vizsgált rezisztenciacsoporthoz (BLNAR, BLPAR) hagyományos identifikálása is rendkívül bonyolult folyamat, melyet az eddig leírtakon kívül olyan, viszonylag újonnan felfedezett „komplikációk” is tarkítanak, mint például az olyan BLNAR törzsek, melyekről mégis kimutatható, hogy van valamilyen béta-laktamáz aktivitása [133]. Ez azt jelenti, hogy az egyes csoportok differenciálási problémái abból is adódnak, hogy az egyes csoportok még mindig nem elég alaposan definiált és kategorizált csoportok valójában.

Az ampicillinnel végzett MALDI-TOF MS MBT-ASTRA vizsgálatok a legtöbb esetben egyértelmű és jó értelmezhető eredményeket adtak. Sikeres definíciót alkotunk a pozitív és a negatív kimondására, azaz hogy az adott törzs rendelkezik-e ampicillin bontására alkalmas enzimaktivitással vagy sem. *Enterobacteriaceae* esetén aminopenicillinázok és ESBL enzimek működése kiválóan kimutatható (de nem megkülönböztethető!). Az AmpC és a karbapenemáz enzimeknek az ampicillin különböző formáit hidrolizáló aktivitása kissé eltér a leggyakoribb béta-laktamázokétól (penicillinázok, ESBL-ek), ezért itt nagy precizitással kell értékelni a nyers adatokat, viszont a módszer mindent egybevetve egyértelműen működőképes és eredményes.

Mindezek ellenére *Enterobacteriaceae* törzsek esetén alapvetően megkérdőjelezhető, hogy mennyire releváns egy ilyen vizsgálat a klinikai gyakorlatban, hiszen tulajdonképpen a béta-laktamáz aktivitás igazolásán vagy elvetésén túl nem ad egyéb információt. Gyakorlatilag egy egyszerű ampicillin rezisztenciát okozó aminopenicillináz és egy ESBL enzim ugyanolyan peak-mintázatot és ugyanolyan eredményeket ad ampicillinbontásos MALDI-TOF MS vizsgálatban, sőt a klavulánsavas inhibíciós kísérletben is, és egy „béta-laktamáz pozitív” eredmény nyilvánvalóan közel sem elegendő információ sok esetben. Mivel elég népes enzimsaládról van szó, ezért nagyon nagy jelentősége van annak, hogy milyen enzim is végzi valójában az ampicillin hidrolízisét az adott izolátumnál, mert ez alapvető módon befolyásolja a megfelelő interpretációból származó célzott terápia lehetőségeit a klinikus számára is.

Haemophilus törzsek BLNAR, BLPAR és BLPACR tulajdonságának felderítése hagyományos eljárásokkal is nehézkes, sok esetben nem teljesen objektív a nitrocefin hidrolízis különböző mértéke, sebessége és egyéb tényezők miatt, így a keletkező piros színreakció sem ad mindig egyforma és egyértelműen azonosítható eredményt. Kísérleteink során megpróbáltuk megkülönböztetni e három nagy rezisztens csoportot egymástól MALDI-TOF MS MBT-ASTRA módszerrel is. Eredményként egyelőre kijelenthetjük, hogy a BLNAR és a BLPACR törzsek legtöbbje egyértelmű és szépen differenciálható eredményeket

adott, a béta-laktamáz termelő törzseket viszont (BLPAR és BLPACR) egymástól egyelőre nem tudtuk elkülöníteni inhibíciós vizsgálatokkal sem.

23.4. Tapasztalatok és eredmények a penicillinnel végzett mérésorozatokból

A penicillinnel végzett kísérleteket nem tekintjük sikeresnek. A sikertelenség okában egyértelműen a következőket látjuk.

A penicillin nagyon könnyen hidrolizál spontán módon már szobahőmérsékleten, nem tekinthető stabil molekulának. Validáló vizsgálataink során minden bomlástermék jól detektálható módon jelen volt már az intakt és +4°C-on tárolt, de a natív és 36°C-on inkubált tiszta penicillin oldatokban is. Az értékelésnél nem találtunk olyan egyértelmű szabályszerűséget, mely alapján a béta-laktamáz aktivitás definiálható, vagy egyáltalán biztosan megállapítható lett volna. Ugyanígy nem találtunk definíciót a béta-laktamáz aktivitás hiányára sem, mert negatív kontroll törzseink eredményei nem voltak megkülönböztethetőek a béta-laktamáz termelőkként ismert törzsekétől. Egyetlen jellegzetességet észleltünk: a 357 m/z értékű peak a béta-laktamáz termelő törzsekkel való inkubáció után az esetek 55%-ában teljesen eltűnt, 89%-uknál pedig vagy egyáltalán nem volt meg vagy maximum csak nyomokban volt detektálható. Ez valószínűleg jó irány lehet az értékelésben, de a korábbi vizsgálatokban egyértelműen pozitívnak ítélt törzsek közül többenél is kaptunk ennek gyökeresen ellentmondó eredményeket is.

A benzilpenicillin alapmolekula spontán bomlásának elfogadhatatlanul nagy mértéke és az ebből adódó bomlástermékek állandó és nagy intenzitású jelenléte, a várt peakek átfedése a mátrixként használt molekula jelével, az értékelésnél felmerülő nehézségek és nyilvánvaló ellentmondások, és nem utolsósorban az antibiotikum ilyen módon való vizsgálatának alacsony relevanciája miatt azt a döntést hoztuk meg, hogy a benzilpenicillin MALDI-TOF MS MBT-ASTRA vizsgálatokra nem megfelelő.

23.5. Tapasztalatok és eredmények imipenemmel és meropenemmel végzett mérésorozatokból

Az imipenemmel végzett kísérletek sikeres kivitelezése az egyik legfontosabb célja volt kezdeti terveinknek. A karbapenem rezisztencia kimutatása napjainkban nagyon fontos laboratóriumi feladat, hagyományos metodikák alapján egyértelmű detektálása nem is lehetséges minden esetben, az újabb kromogén Carba-NP tesztek mellett más módszer nem is létezik, mellyel nagy hatékonysággal és gyorsan ki tudnánk mutatni ezt a ma még ritka, de annál fontosabb rezisztenciatípust. A módszer ebben az esetben is az eddigiekhez követett váz mentén folyik, de itt egyetlen natív forma és egyetlen hidrolízis termék van jelen az enzimreakció előtt és után. Kis mértékű spontán bomlás is detektálható, de ez nem volt zavaró mértékű és az enzimreakció révén kialakuló peak-mintázat értékelésénél sem zavaró.

Optimalizáló folyamatainkban megállapítottuk a legmegfelelőbb paraméter értékeket: optimális inkubációs hőmérséklet: $36\pm 1^\circ\text{C}$, optimális imipenem koncentráció: 0,5 mg/ml.

Pozitív esetben, vagyis ha a vizsgált baktérium rendelkezik imipenem bontásához megfelelő enzimmel (karbapenemázzal), akkor a natív $[\text{M}+\text{H}]^+$ antibiotikum forma jele a reakcióelegy felülűszójából eltűnik, a hidrolizátum megjelenése viszont az irodalmi adatokkal nem egyező módon, egyik esetben sem volt kimutatható. Negatív esetben a natív forma jele változás nélkül kimutatható a reakcióelegyből. Specifikus inhibitorral a reakció tökéletesen gátolható volt. APBA és EDTA specifikus inhibitorok párhuzamos alkalmazásával elkülöníthetőek a különböző enzimcsaládokba tartozó karbapenemázok. A rendelkezésünkre álló karbapenemáz pozitív törzs APBA enzimmel volt gátolható, így ezek alapján kijelenthető róla, hogy a Class A 2f enzimcsaládba tartozó karbapenemáz enzimek valamelyikét képes termelni. Az EDTA-val gátolható karbapenemázok a Class B család karbapenemázai.

Az optimalizált feltételek mellett elvégzett screenelő vizsgálatunkba olyan törzseket vontunk be, melyek imipenem rezisztenciát vagy csökkent érzékenységet mutattak hagyományos laboratóriumi módszerekkel. Mivel a törzsek legtöbbször csak imipenem antibiotikummal való inkubálás utáni reakcióelegyből nem adott semmilyen, a hidrolízisre utaló peakmintázatot, ezért ezekről kijelenthető, hogy imipenem rezisztenciájukat nem béta-laktamáz aktivitás alapján nyerik, hanem valószínűleg egy összességében egyébként is gyakoribb karbapenem rezisztencia-mechanizmus révén: egy porin fehérje hiánya vagy jelentősen csökkent expressziója váltja ki rezisztenciájukat vagy csökkent érzékenységüket (ennek eredményeként semennyi vagy csak kevesebb antibiotikum jut be a sejtbe).

Mindezek miatt kijelenthető tehát, hogy imipenem rezisztencia hagyományos detektálása után, a MALDI-TOF MS imipenem + inhibitor módszerünkkel vizsgált izolátumokról el tudjuk dönteni, hogy imipenemet módosító enzim termelése vagy nem enzimikus rezisztenciamechanizmus révén mutatják az imipenem rezisztens fenotípust.

Egy érdekes eset rávilágított arra, hogy a módszernek vannak korlátai is, de amint megismertük ezeket a korlátokat, rögtön egy másik felhasználási lehetőség fel is merült a tesztünkkel kapcsolatban.

Egy ismert AmpC-termelő izolátumunk ugyanis egyértelműen teljesítette az imipenemre vonatkozó pozitív definícióinkban foglaltakat. Az optimalizáló folyamatokhoz használt karbapenemáz pozitív törzs eredményeivel azonos eredményeket adott: az imipenem natív formáját tökéletesen bontotta, APBA-val történő inhibíciós párhuzamosban pedig világosan gátolható volt ez az aktivitás. Ezek alapján elvileg kijelenthető lenne, hogy a törzs karbapenemáz termelő, de itt még mindez nem elégséges bizonyíték arra, hogy ez az enzim valóban karbapenemáz lenne. Az APBA-val gátolható enzimek, melyek képesek karbapenemeket hidrolizálni a Class A 2f csoport tagjai. Ismert volt törzsünkéről megbízható D68C teszteredmény révén, hogy tulajdonképpen AmpC-termelő, vagyis Class C csoportba tartozó enzimmel rendelkezik, amelyek viszont szintén gátolhatók APBA-val (vagyis most az APBA itt nem „elégge” specifikus inhibitor). Többféle baktériumnál is ismert az a jelenség, hogy az AmpC enzim nagyon nagy mennyiségű termelésével, ún. over-expressziójával a törzs karbapenem rezisztenciát vagy csökkent érzékenységet is tud szerezni. Az over-expresszió indukciója pedig valamilyen antibiotikum is lehet, és feltételezésünk szerint, az imipenem ebben a reakcióban valóban inducerként viselkedhetett.

Nagyon nagy jelentősége van annak a ténynek, hogy az AmpC enzimek túltermelése karbapenem rezisztenciát vagy csökkent érzékenységet hozhat létre egyes baktériumokban, mert az ESBL és az „egyszerűbb” AmpC termelő izolátumoknál az elsőként felmerülő lehetséges terápiás irány a karbapenemek használata. Vagyis mindenképpen eldöntendő kérdés az, hogy az AmpC-termelés túltermelés-e, mely a többi béta-laktám antibiotikummal szembeni rezisztencián kívül okozhat karbapenemekkel szembeni rezisztenciát is.

A kísérletek alapján tehát a karbapenemáz aktivitás igazolható ugyan APBA gátlószerek alkalmazásával MALDI-TOF MS vizsgálatban, de ha az APBA inhibíciós reakcióiból kapunk pozitív eredményeket, és összesen csak ennyi információ áll rendelkezésünkre, akkor még ez nem elegendő annak eldöntésére, hogy vajon Class A 2f

karbapenemáz enzim, vagy overexpresszált Class C AmpC enzim működik-e az adott izolátumban, mely a karbapenem rezisztenciát előidézi.

(Itt megjegyzendő, hogy ugyanez a jelenség a Carba-NP-teszttel sem volna elkülöníthető az igazi karbapenemáz enzimektől származó aktivitásoktól, mert ott is ugyanez az enzimreakció játszódna le és ugyanúgy pozitívként lenne értékelhető a kromogén teszt is.)

Ha viszont a vizsgálati módszereket kombinálva használjuk, és tudjuk, hogy izolátumunk AmpC-termelő (pl D68C teszt), hagyományos korongdiffúzióval imipenemre csak mérsékelten érzékeny, esetleg még a nem túl megbízhatónak tartott módosított Hodge-teszttel is kétes, de pozitívnak tűnő eredményt ad, mindezek mellett pedig MALDI-TOF MS inhibíciós módszerrel bizonyítjuk, hogy imipenem hidrolízisre képes a törzs, mely APBA-val gátolható, akkor az eddigi adatokból nagyon nagy valószínűséggel megállapítható, hogy az izolátum AmpC over-expresszálo és ellene emiatt semmilyen karbapenemet nem szabad használni, mert az biztos terápiás kudarcot jelentene az így kezelt betegnél.

Mindezek alapján kijelenthetjük, hogy az imipenem enzimátikus hidrolízisén alapuló MALDI-TOF MS módszer önmagában kiválóan működik, specifikus inhibitor párhuzamos reakciók alkalmazása azonban mindig kötelező a csak imipenemet tartalmazó reakcióelegyek mellett. Akár AmpC over-expresszálo, akár valós karbapenemáz aktivitású a vizsgált törzs, egyik esetben sem indulhat nála karbapenem terápia, de nem szabad abba a tévedésbe esni, hogy karbapenemázként interpretálunk egy AmpC túltermelő izolátumot.

A cefotaximmal és APBA-val végzett vizsgálatok során nem sikerült igazolni a D68C teszt révén AmpC-termelőként ismert G1/86 *Enterobacter asburiae* törzsünkről, hogy valóban AmpC-enzim termelő volna vagy sem, a bizonyíték érdekes módon itt, az imipenemmel folytatott kísérletek során került elő. Vagyis a módszerünk nem csak a klasszikus karbapenemáz enzimek működését képes feltárni, hanem AmpC enzimek esetében a túltermelés tényét is megállapíthatjuk vele. És mint láthattuk, AmpC gyanús törzsek esetében egy ilyen plusz vizsgálatra még szükség is lenne, hogy elkerüljünk egy terápiás kudarcot, ha karbapenemet kap a beteg, de a kórokozó AmpC enzime over-expresszálo és ezt az over-expressziót az imipenem még indukálja is.

Az imipenem MALDI-TOF MS érzékenységvizsgálati módszer önmagában tehát tökéletesen működőképes, de nagy figyelemmel kell lenni az inhibitoros párhuzamosokkal kapott eredményekre és ezek tükrében szabad csak biztosan karbapenemáz enzim termelését interpretálni az eredmények alapján.

Emellett, mint láthattuk, az imipenem MALDI-TOF MS érzékenységvizsgálat nem csak az imipenem rezisztenciák közvetlen kimutatására lehet alkalmas, hanem eredményeit más tesztek eredményeivel kombinálva, végül egy sokkal színesebb és részletgazdagabb képet kaphatunk a vizsgált baktériumok rejtett tulajdonságairól.

Ennél a fejezetnél kell megjegyeznünk, hogy az imipenemen kívül egy másik karbapenem antibiotikumot, a meropenemet is próbáltuk bevinni ezekbe a kísérletekbe. Szerettünk volna egy alternatív lehetőséget is kipróbálni ennek a nagyon érdekes témának a lehetséges további eszközeként. Ezek a kísérletek azonban sajnos nem jártak sikerrel, valószínűleg maga a vásárolt antibiotikum vagy annak talán csak a kiszállítási körülményei nem voltak megfelelőek, mert gyakorlatilag semmilyen eredményt nem tudtunk „kiszajtolni” a meropenemmel végzett vizsgálatokból. Sem a validitásvizsgálatokban, sem screeneléssel, sem sehogy máshogy nem sikerült valamilyen spektrálisan elfogadható és értékelhető eredményeket produkálni ezzel az antibiotikummal.

23.6. Tapasztalatok és eredmények a ciprofloxacinnal végzett méréssorozatokból

A ciprofloxacinnal folytatott kísérletekbe nem sok reménnyel fogtunk bele. Tudtuk, hogy létezik olyan rezisztenciátípus, melynél egy enzim módosításokat hajt végre a ciprofloxacinnal és hogy ez elvileg MALDI-TOF MS-sel is kimutatható volna, de úgy gondoltuk, hogy ez csak egy viszonylag ritka, távol-keleti különlegesség, melyet néhány más országban talán már be is hurcoltak a jelenség 2003-as felfedezése óta. Tudtunk róla, hogy már Magyarországon is izoláltak ilyen kórokozókat, de azt gondoltuk, hogy egy nagy mintaszámmal dolgozó, központi mikrobiológiai laboratóriumban ez azért előfordulhat [152].

Ennek ellenére klinikai mintáinkból véletlenszerűen kiválogatott Gram-negatív baktériumokat gyűjtöttünk össze, melyek ciprofloxacinnal rezisztenciát mutattak hagyományos antibiogramon. A törzsek közül egyet kiválasztottunk, mellyel az optimalizáció folyamatokat kívántuk elvégezni, ám ez a törzs, mint az eredményekből kiderült, nem volt alkalmas erre a feladatra. Emiatt a vizsgálatokat fordítva kellett kivitelezni, először a screenelés volt a fontos, az optimalizálás csak ezután következhetett. A screeneléshez használt vizsgálati paramétereket szakirodalmi tanulmányokból merítettük [125].

A törzseink közti screenelés vizsgálatának eredményei azonban szépen sikerültek, két olyan járóbetegmintából származó *E. coli* izolátumot is találtunk, melyeknél egyértelműen kimutathatóak voltak a ciprofloxacinnal enzimátikus módosításának nyomai MALDI-TOF MS spektrumokon. Pozitív esetben egyértelmű és erős intenzitású jelekként megjelentek az acetilált formákhoz tartozó peakek is, a natív formák eltűnése nem volt észlelhető egyik esetben sem. Az egyik izolátumnál a 370 m/z jelű natív $[M+K]^+$ formát csak nagyon gyenge intenzitású jelekként sikerült a mérésben kimutatni, ennek megfelelően az ebből keletkező 412 m/z értékű acetilált forma $[M+Ac+K]^+$ már nem is volt mérhető. A másik izolátumnál mindhárom natív és mindhárom acetilált forma is tökéletesen kimutatható és értékelhető volt. A mérési eredmények egyértelműen és világosan mutatták a két pozitív mintánál a keresett AAC(6['])-Ib-cr enzim specifikus transzacetiláz aktivitását a ciprofloxacinnal natív formáin. A

transzacetiláció jelensége nagyon specifikus enzimtevékenység eredménye, azaz nem lehet valamilyen enzimtevékenységen kívüli egyéb eseményként magyarázni jelenlétüket.

A ciprofloxacín rezisztencia acetiltranszferáz által kialakított típusának kimutatása vizsgálataink alapján kiválóan működik az alkalmazott MALDI-TOF MS MBT-ASTRA módszerünkkel. A vizsgálatba beválogatott 10 ciprofloxacín rezisztens *Enterobacteriaceae* törzs (+1 *Pseudomonas*) közül 2 *E. coli* izolátumot találtunk, melyek ezt a rezisztenciátípust hordozzák. Ezen a nem reprezentatív mintán ez az arány ~20%, ami elég magasnak mondható annak ismeretében, hogy maga a rezisztenciamechanizmus is még csak 16 évvel ezelőtt került először leírásra Délkelet-Ázsiában.

Az AAC(6')-Ib-cr acetiltranszferáz pozitívítás definiálásához elegendő feltételként elfogadtuk a specifikus reakcióban létrejövő acetilálódott termékek jelenlétét, emellett megállapíthatjuk, hogy a natív termékek intenzitása a létrejövő termékekhez képest nem szükséges, hogy csökkenést mutasson ebben az esetben. A negativitás definiálásához elegendő feltétel, ha a hagyományos ciprofloxacín rezisztencia megállapítás ellenére nem jönnek létre reakcióelegyeinkben a specifikus enzim által generált termékek, a natív antibiotikum molekulák viszont ugyanúgy jelen vannak a spektrumokban.

Ennek a típusú ciprofloxacín rezisztenciának a kimutatása és gyorsdiagnosztikus jelentősége természetesen fontos, de az egyelőre elterjedtebb „hagyományos” fluorokinolon rezisztenciák magasabb aránya miatt nem lehet szűrővizsgálat jellegű. A hagyományos mikrobiológiai fluorokinolon rezisztencia kimutatás mellett, vagy mivel elég ritkán fordul elő kétes vagy bizonytalan eredmény ezeknél a teszteknel ciprofloxacín esetében, inkább azt kiegészítve ajánljuk a MALDI-TOF MS vizsgálatot. Az ehhez megfelelő törzsek kiválogatásában szerepet játszhat az is, ha az antibiogram elkészítésekor a ciprofloxacín mellett levofloxacin és moxifloxacin antibiotikumkorongokat is használunk, ezekre ugyanis a korábban már említett okok miatt az AAC(6')-Ib-cr enzimet hordozó ciprofloxacín rezisztens baktériumok érzékenyek (ez persze csak akkor van így, ha csak egyféle fluorokinolon rezisztencia van jelen az adott törzsben).

Érdekes megfigyelés volt az is, hogy mindkét, pozitívnak minősített törzsünk egyben ESBL-termelő is volt, ez aláhúzza azt a tényt, hogy az ESBL-plazmidok sok esetben hordoznak egyéb rezisztenciagéneket is [146]. A kísérletbe beválogatott ciprofloxacín rezisztens törzseink 81%-a egyben ESBL termelő is volt. Statisztikailag nem túl biztos lábakon álló számításunk alapján pedig ez az elméletileg új rezisztenciátípus a magyarországi járóbeteg állomány izolátumaiból vett véletlenszerű és nagyon kis elemszámú mintájában körülbelül 20%-os arányt ért el, amit a történeti adatok ismeretében magasnak gondolunk.

Tesztjeink eredményessége és nagyon jó értelmezhetősége alapján egyértelműen kimondhatjuk, hogy a ciprofloxacín alapú MALDI-TOF MS érzékenységvizsgálati tesztek működését és használhatóságát összességében kiválóra értékelhetjük. Ennek ellenére a

módszer gyors diagnosztikai szerepe, az így kimutatható rezisztenciatípus alacsonyabb előfordulása miatt sajnos valószínűleg már nem olyan nagyon jelentős.

Azt feltételezzük, hogy ciprofloxacín rezisztens izolátumok gyors szűrésére viszont, hogy melyek azok a törzsek, amelyek ezt a típusú rezisztenciát hordozzák, a módszer nagyon is kiválóan minősíthető.

23.7. Tapasztalatok és eredmények vancomycin rezisztens *Enterococcus faecalis* törzsekkel végzett mérésekből

A szerzett glikopeptid rezisztenciát hordozó *Enterococcus* törzsek gyorsdiagnosztikai kimutatása nagyon fontos laboratóriumi feladat volna. MALDI-TOF tömegspektrometria segítségével sikerült már olyan peakeket azonosítani vancomycin rezisztens *Enterococcus faecium* (VRE) izolátumokban, melyek megbízható és egyedi markerei ennek a típusú rezisztenciának a hordozásában [109].

A vizsgálatok elve itt gyökeresen eltér az eddig megszokott antibiotikum + baktérium reakcióelegyének marker peakek utáni vizsgálódásától. Ebben a vizsgálatban az izolátumoknak a „hagyományos értelemben vett” MALDI-TOF MS identifikációja során használt mérési metódusát használtuk és igyekeztünk ezekben a rengeteg egyéb fehérje jelét is tartalmazó spektrumokból azokat a vancomycin rezisztens *E. faecalis* törzsekre jellemző peakeket megtalálni, melyek egyedi markerei lehetnek ennek a veszélyes rezisztenciatípusnak a gyors és biztos diagnosztizálásában.

A hagyományos értelemben vett MALDI-TOF MS identifikációs vizsgálatban a 25-30. oldalakon részletezett módon végeztük el az egyszerűen és nagyon gyorsan kivitelezhető hangyasavas extrakciós módszerrel a baktérium azonosítására (is) alkalmas spektrumok felvételét. Az eredményeket a MALDI-BioTyper® flexAnalysis szoftver overlaid módjában vizsgáltuk párhuzamosan 2000 – 15000 m/z tartományban egyelőre csak manuális eszközökkel.

A kísérlet során sikerült olyan VRE *E. faecalis* specifikus marker peakeket találnunk, melyek a vizsgált non-VRE *E. faecalis* törzsek egyikében sem voltak detektálhatók. Összefoglalva eredményeinket az alábbi, potenciálisan marker peakeket találtuk meg *E. faecalis* törzseink identifikációs spektrumainak elemzése során:

- *E. faecalis* VRE-specifikus peakek: 3382, 6765, 6896, 6936, ~8565 m/z.
- *E. faecalis* VRE-specifikus peakek csak intenziásbeli fölényel: 6936, 7360 m/z.
- *E. faecalis* non-VRE specifikus peakek: 2032, 2053, 2070, 2364 m/z.
- *E. faecalis* non-VRE-specifikus peakek csak intenzitásbeli fölényel: 2385, 2401, 2746, 2829, 7059 m/z.

Vizsgálataink ezen a területen még csak kísérletes jellegűek, de az eredmények ígéretesnek tűnnek és az irodalmi eredményekkel is valamelyest hasonlóságot mutatnak, bár olyan vizsgálatról, ahol VR *E. faecalis* törzseket vizsgáltak volna ilyen módszerrel, nincsen tudomásunk. Ha kapott eredményeink közül némelyik peak a nagyobb mintaszám vizsgálata után is marker peakként szerepelhet még a VRE- vagy a nonVRE *E. faecalis* specifikus listákban, akkor elmondhatjuk, hogy szerencsések vagyunk, hogy először vizsgálhattuk ezt a problémát és esetleg előrébb segíthettük valamivel a folyamatot a probléma megoldása felé. Terveink között szerepel egy olyan szoftveres analízis kivitelezése, mely az egyes peakek jelenlétét vagy hiányát automatikusan keresi a teljes spektrumokban és találat vagy hiány esetén a megfelelő előjellel pontozza és az így összeálló score-értékkel jellemzi egy adott izolátum VRE-valószínűségét MALDI-TOF MS spektrum analízis alapján. Szintén terveink között szerepel törzseink más típusú extrakciós eljárásoknak való alávetése után újabb mérések elvégzése is.

A vancomycin rezisztencia hagyományos laboratóriumi kimutatása időigényes folyamat. MALDI-TOF MS módszerrel, ha igazolást nyer, hogy ezzel a módszerrel valóban lehetséges a VRE – non-VRE differenciálás, akkor mindez lecsökkenthető lenne néhány munkaóránnyira, ami valószínűleg nagyon nagy jelentőséggel bírna.

23.8. Általános protokoll

Az egyes vizsgálati folyamatok különbségeiről és egyezéseiről, a könnyebb áttekinthetőség miatt elkészítettünk egy olyan általános protokollokat és egyéb információkat tartalmazó táblázatot, mely a legfontosabb előkészületi, mérési, értékelési és interpretálási tudnivalókat igyekszik szemléltetni. Ezt követő táblázatként pedig az egyes módszerek hatékonyságát és egyéb tulajdonságait foglaltuk össze.

	penicillin	ampicillin	cefotaxim	ceftazidim	imipenem	ciprofloxacín	VRE
kontrolltörzsek tárolása	-70°C						
homogenizálandó kiindulási izolátum	24 órás friss baktériumtelep mákszemnyi mintája						-
szükséges validáló kontrollok	vak víz kontroll, natív antibiotikum kontroll, inkubált antibiotikum kontroll, negatív kontrolltörzs, pozitív kontrolltörzs, izolátum antibiotikum nélkül inkubált kontrollja						-
kiindulási antibiotikum	frissen készített antibiotikum oldat						-
antibiotikum oldószere	ddH ₂ O						
optimális antibiotikum végkoncentráció	1 mg/ml	1 mg/ml	0,25 mg/ml	1 mg/ml	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml	-
inhibitor végkoncentráció	klavulánsav 0,05 mg/ml APBA 0,3 mg/ml				EDTA 50 mg/ml APBA 0,3 mg/ml	-	-
optimális reakció V	20 µl						-
optimális inkubációs T	36±1°C						-
optimális inkubációs t	180'	120'	120'	180'	180	180	-
centrifugálás	13000 rpm, 3', 25°C						-
plate-re felvitt minta V	2 µl víztiszta felülúszó						24 órás telep mákszemnyi mintája
analitok száradása	~10'						
MALDI-TOF MS mátrix anyag	α-CHCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) (m/z: 189 és 379)						
mátrix oldat térfogat	2 µl						
mátrix oldat száradása	~10'						
MALDI-TOF MS mérési tartomány	100-600 m/z						2000-15000 m/z
natív antibiotikum formák [m/z]	335 357 380	350 372 388 394 (±)	396 426 456 478 500 (±)	468 547	300	332 354 370	-
módosult antibiotikum formák [m/z]	309 353 375 397	324 368 390 412	370 414 461	441 486	318	374 396 412 (±)	-
antibiotikum spontán bomlása	+++	+	+/-	+++	+	-	-
antibiotikum spontán bomlástermékei	309 353	324 368	414 (±)	441 486	318 (±)	-	-

	375 397	390 412					
pozitív eredmény	-	natív - (±), módosult ±	natív ±, módosult + (kiv. 461 m/z egyedül)	-	natív -, módosult ±	natív +, módosult ±	VRE specifikus marker peakek jelenléte
negatív eredmény	-	natív +, módosult ±	natív +, módosult ±	-	natív +, módosult ±	natív +, módosult -	VRE specifikus marker peakek hiánya
kimutatható enzimtermelés	egyszerű penicillinázok, egyéb béta- laktamázok	amino- penicillinázok, egyéb béta- laktamázok, BLPACR / BLPAR	ESBL, 3. gen. cefalosporin- béta- laktamázok	-	karbapenemázok (Class A 2f, Class B MBL), AmpC over- expresszió	AAC(6')-Ib-cr transzacetiláz	-

18. táblázat

MALDI-TOF MS MBT-ASTRA vizsgálati protokolljaink összehasonlítása

	penicillin	ampicillin	cefotaxim	ceftazidim	imipenem	ciprofloxacín	VRE
relevancia	-	BLNAR vs. BPLACR/BLPAR differenciálás	ESBL termelés kimutatása	-	karbapenemáz termelés kimutatása, negatív esetben porin alapú rezisztencia megállapítása, AmpC over- expresszió kimutatása	AAC(6')-Ib-cr szűrés ciprofloxacín rezisztens minták közül	VRE törzsek gyorsdiagnosztikai igazolása
hiányosság	erős spontán bomlás miatt értékelhetetlen	béta-laktamázok nem differenciálhatók, BLPACR BLPAR-tól nem differenciálható	AmpC- termelés, többszörös enzimtermelés, IRT ESBL	erős spontán bomlás miatt értékelhetetlen	Class A 2f karbapenemáz és AmpC túltermelő aktivitás nem differenciálható	új izolátumok ciprofloxacín rezisztencia szűrésére nem megfelelő	nagy mintaszámú optimalizálás hiánya, manuális értékelés
interpretációs idő	-	2-3 óra	2-3 óra	-	2-3 óra	1-3 óra	4-5 óra
hatékonyság	rossz	jó	kiváló	rossz	kiváló	kiváló	kísérleti fázis
általános értékelés	X	✓	✓	X	✓	✓	kísérleti fázis

19. táblázat

MALDI-TOF MS MBT-ASTRA vizsgálati protokolljaink eredményességének általános összehasonlítása

Vizsgálataink kísérleteit alapvetően sikeresnek tekinthetjük. A folyamatok során elsajátítottuk a technikai kivitelezéséhez szükséges műszeres, analitikai és értékelési módszereket. A legtöbb vizsgálat eredményeként kiváló hatásokkal interpretálhatóak különböző antibiotikum érzékenységi adatok az adott kórokozók izolátumaiból. A vizsgálatok 2-3 munkaóra alatt elvégezhetőek, így a klinikai oldal a hagyományos módszerek eredményeihez képest sokkal hamarabb kezdheti meg célzott terápiás tevékenységét azokban az esetekben, ahol már a MALDI-TOF MS MBT ASTRA eredményei önmagukban is elegendőek a biztos interpretáláshoz.

Nagyon jó hatásokkal végezhető és modern, valóban gyorsdiagnosztikai eszköznek tekinthetjük eredményeink ismeretében a MALDI-TOF alapú rezisztenciavizsgálatokat. Kiváló minőségű értékelésre adnak lehetőséget a cefotaxim, az imipenem és a ciprofloxacín antibiotikumokkal és ezek esetleges inhibitoros párhuzamos mérései. Jó hatásokra értékeltük ezek mellett az ampicillin antibiotikum méréseiben rejlő lehetőségeket. Kizártuk viszont a további felhasználás lehetőségét a penicillin és a ceftazidim esetében. Sok esetben a

MALDI-TOF érzékenységvizsgálati analízis már önmagában is elegendő információt szolgáltatott egy-egy izolátum érzékenységi viszonyairól, néhány esetben azonban továbbra is mint a hagyományos eszközök mellett párhuzamosan végzendő, de nagyon hasznos kiegészítő és sokszor valóban perdöntő vizsgálatként használhatjuk a laboratórium eszköztárában. nagyon sok esetben tapasztaltuk, hogy az eredmények értékelése után jóval több információt sikerült szereznünk a vizsgált izolátum egyes tulajdonságairól, mint amennyire a használt módszer eredetileg hivatott, a sokkal több apró részlet és eredmény egy sokkal komplexebb kép alakítását teszi lehetővé a tesztelt kórokozó mikroorganizmusok titokzatos tulajdonságairól, rezisztenciaviszonyairól.

Eredményeink alapján a vizsgálatokat más laboratóriumok is nagyon jó hatásfokkal használhatják, a munkafolyamatokat, oldatokat és felhasznált eszközök igényét tekintve igyekeztünk a lehető legegyszerűbben kivitelezni a tesztek, ez nagyban segítheti a módszer minél gyorsabb minél szélesebb körű elterjedését más laboratóriumokban is, akik ezzel hozzájárulhatnak ennek a nagyon ígéretes módszernek a további fejlesztésében.

A klinikai mikrobiológia mai főbb irányzatai olyan irányok felé haladnak, hogy a legtöbb hagyományosan használt laboratóriumi módszert gyorsabb és precízebb módszerekre igyekszik váltani. Tapasztalataink szerint a MALDI-TOF MS MBT ASTRA vizsgálat ezt sok esetben teljesíti is, de még nem olyan fejlettségűek és komplexitásúak az egyes vizsgálatok, hogy a tradicionális eljárásokat egy az egyben lecserélje. Valószínűleg sokkal inkább kiegészítő szerepe lesz egymás mellett ennek a két megközelítésnek a közeljövőben, egymást segítő, egymás eredményeit megerősítő vagy cáfoló teszteként járulnak hozzá a végleges és biztos mikrobiológiai interpretáció kialakításához. A jövő törekvései nyilvánvalóan a modern eszközök előretörését és térfoglalását fogják támogatni és valószínűleg hamarosan el is fog következni ezeknek a módszereknek az a fejlettségi foka, amikor valóban elsődleges eszközként tekinthetünk rájuk. Munkánk során e fejlődő technológia szerteágazó és nagyon sok irányba vezető lehetőségeinek lehettünk tanúi, de bizonyos korlátait is megismertük, amik azonban természetükből adódóan egyúttal új lehetőségeknek is teret mutattak. Eredményeink alapján a technológia nagyon magas minőségű és emellett gyors diagnosztikai eredmények produkálására képes, munkánk során olyan eredményeket értünk el, melyek alapján remélhetjük, hogy valóban hozzájárultunk a módszer még további fejlődéséhez.

Referenciák:

1. **Pasteur, L.** „Mémoire sur la fermentation appelée lactique”, *Comptes Rendus Chimie* (in French). 1857 45:913-916.
2. **Koch, R.** „Die Aetiologie der Tuberkulose”. *Mitt Kaiser Gesundh.* 1844 pp. 1–88.

3. **Koch, R.** „Über den augenblicklichen Stand der bakteriologischen Choleradiagnose” [About the instantaneous state of the bacteriological diagnosis of cholera]. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* (in German). 1893 14: 319–38.
4. **Fleming, A.** On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae.*, *Br J Exp Pathol.* 1929 Jun; 10(3): 226–236.
5. **Ventola, C. L.** The Antibiotic Resistance Crisis. *P&T.* 2015 Apr; 40(4): 277–283.
6. **Conly, J. M., Johnston, B. L.** Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2005 May-Jun; 16(3): 159–160.
7. **Coates, A. R. M., Halls, G., Hu, Y.** Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br J Pharmacol.* 2011 May; 163(1): 184–194.
8. **Gauer R. L.,** Early Recognition and Management of Sepsis in Adults: The First Six Hours. *Am Fam Physician.* 2013 Jul 1;88(1):44-53.

9. Nemzeti Bakteriológiai Surveillance Adatfeldolgozó Csoport. A magyarországi surveillance antibiotikum rezisztencia eredményei. Országos Epidemiológiai Központ, 2017. <http://www.oek.hu/>

10. **Dortet, L., Poirel, L., Nordmann. P.** Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int.* 2014:249856
11. **Falagas, M. A., Koletsis, P. K., Bliziotis, I. A.** The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa.* *J Med Microbiol.* 2006, 55, 1619–1629
12. **Bauer, A. W., Perry, D. M., Kirby, W. M. M.** Single disc antibiotic sensitivity testing of Staphylococci. *A M A Arch Intern Med.* 1959, 104:208–216.
13. **Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., Turck, M.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1969, 36:493-496.

14. képhivatkozás: https://en.wikipedia.org/wiki/Disk_diffusion_test

15. European Society of Clinical Microbiology and Infectology (ESCMID): European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2019 v9.0, Clinical breakpoints and dosing of antibiotics, http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

16. **Wiegand, I., Kai, H., Hancock, R. E. W.** Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*. (17 January 2008) 3: 163.

17. képhivatkozás: <http://healthlove.in/antibiotics/antibiotic-resistance-definition-causes-types-symptoms-prevention-facts/attachment/broth-and-agar-dilution-method/>

18. **Wheat, P. F.** History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemoter* July 2001, 48 (suppl_1): 1-4.

19. **Shannon, R., Hedges, A. J., Edwards, R. J.** Distribution of levels of penicillin resistance among freshly isolated strains of *N. gonorrhoeae*. Application of a novel sensitivity assay. *Br J Venereal Dis*. (1975) 51:246–250.

20. **Bolmström, A., Arvidson, S., Ericsson, M., Karisson, A.** A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms (abst 1209). *Los Angeles ICAAC*, 1988.

21. **Joyce, L. F., Downes J., Stockman, K., Andrew, J. H.** Comparison of five methods, including the PDM Epsilometer test (E test), for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J of Clin Microbiol* (1 October 1992). 30 (10): 2709–2713.

22. képhivatkozás: **University of Prince Edward Island (UPEI), Atlantic Veterinary College.** VPM 201, Bacteriology and Mycology, Bacterial Isolation and Identifiaction Procedures, Demonstrations, http://people.upei.ca/jlewis/html/1b_demo.html

23. **Long, H., Miller, S. F., Strauss, C., Zhao, C., Cheng, L., Ye, Z., Griffin, K., Te, R., Lee, H., Chen, C-C., Lynch, M.** Antibiotic treatment enhances the genome-wide mutation rate of target cells. *PNAS* May 3, 2016 113 (18) E2498-E2505

24. képhivatkozás: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/61/Antibiotic_resistance_mechanisms.jpg

25. **Crawford, K., Heatley, N. G., Boyd, P. F., Hale, C. W., Kelly, B. K., Miller, G. A., Smith, N.** Antibiotic Production by a Species of *Cephalosporium*. (1952). *J. Gen. Microbial*. 6, 47-59.

26. **Elsbach, P.** Antibiotics from within: antibacterials from human and animal sources. *Trends in Biotechnology*, 1990, 8, 26–30.

27. **Schneider, J. J., Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., Korting, H. C.** Human defensins. *J Mol Med (Berl)*. 2005 Aug;83(8):587-95.

28. **Sumi, C. D., Yang, B. W., Yeo, I. C., Hahm, Y. T.** Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol.* 2015 Feb;61(2):93-103.
29. **de Lima Procópio, R. E., da Silva, I., R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., de Araújo, J. M.** Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis.* 2012; 16(5): 466-471.
30. **Wagman, G. H.** Antibiotics from *Micromonospora*. *Ann Rev Microbiol* 1980, 34: 537-57.
31. **Cowan, M. M.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbial Rev*, Oct. 1999, p. 564–582.
32. **Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. S., Hoyer, D.** An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. *Drug Discov Today*, 2018 Feb; 21(2): 204-7.
33. **Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., Magarvey, N. A.** Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* Vol 1858, Issue 5, May 2016, 980-987
34. **Ubukata, K., Nonoguchi, R., Matsushashi, M., Konno, M.** Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J Bacteriol.* 1989 May; 171(5): 2882–2885.
35. **Deurenberg, R. H., Stobberingh, E. E.;** The molecular evolution of hospital- and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Molecular Medicine.* March 2009, 9 (2): 100-15.
36. **Hanssen, A. M., Ericson Sollid, J. U.** SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* February 2006, 46 (1): 8–20.
37. **Webber, M. A., Piddock, L. J. V.** The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, Vol 51, Issue 1, 1 January 2003, 9–11.
38. **Jana, S., Deb, J. K.** Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 70, 140–150 (2006).
39. **Nikaido, H., Takatsuka, Y.** Mechanisms of RND Multidrug Efflux Pumps. *Biochim Biophys Acta*, 2009 May; 1794(5): 769–781.
40. **Holberger, L. E., Hayes, C. S.** Ribosomal Protein S12 and Aminoglycoside Antibiotics Modulate A-site mRNA Cleavage and Transfer-Messenger RNA Activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 284, 32188–32200 (2009).

41. **Olaitan, A. O., Morand, S., Rolain, J-M.** Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*, 2014; 5: 643.
42. **Jacoby, G. A.** Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clin Inf Dis* 2005;41 S120-126 (Suppl2).
43. **Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A., Piddock, L. J. V.** Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol*, August 2014, Vol. 22, No. 8. 438-445.
44. **Rice, L. B.** Mechanisms of Resistance and Clinical Relevance of Resistance to β -Lactams, Glycopeptides, and Fluoroquinolones *Mayo Clin Proc.* 2012 Feb; 87(2): 198–208.
45. **ur Rahman, S., Tariq, A., Ijaz, A., Nazir, A. K., Han, B., Gao, J.** The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *BioMed Res Int* Vol 2018, Article ID 9519718, 14 pages
46. képhivatkozás:
Tang, S. S., Apisarnthanarak, A., Hsu, L. Y. Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev.* Vol 78, 30 November 2014 pp3-13.
<https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKewjF09rXrJ7gAhWN2KQKHWwqAYkQjRx6BAgBEAU&url=https%3A%2F%2Fwww.sciencedirect.com%2Fscience%2Farticle%2Fpii%2FS0169409X14001690&psig=AOvVaw0APdPqAX1oPngE4GntS73w&ust=1549241556474033>
47. **Ambler, R. P.** The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289:321-31.
48. **Hall, B., Barlow, M.** Revised Ambler classification of β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*, Volume 55, Issue 6, 1 June 2005, Pages 1050–1051.
49. **Bush, K., Jacoby, G. A., Medeiros, A. A.** A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and Its correlation with Molecular Structure. *Antimicrob Agents Chemother.* July 1995 39(6):1211-33.
50. **Richmond, M. H., Sykes, R. B.** The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol.* 1973;9:31-88.
51. **Mitsuhashi, S., Inoue, M.** Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *New York: Springer-Verlag*; 1981.
52. **Weldhagen, G., Poirel, L., Nordmann, P.** Ambler Class A Extended-Spectrum - Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrob Agents Chemother.* September 2003 47(8):2385-92.

53. **Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J. A., Burt, S. A.** Synergy between essential oil components and antibiotics: A review. Feb 2013 *Crit Rev Microbiol* 40(1):76-94.

54. **Drioux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., Jarlier, V.** Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* Vol 14, Suppl 1, January 2008, pp90-103.

55. képhivatkozás: <https://image.slideserve.com/359923/slide19-t.jpg>

56. **Jarlier, V., Nicolas, M. H., Fournier, G., Philippon, A.** Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988 Jul-Aug;10(4):867-78.

57. **AB-BIODISK 2007-12 (75001448-MH0383)** Etest ESBL for *In Vitro* Confirmation of ESBL. E-test Package Insert.
<http://www.illexmedical.com/files/E-test-Package-Insert/ESBL.pdf>

58. MAST D68C AmpC ESBL Detection Set.
<https://mast-group.com/uk/products/amr/antibiotic-resistance-detection-sets/d68c/>

59. **Khan, M. R. K., Thukral, S. S., Gaiind, R.** Evaluation of a modified double-disc synergy test for detection of extended spectrum β -lactamases in AMPC β -lactamase-producing *Proteus mirabilis*. *Indian J Med Microbiol.* 2008 Vol 26(1):58-61.

60. **Ingram, P. R., Inglis, T. J. J., Vanzetti, T. R., Henderson, B. A., Harnett, G. B., Murray, R. J.** Comparison of methods for AmpC β -lactamase detection in Enterobacteriaceae. *J Med Microbiol* (2011), 60, 715–721.

61. **Drawz, S. M., Bonomo, R. A.** Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Jan; 23(1): 160–201.

62. **Bonnet, R.** Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 48:1–14.

63. **Canton, R., Morosini, M. I., Martín, O., de la Maza, S., de la Pedrosa, E. G.** IRT and CMT β -lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2008 14 (Suppl. 1):53–62.

64. ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control,
<https://ecdc.europa.eu/en/home>

65. **ECDC,** Carbapenemase-producing bacteria in Europe. Interim results from the European survey on carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) project 2013.
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-carbapenemase-producing-bacteria-europe.pdf>

66. OEK, Országos Epidemiológiai Központ, <http://www.oek.hu>

- 67.** OEK, Az Országos Epidemiológiai Központ tájékoztatója a Nemzeti Surveillance Rendszer 2017. évi eredményeiről.
https://www.antsz.hu/data/cms88661/NNSR_2017.pdf
68. **Bhardwaj, M., Singh, B. R., Murugan, M. S., Dubey, P., Dubey, S.** Emergence of Carbapenemase Producing Pathogens in Animals. *Pharm Anal Acta* 2015, 6:6.
- 69.** CLSI M100-S19
https://clsi.org/media/1899/_m100_archived_methods_table.pdf
70. **Mochon, A. B., Garner, O. B., Hindler, J. A., Krogstad, P., Ward, K. W., Lewinski, M. A., Rasheed, J. K., Anderson, K. F., Limbago, B. M., Humphries, R. M.** New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM-1)-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Case Report and Laboratory Detection Strategies. *J Clin Microbiol* Apr 2011, Vol.49, No.4:1667–1670.
71. **Castanheira, M., Huband, M. D., Mendes, R. E., Flamm, R. K.** Meropenem-Vaborbactam Tested against Contemporary Gram-Negative Isolates Collected Worldwide during 2014, Including Carbapenem-Resistant, KPC-Producing, Multidrug-Resistant, and Extensively Drug-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* September 2017 Volume 61 Issue 9 e00567-17.
72. **Lomovskaya, O., Sun, D., Rubio-Aparicio, D., Nelson, K., Tsivkovski, R., Griffith, D. C., Dudley, M. N.** Vaborbactam: Spectrum of BetaLactamase Inhibition and Impact of Resistance Mechanisms on Activity in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* November 2017 Volume 61 Issue 11 e01443-17.
73. **O'Callaghan, C. H., Morris, A., Kirby, S. M., Shingler, A. H.** Novel Method for Detection of B-Lactamases by Using a Chromogenic Cephalosporin Substrate. *Antimicrob Agents Chemother* 1.4 (1972): 283-88.
74. **Parr, T. R., Jr.** Simple Screening Method for Beta-lactamase-positive and -negative Ampicillin-resistant *Haemophilus Influenzae* Isolates. *J Clin Microbiol* 20.1 (1984): 131-32.
75. **Jones, R. N., Wilson, H. W., Novick, W. J., Jr.** In vitro evaluation of pyridine-2-azop-dimethylaniline cephalosporin, a new diagnostic chromogenic reagent, and comparison with nitrocefin, cephacetrile, and other beta-lactam compounds. *J Clin Microbiol.* 1982 Apr; 15(4): 677–683.
76. **Queenan, A. M., Foleno, B., Gownley, C., Wira, E., Bush, K.** Effects of Inoculum and β -Lactamase Activity in AmpC- and Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Tested by Using NCCLS ESBL Methodology. *J Clin Microbiol.* 2004 Jan; 42(1): 269–275.
77. **Voladri R. K. R., Lakey, D. L., Hennigan, S. H., Menzies, B. E., Edwards, K. M., Kernodle, D. S.** Recombinant Expression and Characterization of the Major β -Lactamase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998 Jun; 42(6): 1375–1381.
- 78.** **Nordmann, P., Poirel, L., Dortet, L.** Rapid Detection of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* (www.cdc.gov/eid) September 2012 Vol. 18, No.9, 1503-1507.

79. Nordmann, P., Dortet, L., Poirel, L. Rapid Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. September 2012 Vol. 50, No.9, 3016–3022.
80. Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H. G. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 1971 56 (2): 341–361.
81. Mullis, K. B., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology*, 1986, 51:263–273.
82. Mullis, K. B. The Unusal Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* April 1990 56-65.
<https://pdfs.semanticscholar.org/14bf/9cc89c9885d7ad46a384d0e5661ac07c752f.pdf>
83. Chavada, R., Maley, M. Evaluation of a Commercial Multiplex PCR for Rapid Detection of Multi Drug Resistant Gram Negative Infections. *Open Microbiol J*. 2015; 9: 125–135.
84. Swayne, R. L., Ludlam, H. A., Shet, V. G., Woodford, N., Curran, M. D. Real-time TaqMan PCR for rapid detection of genes encoding five types of non-metallo- (class A and D) carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Jul;38(1):35-8.
85. Dumas, J-L., van Delden, C., Perron, K., Köhler, T. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 254, Issue 2, 1 January 2006, Pages 217–225.
86. Naas, T., Cuzon, G., Truong, H., Bernabeu, S., Nordmann, P. Evaluation of a DNA Microarray, the Check-Points ESBL/KPC Array, for Rapid Detection of TEM, SHV, and CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamases and KPC Carbapenemases *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug; 54(8): 3086–3092.
87. Lányi, B. Járványügyi és klinikai bakteriológia, Módszertani útmutató. 1980.
88. Czirók, É. (szerk.) Klinikai és járványügyi bakteriológia. 1989.
89. EUCAST, Expert rules and intrinsic resistance. v3.1 (Sept 27, 2016)
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/Expert_rules_intrinsic_exceptional_V3.1.pdf
90. CLSI, M100S: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.
<https://microbeonline.com/lists-bacterial-pathogens-intrinsic-antibiotic-resistance/>
91. Carlon, J. Simplified Gas Chromatographic Procedure for Identification of Bacterial Metabolic Products. *Appl Microbiol*. Vol 25 No 2 (1973), pp. 287–289.
92. Cundy, K. V., Willard, K. E., Valeri, L. J., Shanholtzer, C. J., Singh, J., Peterson, L. R. Comparison of Traditional Gas Chromatography (GC), Headspace GC, and the Microbial Identification Library GC System for the Identification of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*. Feb. 1991, Vol. 29, No. 2:260-263.

93. **Anhalt, J. P., Fenselau, C.** Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem* Vol 47 (1975), pp. 219–225.
94. **Heller, D. N., Cotter, R. J., Fenselau C., Uy, O. M.** Profiling of bacteria by fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Chem.* Vol 59 (1988), pp. 2806–2809.
95. **Karas, M., Hillenkamp, F.** Laser desorption ionisation of proteins with molecular masses exceeding 10 000 Daltons. *Anal Chem.* Vol 60 (1988), pp. 2301–03.
96. **Tanaka, K., et al.** Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* Vol 2 No 8 (1988), pp. 151–53.
97. **Patel, R.** MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clin Chem.* 2015 Vol 61, Issue 1:100-111.
98. képhivatkozás: **Reed, L.** New equipment speeds response to animal diseases, *Nebraska Today*, Feb 20, 2017.
<https://news.unl.edu/newsrooms/today/article/new-equipment-speeds-response-to-animal-diseases/>
99. képhivatkozás: **Sundqvist, M.** MALDI-TOF in Clinical Microbiology, *presentation*:
http://s3-eu-west-1.amazonaws.com/hl-intranet/files/fb0f30caccbba0771f2f3e87af8eb7cd6c23519a/maldiclinmicro_121102092523.pdf
- 100.** képhivatkozás: <http://www.ms-textbook.com/2nd/home/instructors.html>
101. **Mendis, L.** How to Choose Your MALDI (Soul) Matrix.
<https://bitesizebio.com/27800/how-to-choose-your-maldi-soul-matrix/>
102. **Calvano, C. D., Monopoli, A., Cataldi, T. R. I., Palmisano, F.** MALDI matrices for low molecular weight compounds: an endless story? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(17), 4015–4038.
103. **Bruker Daltonik GmbH**, *Microflex LT MALDI-TOF MS Instruction Manual, 2011*
104. **Bruker Daltonik GmbH**, *MALDI Biotyper 3.0 User Manual Revision 2, 2011*
105. **Lagacé-Wiens, P. R. S., Adam, H. J., Karlowsky, J. A., Nichol, K. A., Pang, P. F., Guenther, J., Webb, A. A., Miller, C., Alfa, M. J.** Identification of Blood Culture Isolates Directly from Positive Blood Cultures by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry and a Commercial Extraction System: Analysis of Performance, Cost, and Turnaround Time. *J Clin Microbiol.* Vol 50 No 10 (2012), pp. 3324-3328.
106. **La Scola, B., Raoult, D.** Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2009;4:e8041.

107. **Ferreira, L., Sanchez-Juanes, F., Gonzalez-Avila, M., Cembrero-Fucinos, D., Herrero-Hernandez, A., Gonzalez-Buitrago, J. M., et al.** Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010;48:2110-5.
108. **Mahé, P., Arzac, M., Chatellier, S., Monnin, M., Perrot, N., Mailler, S., Girard, V., Ramjeet, M., Surre, J., Lacroix, B., van Belkum, A., Veyrieras, J-B.** Automatic identification of mixed bacterial species fingerprints in a MALDI-TOF mass-spectrum. *Bioinformatics*. 2014 May 1;30(9):1280-6.
109. **Griffin, P. M., Price, G. R., Schooneveldt, J. M., Schlebusch, S., Tilse, M. H., Urbanski, T., Hamilton, B., Venter, D.** Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry To Identify Vancomycin-Resistant Enterococci and Investigate the Epidemiology of an Outbreak. *J Clin Microbiol*. 2012 Sep;50(9):2918-31.
110. **Wang, Y. R., Chen, Q., Cui, S. H., Li, F. Q.** Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Specimens by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Biomed Environ Sci*. Vol 26 No 6. (2013), pp. 430-436.
111. **Nagy, E., Becker, S., Sóki, J., Urbán, E., Kostrzewa, M.** Differentiation of division I (cfiA-negative) and division II (cfiA-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol*. Vol 16 No 60, (2011), pp. 1584-1590.
112. **Marinache, C., Alanio, A., Palous, M., Kwasek, S., Fekkar, A., Brossas, J-Y., Brun, S., Snounou, G., Hennequin, C., Sanglard, D., Datry, A., Golmard, J-L., Maizer, D.** MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: The example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics*. Vol 9, (2009), pp. 4627-4631.
113. **Jung, J. S., Eberl, T., Sparbier, K., Lange, C., Kostrzewa, M., Schubert, S., Wieser, A.** Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Vol 33 (2013), pp. 949-955.
- 114.** képhivatkozás: <http://www.wikiwand.com/en/Beta-lactamase>
115. **Hrabák, J., Walková, R., Studentová, V., Chudácková, E., Bergerová, T.** Carbapenemase Activity Detection by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2011 Sep;49(9):3222-7.
116. **Sparbier, K., Schubert, S., Weller, U., Boogen, C., Kostrzewa, M.** Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol*. Vol. 50 (2014), pp. 927-937.
117. **Sparbier, K., Schubert, S., Kostrzewa, M.** MBT-ASTRA: A suitable tool for fast antibiotic susceptibility testing? *Methods*. 2016 Jul 15;104:48-54.
118. **Zboromyrska, Y., Vila, J.** Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the detection of extended spectrum β -lactamases and carbapenemases among Gram-negative bacilli. *Community Acquir Infect* 2015 Vol. 2(3):65-70.

119. **Camara, J. E., Hays, F. A.** Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2007 Nov;389(5):1633-8.
120. **Sparbier, K., Schubert, S., Weller, U., Boogen, C., Kostrzewa, M.** Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay for Rapid Detection of Resistance against β -Lactam Antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2012 Mar;50(3):927-37.
121. **Li, C., Ding, S., Huang, Y., Wang, Z., Shen, J., Ling, H., Xu, Y.** Detection of AmpC β -lactamase-producing Gram-negative bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Hospital Infection J Hosp Infect.* 2018 Jun;99(2):200-207.
122. **Kempf, M., Bakour, S., Flaudrops, C., Berrazeg, M., Brunel, J. M., Drissi, M., Mesli, E., Touati, A., Rolain, J. M.** Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One.* 2012;7(2):e31676.
123. **Studentova, V., Papagiannitsis, C. C., Izdebski, R., Pfeifer, Y., Chudackova, E., Bergerova, T., Gniadkowski, M., Hrabak, J.** Detection of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in diagnostic laboratories can be enhanced by addition of bicarbonates to cultivation media or reaction buffers. *Folia Microbiol (Praha).* 2015 Mar;60(2):119-29.
124. **Lange, C., Schubert, S., Jung, J., Kostrzewa, M., Sparbier, K.** Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol.* 2014 Dec;52(12):4155-62.
125. **Oviaño, M., Rodríguez-Martínez, J. M., Pascual, Á., Bou, G.** Rapid detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant AAC(6')-Ib-cr in *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF MS analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Apr 1;72(4):1074-1080.
126. **Oviaño, M., Gómara, M., Barba, M. J., Sparbier, K., Pascual, Á., Bou, G.** Quantitative and automated MALDI-TOF MS-based detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant AAC(6')-Ib-cr in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Oct 1;72(10):2952-2954.
127. **Lasserre, C., De Saint Martin, L., Cuzon, G., Bogaerts, P., Lamar, E., Glupczynski, Y., Naas, T., Tandé, D.** Efficient Detection of Carbapenemase Activity in *Enterobacteriaceae* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Less Than 30 Minutes. *J Clin Microbiol.* 2015 Jul;53(7):2163-71.
128. **Njoro, S. M., Kiiru, J. N., Kikvi, G. M.** Broad spectrum β -lactam resistance in faecal *Escherichia coli* isolated from severely malnourished and nourished children attending Mbagathi district hospital, Nairobi: A case-control study. January 2014 *Chronicles of Young Scientists* 5(1): 39-43.
129. képhivatkozás:
<https://image.slidesharecdn.com/esbl-140227230239-phpapp01/95/esbl-61-638.jpg?cb=1393542272>

- 130.** képhivatkozás: <http://editimage.club/newakc37017.html>
- 131.** Amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant β -lactamases (<http://www.lahey.org/studies/webt.asp>). Accessed 20 July 2007
132. **Bourget, P., Amin, A., Dupont, C., Abely, M., Desmazes-Dufeu, N., Dubus, J. C., Jouani, B.-L., Merlette, C., Nové-Josserand, R., Pages, J., Panzo, R., Vidal, F., Voge, F., Hubert, D.** How To Minimize Toxic Exposure to Pyridine during Continuous Infusion of Ceftazidime in Patients with Cystic Fibrosis? *Antimicrob Chemother.* 2014 May;58(5):2849-2855.
133. **Tristram, S., Jacobs, M. R., Appelbaum, P. C.** Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Apr;20(2):368-89.
134. **Pitout, M., MacDonald, K., Musgrave, H., Lindique, C., Forward, K., Hiltz, M., Davidson, R.** Characterization of extended spectrum β -lactamase (ESBL) activity in *Haemophilus influenzae*, abstr. C2-645, p. 96. Abstr. *42nd Intersci. Conf. Antimicrob. Chemother.*, San Diego, CA, 2002. American Society for Microbiology, Washington, DC.
135. **Meini, M.-R., Llarrull, L. I., Vila, A. J.** Overcoming differences: the catalytic mechanism of metallo- β -lactamases. *FEBS Lett.* 2015 Nov 14; 589(22): 3419–3432.
136. **de Castillo, M. C., Sesma, F., de Nader, O. M., de Ruiz Holgado, A. P.** Properties of beta-lactamase from *Neisseria gonorrhoeae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998 Mar-Apr;93(2):237-41.
137. **Tóth, Á., és mtsai.** *Mikrobiológiai körlevél.* OEK, 2014. XIV. 1.
138. **Potron, A., Poirel, L., Nordmann, P.** Emerging broadspectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 2015 45, 568–585.
139. **Pagès, J. M., James, C. E., Winterhalter, M.** The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Dec;6(12):893-903.
140. **Cabot, G., Ocampo-Sosa, A. A., Tubau, F., Macia, M. D., Rodríguez, C., Moya, B., Zamorano, L., Suárez, C., Peña, C., Martínez-Martínez, L., Oliver, A. and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI).** Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 May;55(5):1906-11.
141. **van Boxel, R., Wattel, A. A., Arenas, J., Goessens, W. H., Tommassen, J.** Acquisition of Carbapenem Resistance by Plasmid-Encoded AmpC Expressing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016 Dec 27;61(1).
142. **Oh, H., Edlund, C.** Mechanism of quinolone resistance in anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2003 Jun;9(6):512-7.
143. **Oliphant, C. M., Green, G. M.** Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician.* 2002 Feb 1;65(3):455-64.

144. **Yasufuku, T., Shigemura, K., Shirakawa, T., Matsumoto, M., Nakano, Y., Tanaka, K., Arakawa, S., Kawabata, M., Fujisawa, M.** Mechanisms of and risk factors for fluoroquinolone resistance in clinical *Enterococcus faecalis* isolates from patients with urinary tract infections. *J Clin Microbiol.* 2011 Nov;49(11):3912-6.
145. **Martínez-Martínez, L., Joyanes, P., Pascual, A., Terrero, E., Perea, E. J.** Activity of eight fluoroquinolones against enterococci. *Clin Microbiol Infect.* 1997 Aug;3(4):497-499.
146. **Hooper, D. C., Jacoby, G. A.** Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 2015 Sep;1354:12-31
147. **Wang, M., Tran, J. H., Jacoby, G. A., Zhang, Y., Wang, F., Hooper, D. C.** Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother.* 47, 2242–2248 (2003)
148. **Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G. A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C. H., Bush, K., Hooper, D. C.** Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* 2006 Jan;12(1):83-8.
149. **Al-Omar, M. A.** Ciprofloxacin: drug metabolism and pharmacokinetic profile. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol.* 2005;31:209-14.
150. **Parshikov, I. A., Freeman, J. P., Lay, J. O. Jr, Beger, R. D., Williams, A. J., Sutherland, J. B.** Regioselective transformation of ciprofloxacin to N-acetylciprofloxacin by the fungus *Mucor ramannianus*. *FEMS Microbiol Lett.* 1999 Aug 1;177(1):131-5.
151. **Spinali, S., van Belkum, A., Goering, R. V., Girard, V., Welker, M., van Nuenen, M., Pincus, D. H., Arsac, M., Durand, G.** Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: do we need guidance for data interpretation? *J Clin Microbiol.* 2015 Mar;53(3):760-5.
152. **Szabó, D., Kocsis, B., Rókusz, L., Szentandrassy, J., Katona, K., Kristóf, K., Nagy, K.** First detection of plasmid-mediated, quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6′)-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in Budapest, Hungary. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Sep;62(3):630-2.

Rövidítések:

AB: antibiotikum

APBA: 3-aminophenyl boronic acid, AmpC-enzim inhibitor

ATCC: American Type Culture Collection, referenciatörzsek hitelesítése, forgalmazása

AUC: area under curve

a.u.: arbitrary unit

BLNAR: béta-laktamáz negatív ampicillin rezisztens *Haemophilus* sp.

BLPACR: béta-laktamáz pozitív amoxicillin/klavulánsav rezisztens *Haemophilus* sp.

BLPAR: béta-laktamáz pozitív ampicillin rezisztens *Haemophilus* sp.

Carba-NP: Carbapenemase Nordmann-Poirel teszt, gyorsdiagnosztikus karbapenemáz teszt

cDNS: complemeter DNS, az mRNS-ről reverz transzkripcióval átírt DNS

CF: cisztikus fibrózis

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute, az USA antibiotikum interpretálási szabályaiért és fejlesztéséért létrehozott, aktív, szakmai, non-profit szervezet

CPE: carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

CTX: cefotaxim

Da: Dalton, az atomi tömegegység mértékegysége (¹²C izotóp tizenketted része)

DNS: dezoxiribonukleinsav

EDTA: etilén-diamin-tetraacetát, fontos metallo-béta-laktamáz inhibitor

ESBL: extended spectrum beta-lactamase enzyme

ESBL-NDP: ESBL Nordmann-Dortet-Poirel teszt, gyorsdiagnosztikus ESBL teszt

EtOH: etanol

EUCAST: European Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing, az európai országok összehangolt antibiotikum interpretálási szabályaiért, közös használatáért, közös fejlesztéséért létrehozott, aktív, szakmai, non-profit szervezet

É: érzékeny

FDA: Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services

G1: laboratóriumunk törzsgyűjteményében lévő izolátumok sorszáma előtt használt jelölés

H1N1: az influenza A vírus egyik altípusa, hemagglutinin 1 és neuraminidáz 1 antigénszerkezettel

HNCMB: Hungarian National Collection of Medical Bacteria, magyar törzsgyűjtemény

IR: inhibitor rezisztens (béta-laktamáz típusú enzim)

IRT: inhibitor rezisztens, TEM típusú ESBL enzim

Klav.s: klavulánsav

M: mérsékelten érzékeny vagy csökkent érzékenység

MALDI-TOF MS: matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

MBT-ASTRA: MALDI BioTyper®-Antibiotic Susceptibility Testing Rapid Assay

McF: McFarland, szuszpenziók turbiditásának mértékegysége

MDR: multi-drug resistant

MIC: minimal inhibition concentration

MLST: multilocus sequence typing, több háztartási gén párhuzamosan történő szekvenciaanalízise alapján végzett tipizálási módszer

mRNS: messenger RNS, róluk történik a fehérjék translációja; reverz transzkripcióban pedig róluk írható át cDNS

MRSA: methicillin resistant *Staphyococcus aureus*

MSBL: mass spectrometric beta-lactamase assay

MSSA: methicillin sensitive *Staphyococcus aureus*

NDM: New Delhi metallo-beta-lactamase

PCR: polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció, nukleinsav amplifikációs eljárás

R: rezisztens

RND: resistance-nodulation-division transzporter rendszer, nagy hatékonyságú efflux-pumpa rendszer

RNS: ribonukleinsav

SCCmec: staphylococcal chromosomal cassette mec, mobilis genetikai elem methicillin rezisztens *Staphylococcus*-okban

SDS: sodium dodecyl sulphate

spa: *Staphylococcus aureus* protein A gén, fontos szekvenca tipizálási folyamatokban

VRE: vancomycin rezisztens *Enterococcus*

wt: wild type, vad típus, általában negatív kontrollként használt törzs

Köszönetnyilvánítás

Egy felhasznált törzs a Szent László Kórház Mikrobiológiai Laboratóriumának ajándéka volt (Dr. Nikolova Radka, Dr. Ujhelyi Eszter)

2021.03.31.

1. Függelék

A vizsgálatok során felhasznált baktériumtörzsek listája

-70°C	labor sorszám	egyéb sorszám	egyéb sorszám	név	törzs izolálása	rezisztencia
2	2228/2017	242/E		<i>Enterobacter cloacae</i>	vizelet	imipenem M
4	3024/2015			<i>Escherichia coli</i>	vizelet	ESBL
5	2240/2017			<i>Escherichia coli</i>	vizelet	imipenem R
6	-	QC 2017/32		<i>Enterococcus faecalis</i>	-	VRE
7	992/2017	93/KE		<i>Escherichia coli</i>	vizelet	ESBL, ciprofloxacin R
15	3391/2017			<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	urethra	ampicillin R
20	4119/2017			<i>Enterobacter cloacae</i>	hüvely	ESBL, ciprofloxacin R
28	5150/2017			<i>Escherichia coli</i>	vizelet	ESBL, ciprofloxacin R
32	5216/2017			<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	urethra	BLPAR, ciprofloxacin R
36	42/2018			<i>Escherichia coli</i>	vizelet	ESBL, ciprofloxacin R
38	361/2018			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	vizelet	ESBL, ciprofloxacin R
44	509/2018			<i>Pseudomonas monteilii</i>	CF köpet	ESBL, ciprofloxacin R
45	70/2018			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	paronychia	ESBL
46	702/2018			<i>Escherichia coli</i>	vizelet	ESBL, ciprofloxacin R
49	-	ATCC 25922	HNCMB 35035	<i>Escherichia coli</i>	?	-
53	-	ATCC 27853	HNCMB 170554	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	HC	indukálható AmpC
54	1171/2018			<i>Citrobacter koseri</i>	vizelet	MDR
56	1267/2018			<i>Morganella morganii</i>	hüvely	MDR
57	1350/2018			<i>Escherichia coli</i>	hüvely	ESBL, ciprofloxacin R
59	-	QC 2018/3/32		<i>Chryseobacterium gleum</i>	-	MDR
60	1372/2018			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	vizelet	imipenem R

62	1473/2018			<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	ejakulátum	BLNAR
71	1603/2018			<i>Escherichia coli</i>	hüvely	ESBL, ciprofloxacin R
76	-	ATCC 9334	HNMCB 94534	<i>Haemophilus influenzae</i>	liquor	-
79	2062/2018			<i>Escherichia coli</i>	ejakulátum	ESBL, nalidixsav R
84	-	16616/2018 LK		<i>Escherichia coli</i>	vizelet	karbapenemáz + (NDM?)
85	2944/2018			<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	urethra	BLPAR
86	2978/2018			<i>Enterobacter asburiae</i>	ejakulátum	AmpC
89	3278/2018	A/872/FK		<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	urethra	BLPAR
96	3506/2018			<i>Escherichia coli</i>	vizelet	ESBL
101	3863/2018			<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	hüvely	BLPACR, ciprofloxacin R
106	4032/2018			<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	urethra	BLPAR
109	4256/2018			<i>Escherichia coli</i>	vizelet	ciprofloxacin R
110	-	QC 2018/92		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	ESBL, kinolon É
118	4565/2018			<i>Escherichia coli</i>	glans	ampicillin R
125	6195/2018			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	vizelet	ESBL
-	6231/2018			<i>Enterococcus faecalis</i>	vizelet	norfloxacin R
126	6232/2018			<i>Escherichia coli</i>	vizelet	ampicillin R, ciprofl. R
	3424/2015		amp 02	<i>Escherichia coli</i>		ampicillin É
	3111/2015		amp 03	<i>Escherichia coli</i>		ampicillin R
	3246/2015	6171/FK	amp 05	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		MDR
	3255/2015		amp 06	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		BLPACR
	3238/2015		amp 07	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		BLNAR
	3154/2015		amp 08	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		BLPACR
	3064/2015		amp 09	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		BLPACR (!?) → BLNAR
	3270/2015	6175/FK	amp 11	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		MDR, nem BLPACR
	246/2015		amp 12	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		ampicillin É
	3256/2015		amp 13	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		BLNAR
	2828/2015		amp 14	<i>Escherichia coli</i>		ampicillin R
	-	QC 2015/51/II	amp 15	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	ESBL
	3246/2015	6171/FK	amp 16	<i>Escherichia coli</i>		ampicillin R
	3235/2015		amp 17	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		BLPACR
	3300/2015		amp 18	<i>Klebsiella oxytoca</i>		ampicillin intrinsic R
	3265/2015	6185/FK	amp 19	<i>Citrobacter braakii</i>		ampicillin R
	3412/2015		amp 20	<i>Escherichia coli</i>		MDR
		T/505/E	amp 21	<i>Escherichia coli</i>		ampicillin É
	4013/2015		amp 24	<i>Escherichia coli</i>		ESBL

2. Függelék

A vizsgálatok során felhasznált eszközök és anyagok listája

ESZKÖZÖK		
-70°C-os mélyfagyasztó	Thermo Scientific, Forma 902 -86C ULT Freezer	törzsgyűjtemény tárolása
-20°C-os fagyasztó	Zanussi Lehel	natív antibiotikumok tárolása
+4°C-os hűtőszekrény	Indesit, SI61WUK.1 Fridge - White - A+	natív antibiotikumok tárolása
analitikai mérleg	Radwag PS 210/C/2	antibiotikumok oldatainak elkészítése
pipetták	CAPP, Ecopipette, C10-1, C200-1, C1000-1 Thermo Scientific, Finnpipette, 100-1000	antibiotikumok oldatainak elkészítése, reakcióelegyek összállítása, MALDI-TOF plate-en való munkák
mikrobiológiai fém oltókacsok	Biolab	törzsek kioltása
+36±1°C-os termosztát	Forma Scientific, SC 3194 waterjacket incubator	törzsek tenyésztése, reakciók inkubálása
+25°C-os inkubátor	GCA Precision Scientific, Gravity Convection Incubator, Model 2 31400	reakciók inkubálása
változtatható hőmérsékletű száraz hőblokkok	Biosan, TDB-120 Biosan, CH-100	reakciók inkubálása
vortex	Janke&Kunkel IKA-WERK, Vibrofix vfl	antibiotikumok oldatainak elkészítése
centrifugák	Biosan, Microspin 12 Centurion Scientific K3 Series, model K2015R	reakcióelegyekből baktériumsejtek lecentrifugálása
steril lamináris box	Nuair AireGard NU-126-400E, series 4	baktérium törzsek kioltása, reakcióelegyek összemérése, baktérium szuszpenziók elkészítése, MALDI-TOF plate-en való munkafolyamatok
MALDI-TOF tömegspektrométer	Bruker Daltonics	mérések
MALDI-BioTyper® szoftvert kezelő CPU	...	mérések értékelése
MALDI-BioTyper® szoftver	Bruker Daltonics	mérések értékelése
MALDI flexAnalysis szoftver	Bruker Daltonics	mérések értékelése

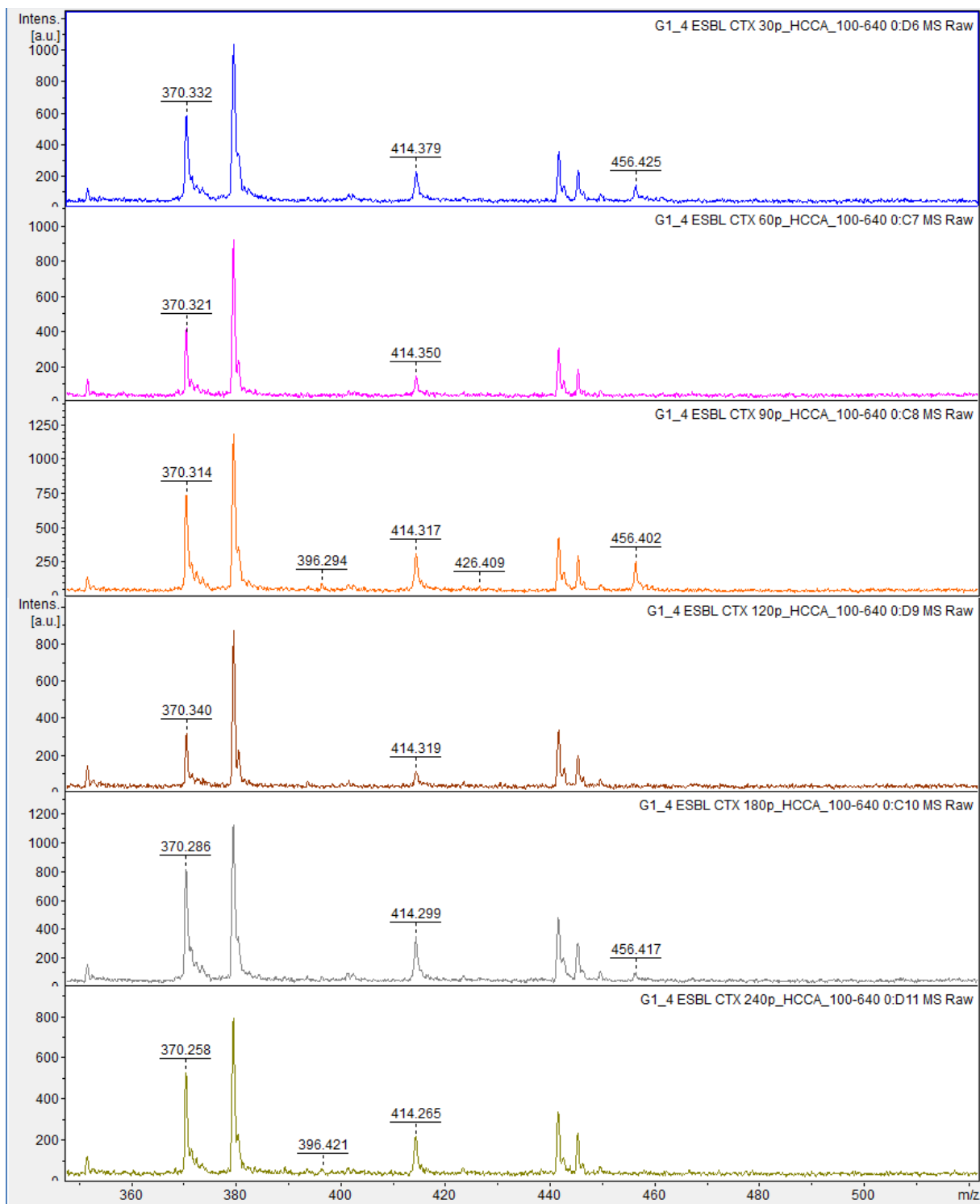
mikrobiológiai laboratórium	MikroMikoMed Kft	törzsek tenyésztése, kísérletek kivitelezése, veszélyes hulladék kezelése
-----------------------------	------------------	---

ÁLTALÁNOS ANYAGOK		
CryoBank	Biolab, Mikrobank Mixed PL.170/M	törzsek tárolása -70°C-on
táptalajok (véres, csokoládé, M-H)	Bak-Teszt	törzsek kioltása mérések előtt 24 órával
Eppendorf-csövek (gömbölyű aljú)	CAPP, Expell Plus, 2 ml, 510200C	antibiotikum oldatok, reakcióelegyek összeállítása
Eppendorf-cső tartók	Biolab	antibiotikum oldatok, reakcióelegyek összeállítása
műanyag fogpiszkálók	Tichjian™ Toothpicks	reakcióelegyek összeállítása
pipettahegyek (0,5-10, 20-200, 100-1000 µl)	CAPP, Expell Plus, 5030060C, 5030090C Sorensen, One-Touch barrier tips, 10380	antibiotikum oldatok, reakcióelegyek összeállítása, mátrix bemérések
laboratóriumi vizsgáló kesztyűk	MAXTER, finger textures powder-free nitril gloves	minden kísérletes tevékenység
desztillált víz (RNáz mentes, PCR tisztaságú)		antibiotikum oldatok, reakcióelegyek összeállítása
antibiotikum korongok	BIO-RAD	hagyományos antibiogramok és ellenőrző vizsgálatok elvégzése

ANTIBIOTIKUMOK		
penicillin sodium salt >=98% N	Sigma-Aldrich	13752-5G-F (9.750 Ft+27%áfa) árajánlat: 8203730186 (2015.07.14)
ampicillin	Sigma-Aldrich	59349-100MG (12.690 Ft+27%áfa) árajánlat: 8204117444 (2016.04.14)
cefotaxime sodium	Sigma-Aldrich	C7912-1G (97.650 Ft+27%áfa) árajánlat: 8204996379 (2018.07.04.)
ceftazidime	Sigma-Aldrich	A6987-1G (55.900 Ft+27%áfa) árajánlat: 8205179940 (2019.01.03.)
imipenem	Sigma-Aldrich	PHR1796-200MG (53.400 Ft+27%áfa) árajánlat: 8205171778 (2018.12.13.)
meropenem trihydrate	Sigma-Aldrich	M2574-10MG (22.800 Ft+27%áfa) árajánlat: 8205171778 (2018.12.13.)
ciprofloxacin hydrochloride monohydrate	Sigma-Aldrich	PHR1044-1G (18.400 Ft+27%áfa) árajánlat: 8205171778 (2018.12.13.)
klavulánsav (potassium clavulanate)	Sigma-Aldrich, VETRANAL	33454-100MG (52.290 Ft+27%áfa) árajánlat: 8204996379 (2018.07.04.)
APBA (3-amynophenyl boronic acid)	Sigma-Aldrich	900988-1G (18.112,5 Ft+27%áfa) árajánlat: 8205032028 (2018.08.08.)

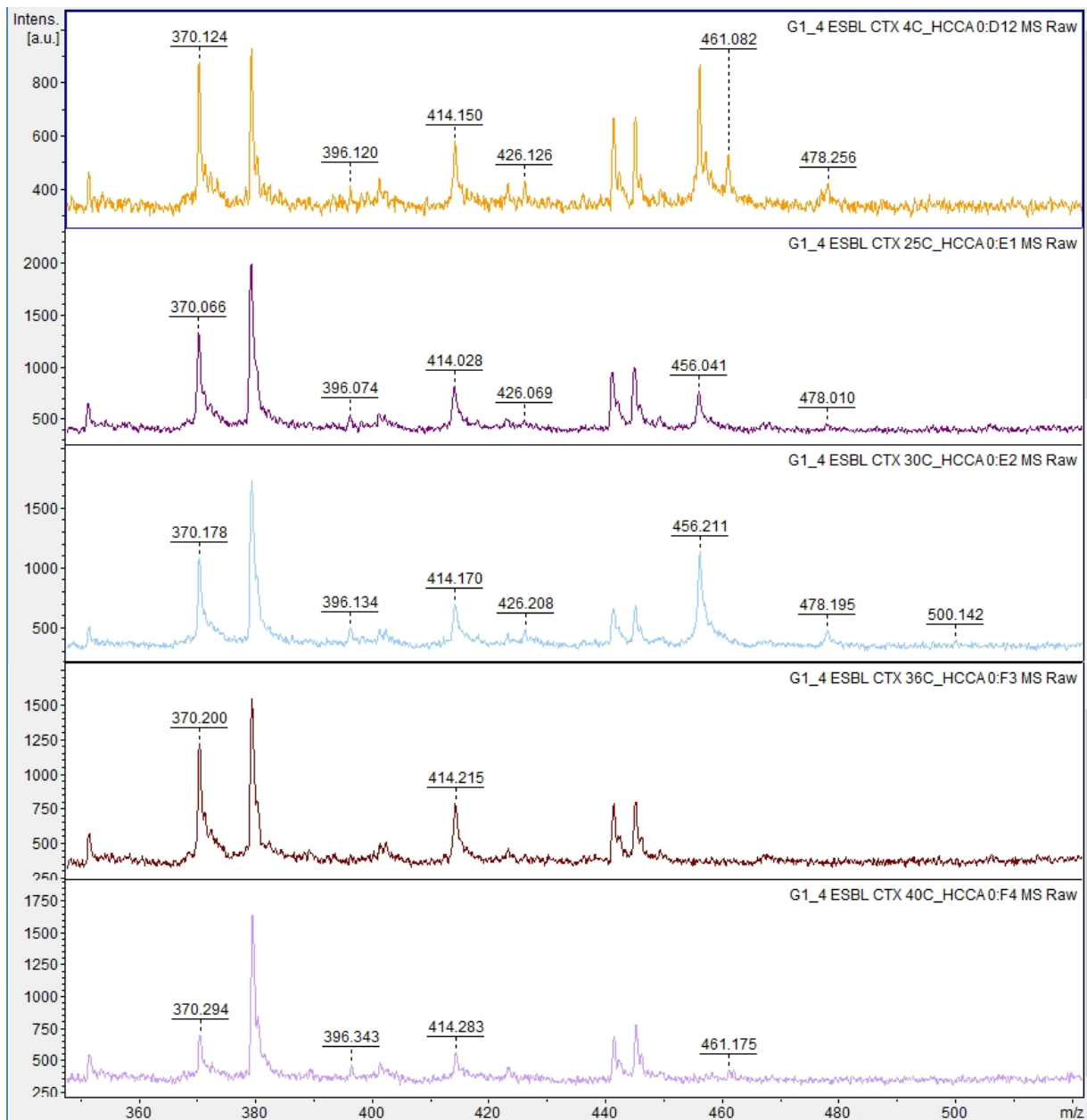
3. Függelék

Időfüggés vizsgálata G1/4 *E. coli* és cefotaxim optimalizáló vizsgálatában (53. oldal, 37. ábra).



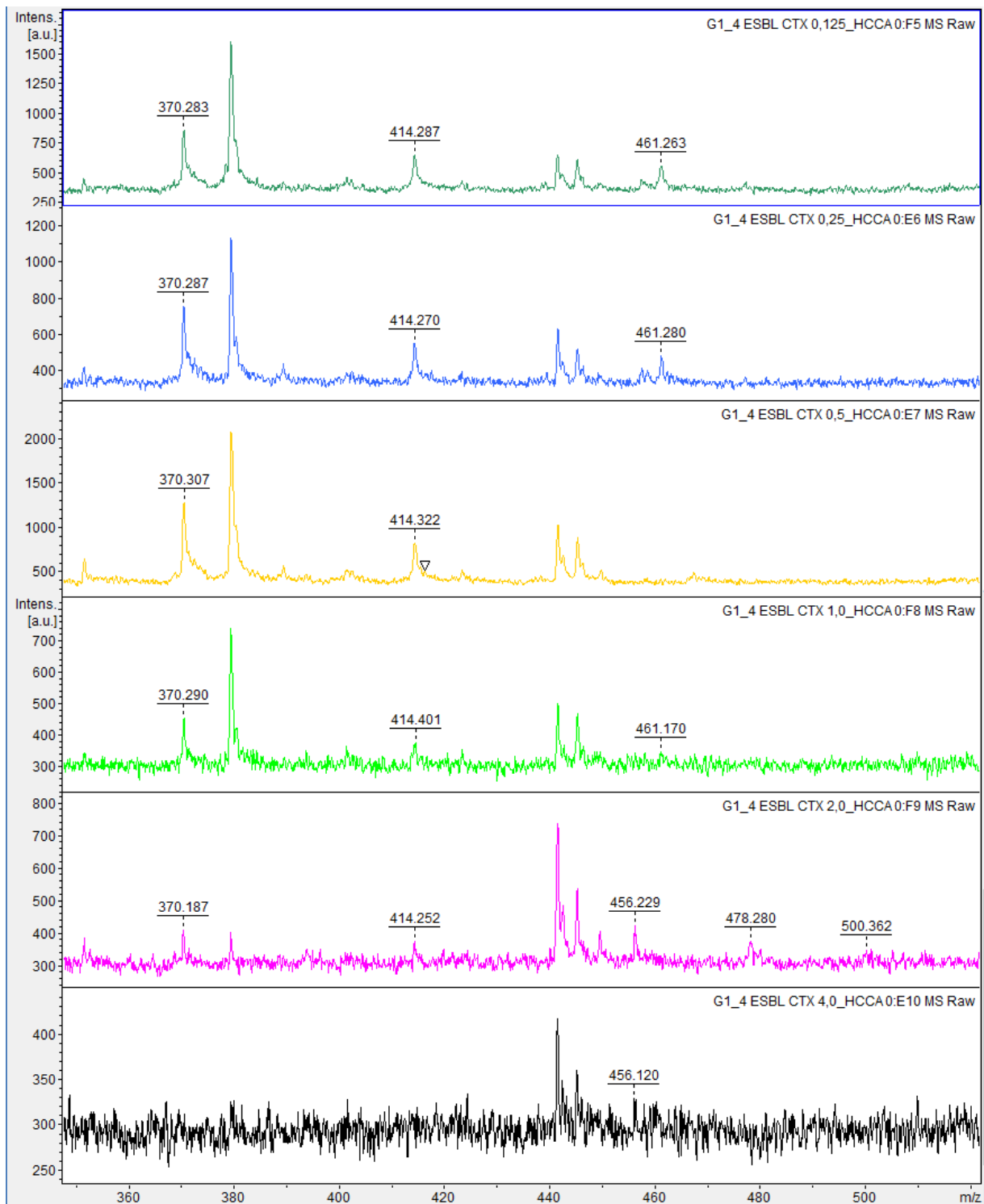
4. Függelék

Hőmérsékleti függés G1/4 *E. coli* és cefotaxim optimalizáló vizsgálatában (54. oldal, 38. ábra).



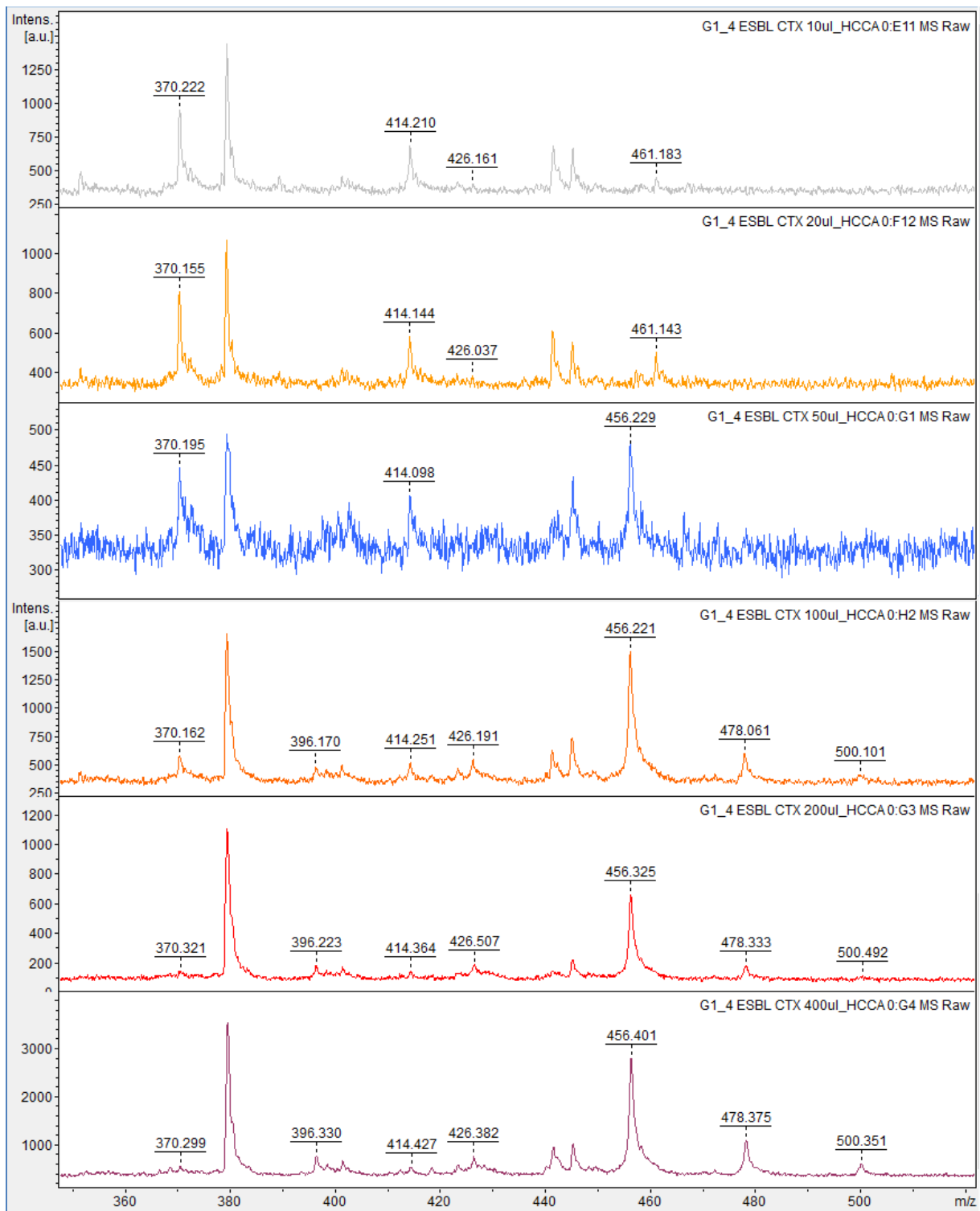
5. Függelék

G1/4 *E. coli* és változó cefotaxim koncentrációk optimalizáló vizsgálatban (55. oldal, 39. ábra).



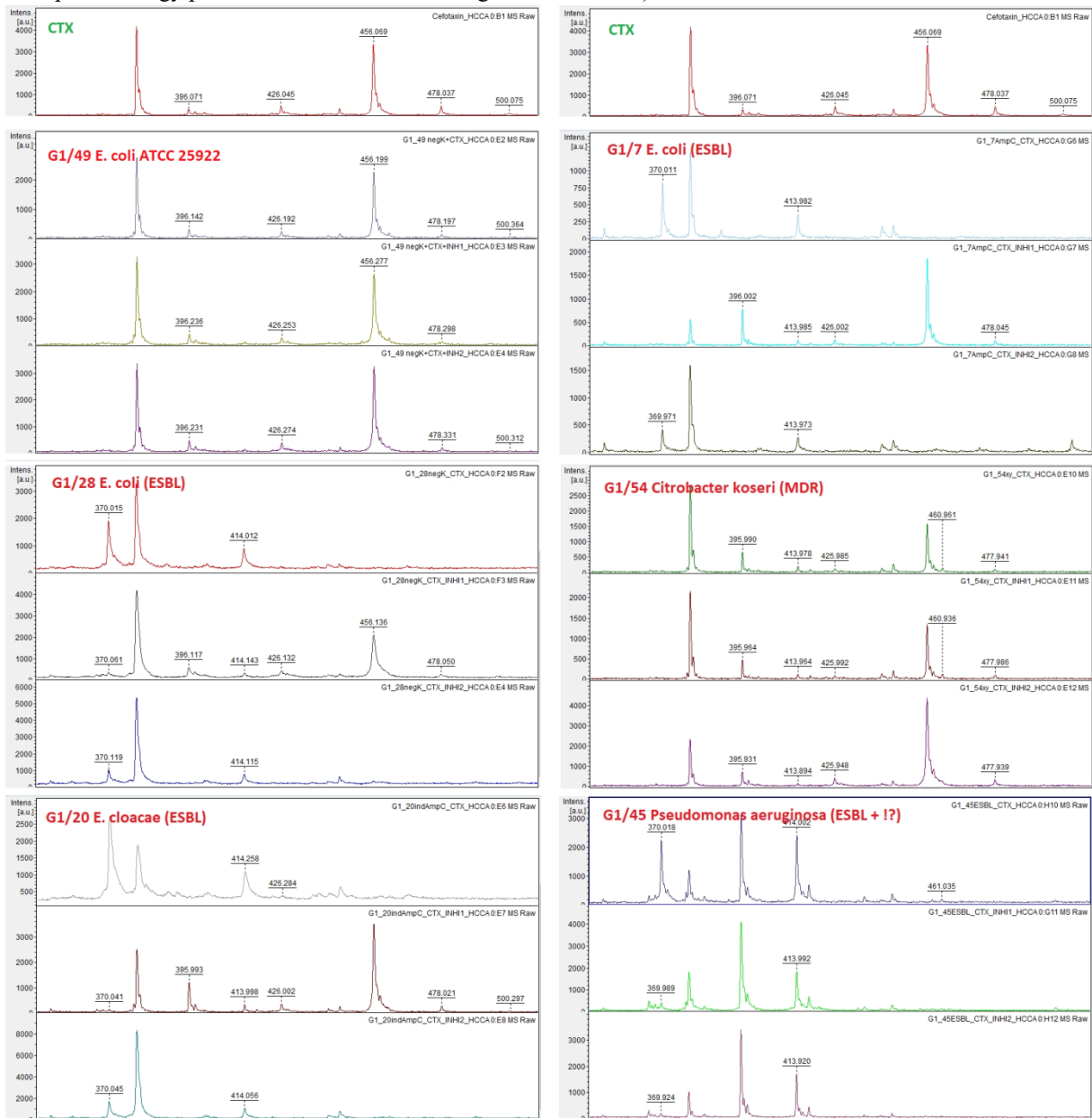
6. Függelék

G1/4 *E. coli* változó reakciótérfogatok optimalizáló vizsgálatában (56. oldal, 40. ábra).



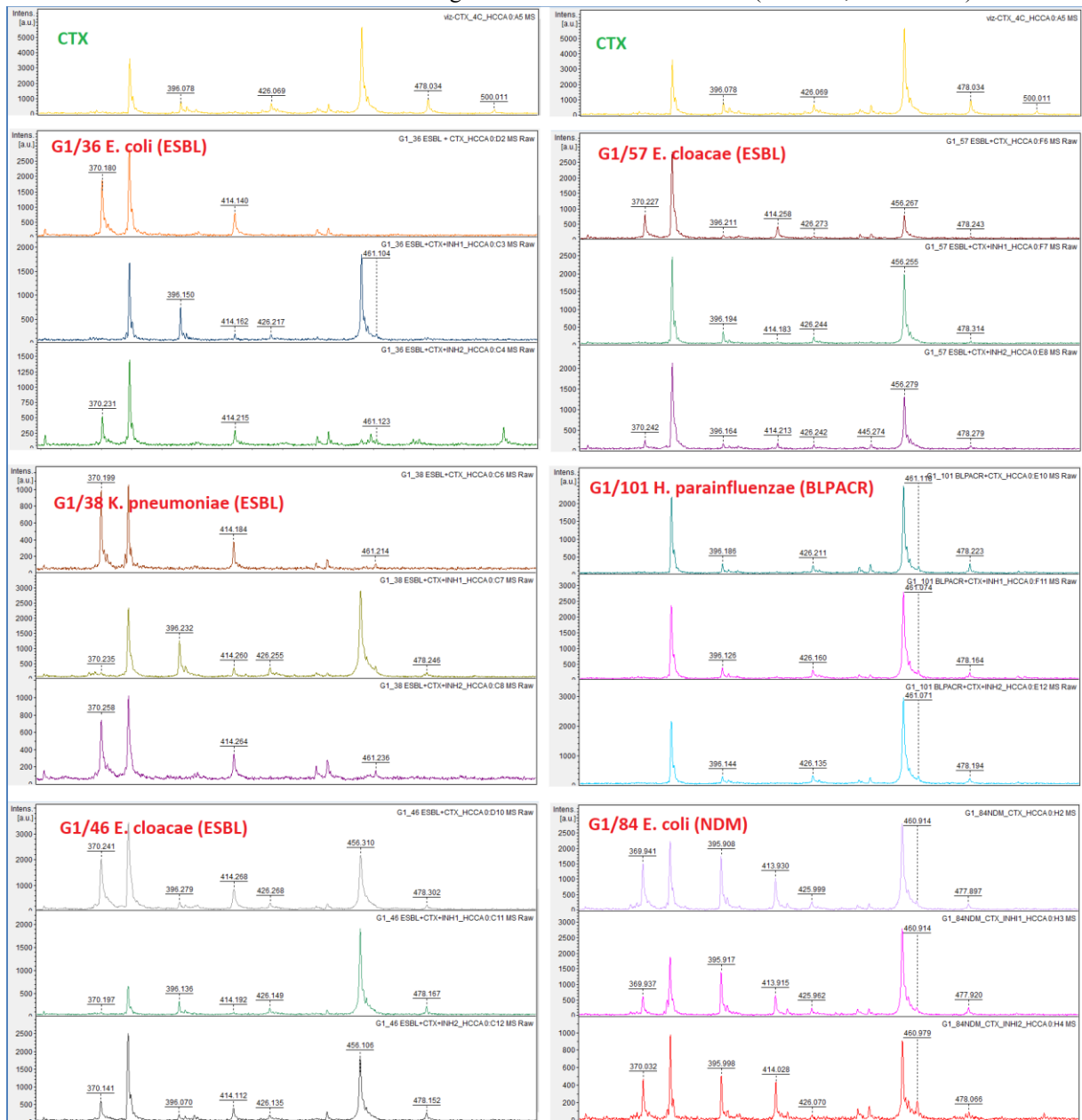
7. Függelék

Vizsgálatok cefotaximmal ismert és ismeretlen rezisztenciamechanizmusú izolátumokkal (62. oldal, 9. táblázat). (A spektrumok automatikus elnevezésében (apróbetűs feliratok a spektrumok jobb felső sarkában) tévedés történt a mérésre küldött fájl hibás összeállítás miatt, ezért némelyik szám mellett helytelen információk szerepelnek. Nagy piros betűvel láthatók a korrigált információk.)



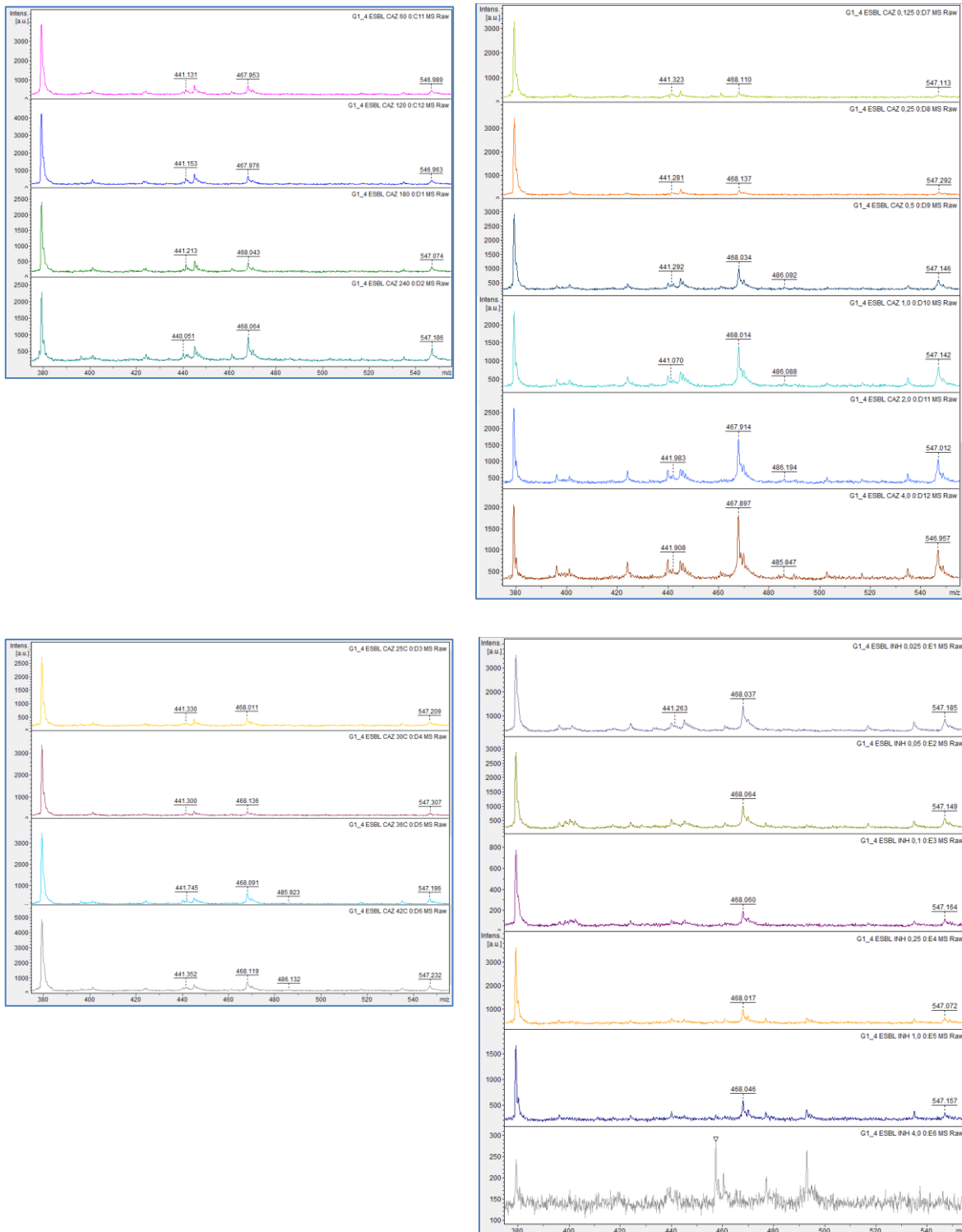
8. Függelék

Különböző törzsek cefotaxim rezisztencia vizsgálata enziminhibitorok mellett (64. oldal, 10. táblázat).



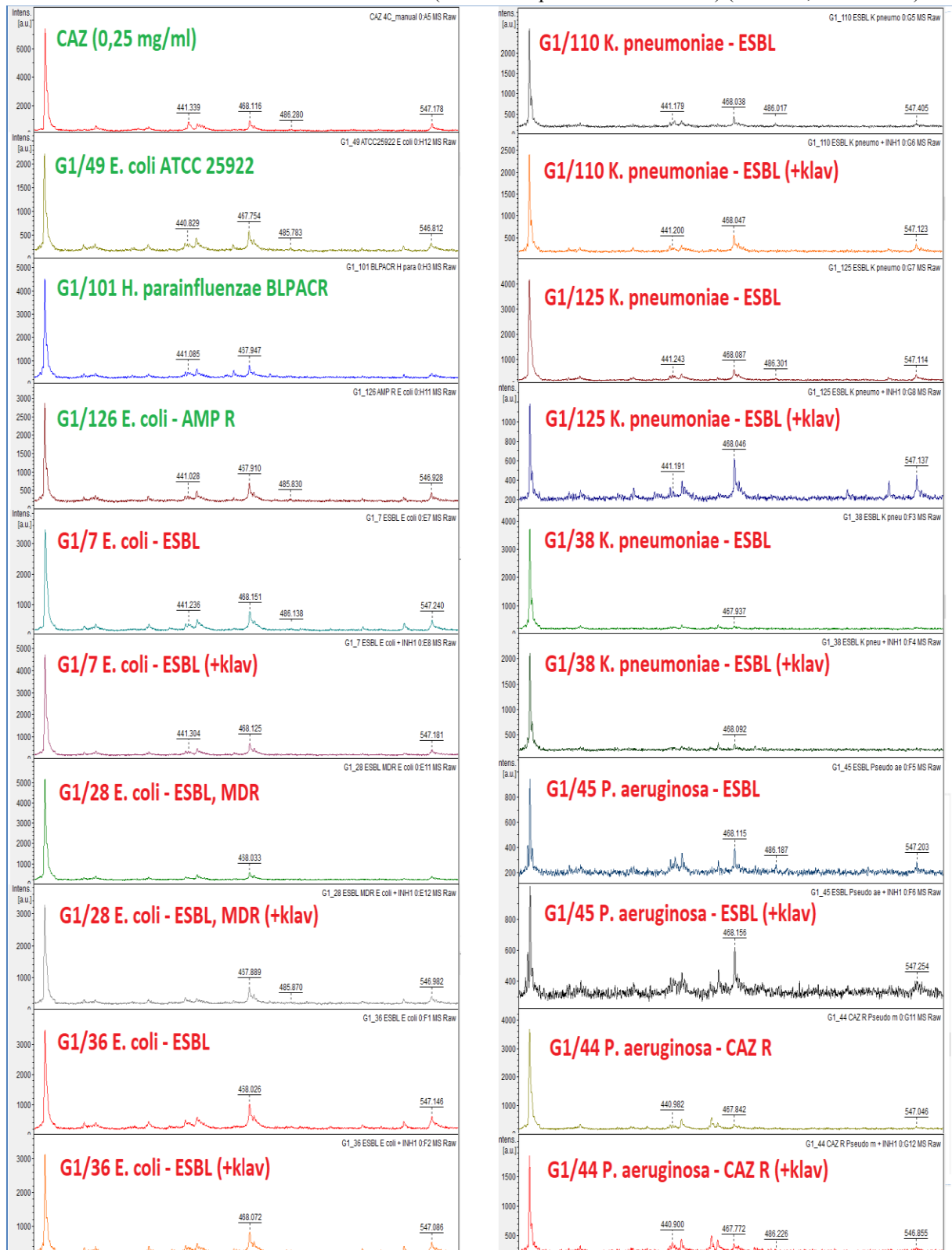
9. Függelék

Ceftazidim optimalizáló kísérletek spektrogramjai G1/4 ESBL *E. coli* törzssel (71. oldal, 48. ábra).



10. Függelék

Ceftazidim screen különböző baktériumtörzsekkel (+inhibíciós párhuzamos mérések) (73. oldal, 11. táblázat).



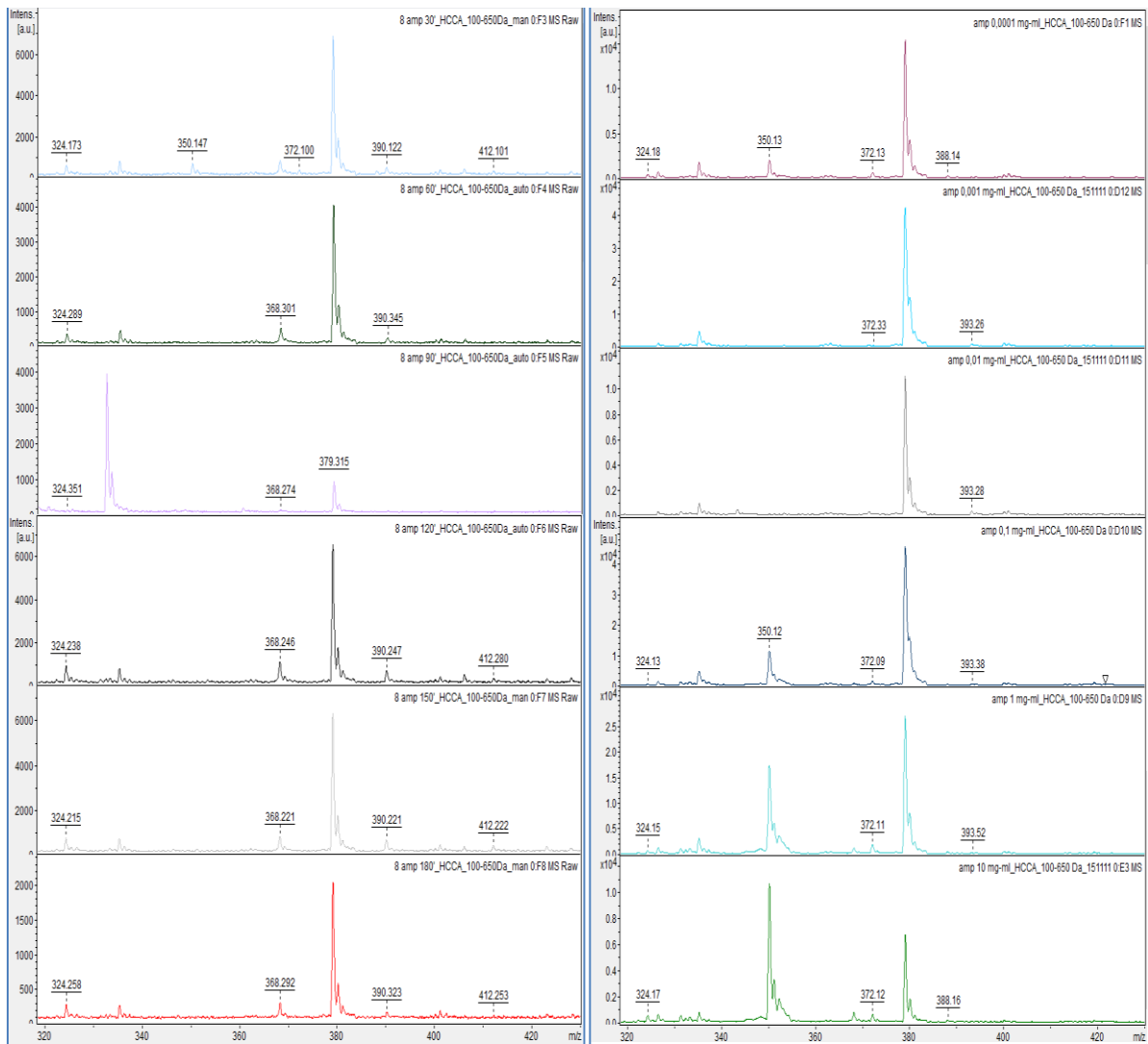
10. Függelék (folytatás)

Ceftazidim screen különböző baktériumtörzsekkel (+inhibíciós párhuzamos mérések) (73. oldal, 11. táblázat).



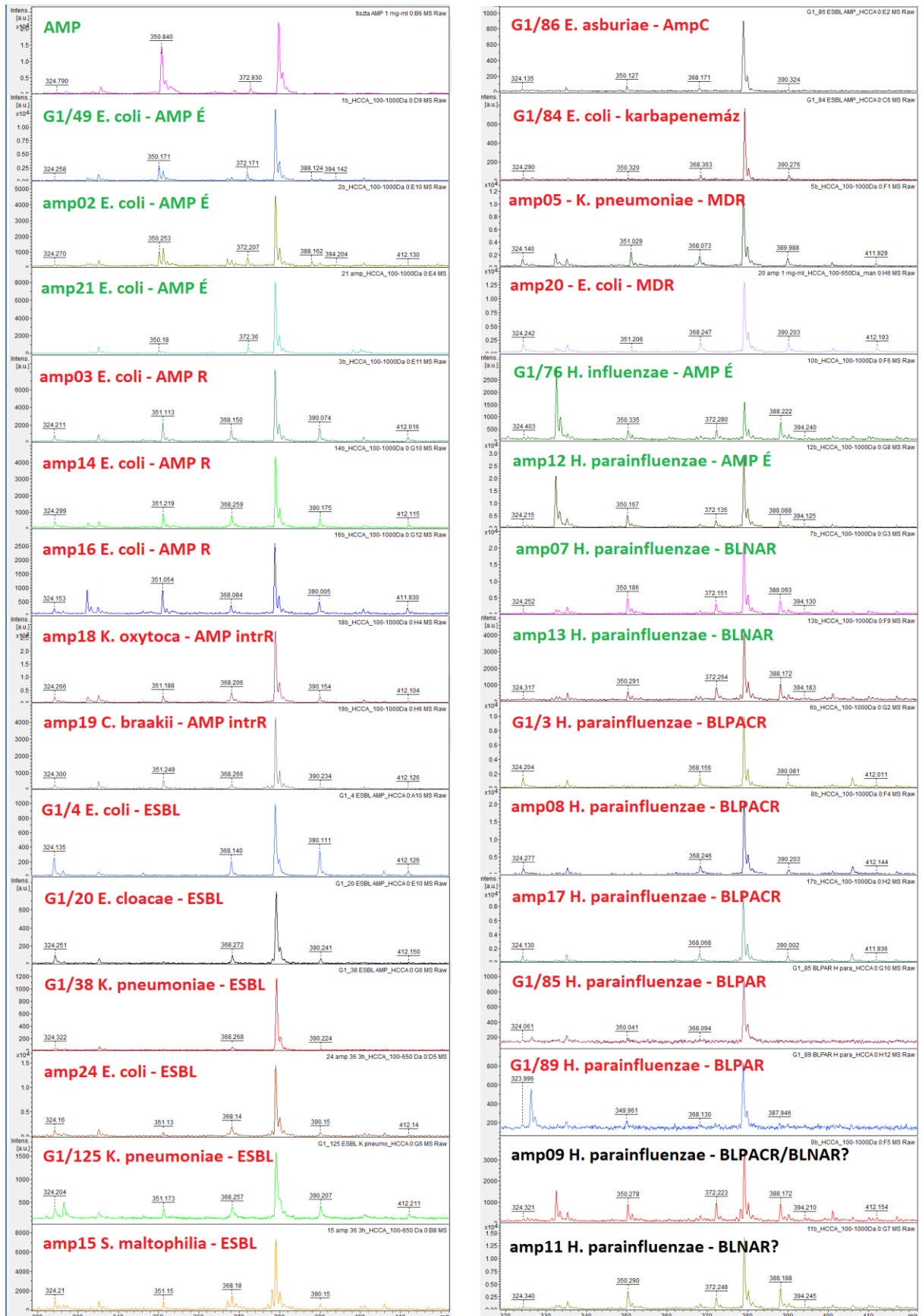
11. Függelék

Ampicillin inkubációs idők (balra) és antibiotikum koncentrációk (jobbra) optimalizálása (77-78. oldal).



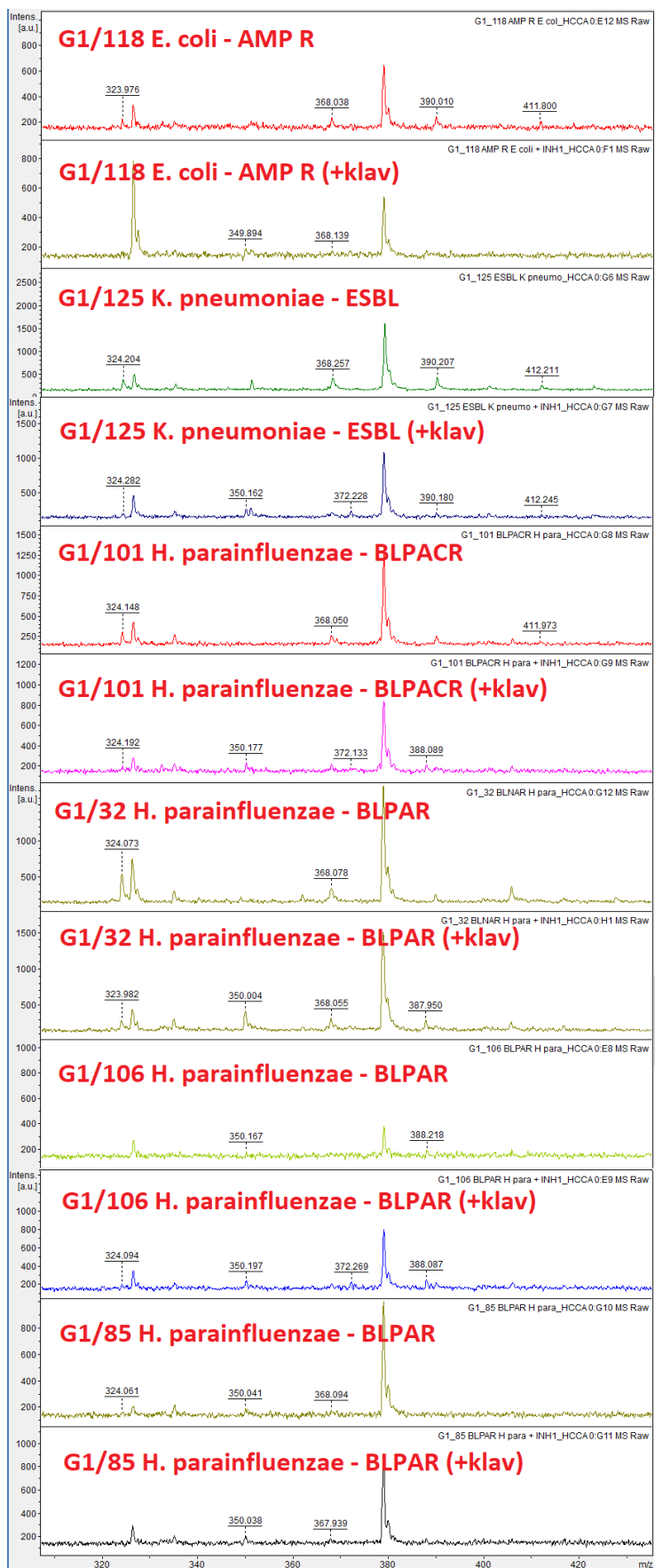
12. Függelék

Ampicillin enzimatisuk bontási kísérletek (78. oldal, 12. táblázat)



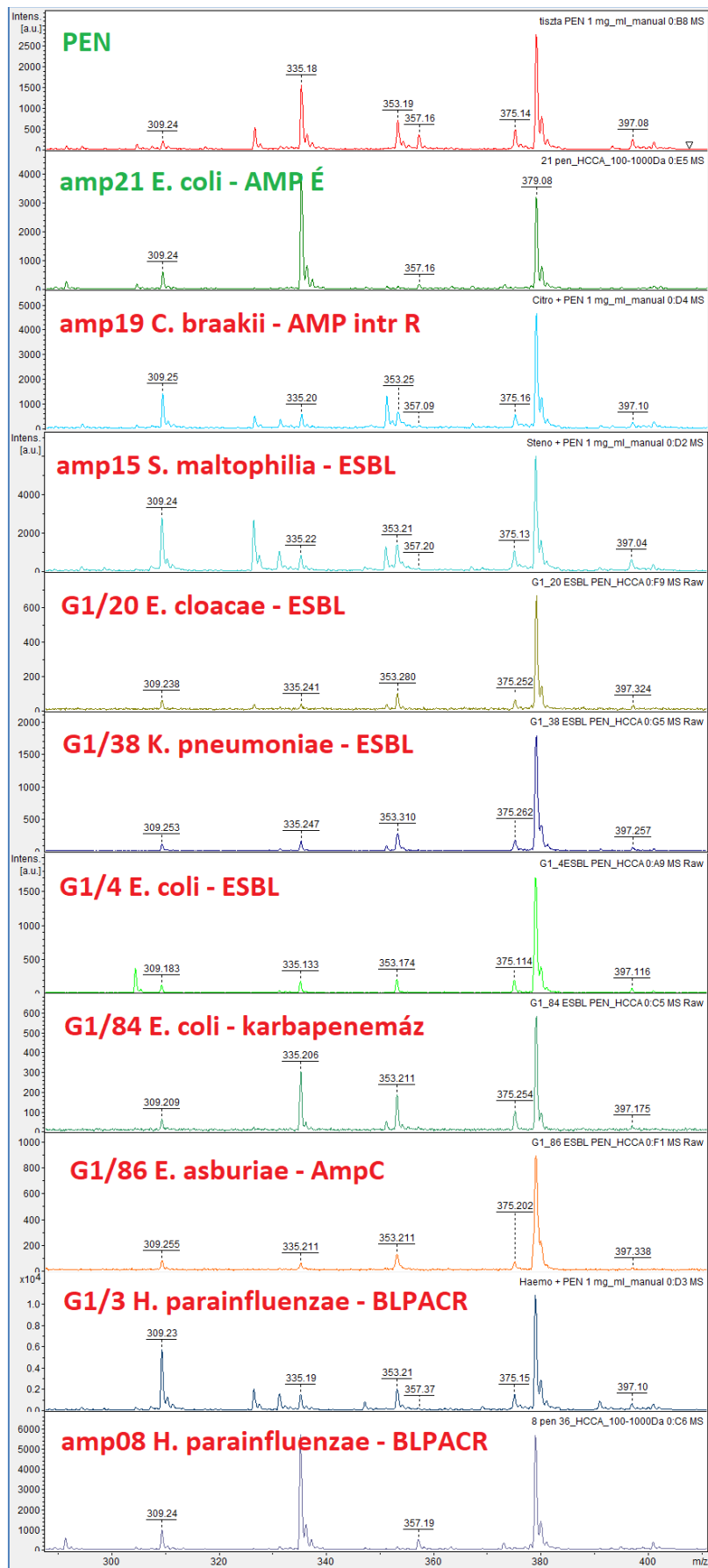
13. Függelék

Ampicillin enzimatis bontási kísérletek inhibíciós párhuzamosokkal. (82. oldal, 13. táblázat)



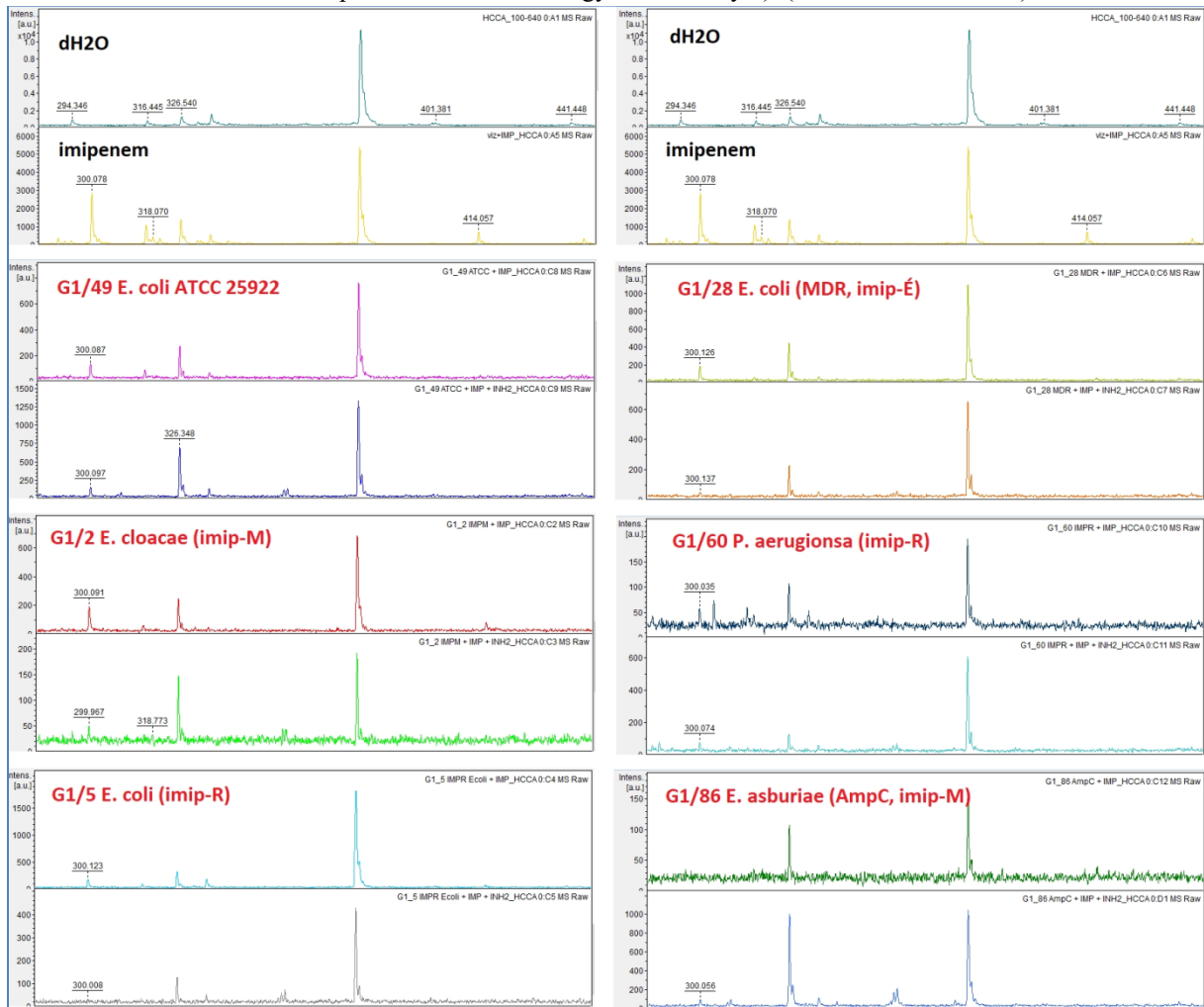
14. Függelék

Penicillin enzimátikus bontásának vizsgálata MALDI-TOF MS mérésekkel (86. oldal, 14. táblázat)



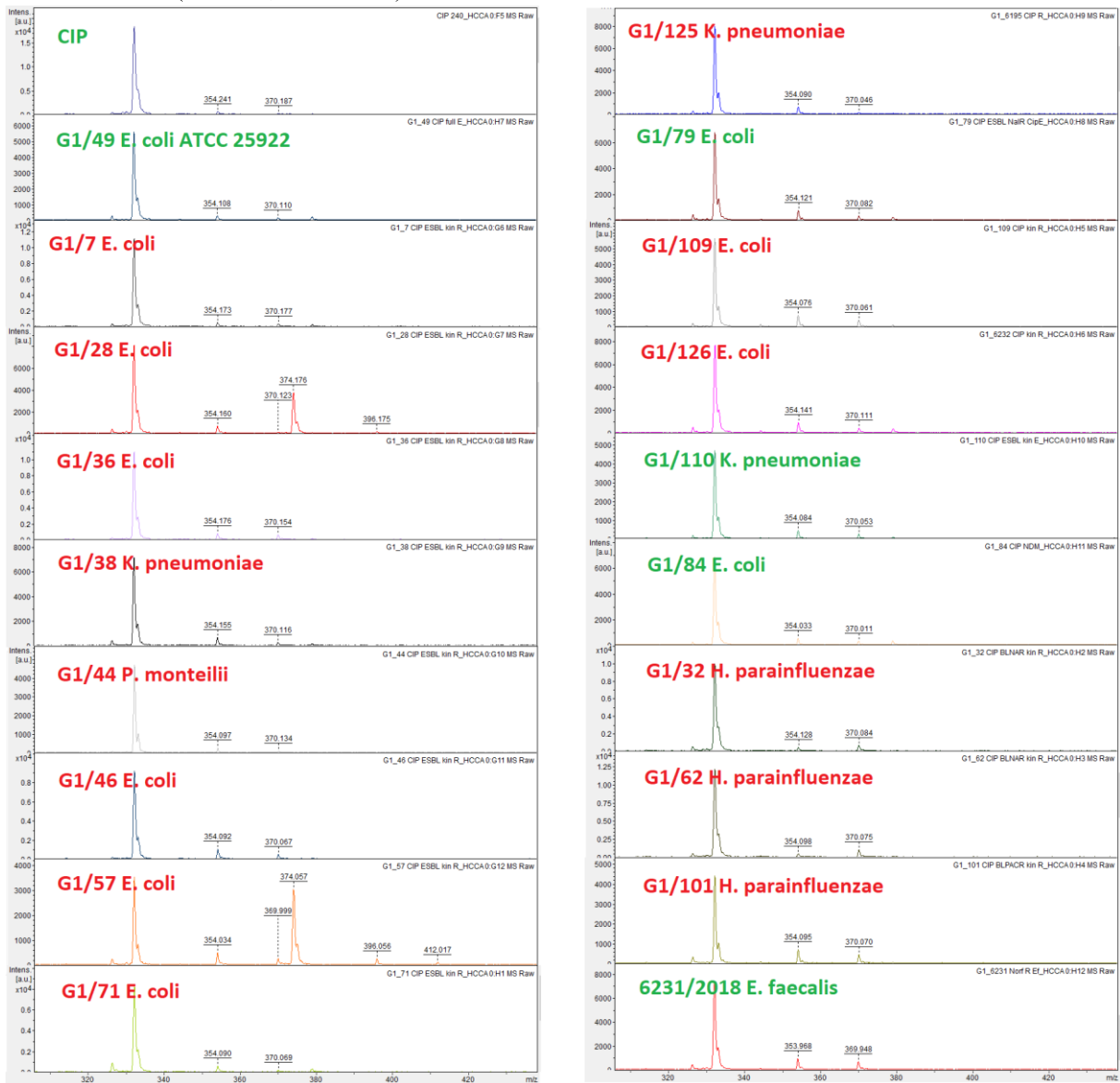
15. Függelék

Karbapenemáz aktivitás screen különböző baktériumtörzseken (imipenem antibiotikusos és imipenem antibiotikum + inhibitoros párhuzamos reakcióelegyek eredményei). (90. oldal, 15. táblázat)



16. Függelék

Ciprofloxacín rezisztens és negatív kontroll törzsek screenelése ciprofloxacint módosító acetiltransferáz enzimaktivitásra (97. oldal, 16. táblázat).



17. Függelék

VRE és non-VRE *E. faecalis* törzsek lehetséges differenciáló marker peakjei vizsgálatunk szerint (101. oldal, 17. táblázat).

