

Rezisztenciagének

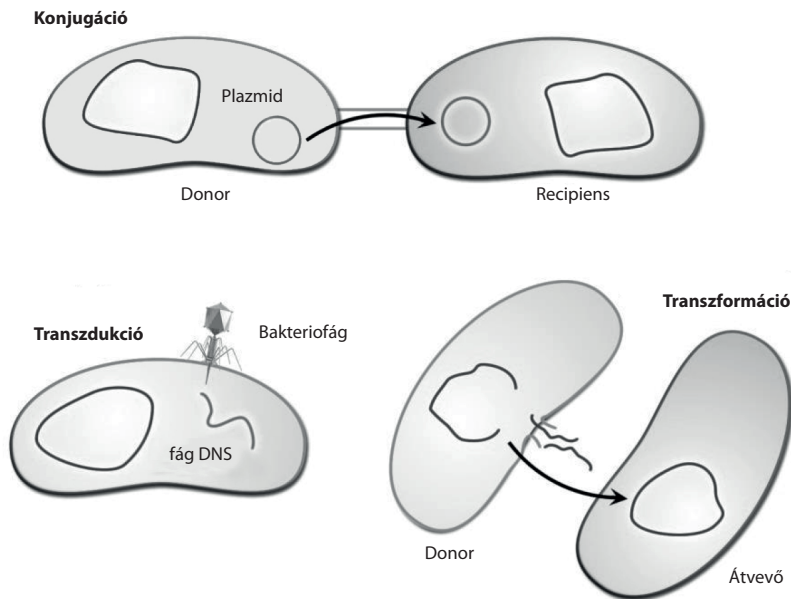
Az antibiotikumok korszaka 1928-ban kezdődött, amikor Alexander Fleming felfedezte a penicillint. Az antibiotikum rengeteg életet mentett meg a második világháborúban, és a korábban gyógyíthatatlan bakteriális fertőzések antibiotikummal kezelhetővé váltak, így ezt a korszakot az antibiotikumok aranykorának is nevezik. Az antibiotikumok aranykora azonban hamar véget ért azok kontrollálatlan, sokszor indokolatlan használata miatt, amely több antibiotikummal szemben is rezisztens (ABR) baktériumtörzsek kialakulásához vezetett. A legalaposabban az antibiotikumok ellen kialakuló rezisztenciát vizsgálták, de fémek, biocidek és számos más vegyület, például oktanol, hexán, toluén is kiválhatnak rezisztenciát [23].

A rezisztencia lehet örökletes tulajdonság, amely a bakteriális genomban kódolt, nagyobb rendszertani egységekre jellemző, és független bármely antibiotikum szelektív nyomásától. Ezt *természetes rezisztenciának* nevezzük, amely az evolúció során kialakult ősi tulajdonság, a mikrobák a környezetükben található káros vegyületek elleni védekezésben használják, ilyen rezisztenciamechanizmus például a biofilm termelése.

A *szerzett rezisztencia* ezzel szemben újonnan szerzett tulajdonság. A szerzett rezisztencia kiemelt figyelmet érdemel, mivel a korábban hatékony antibiotikumok ellen kialakuló rezisztencia szerzett úton alakul ki [24]. A mikroorganizmusok két fő evolúciós stratégiával tudnak védekezni az antibiotikumok hatásai ellen: 1. mutációk, amelyek gyakran a vegyület hatásmechanizmusával kapcsolatos génekben jönnek létre, és/vagy az endogén gének kifejeződésének megváltoztatása révén, illetve 2. idegen DNS megszerzésével, amelyek a rezisztencia meghatározó elemeit kódolják.

A természetes szelekció során a mutációval nem rendelkező mikrobákat az antibiotikum elpusztítja, és csak a *mutáció* kialakulása következtében rezisztensek maradnak életben és képesek szaporodni. A mutáció kialakulása nagy energiákat emészt fel, ezért jellemzően csak erős külső nyomásra, antimikrobiális vegyületek jelenléte esetén jön létre [24].

A rezisztenciát kódoló gének vagy géneket tartalmazó DNS-szakaszok baktériumok közötti áramlása ún. *horizontális* vagy *laterális géntranszfer* segítségével történik, amely a bakteriális evolúció egyik legfontosabb hajtóereje. A rezisztenciát hordozó DNS három fő úton juthat át egyik mikrobából a másikba: 1. *transzformáció*, 2. *transzdukció* (bakteriofágok által közvetített), és 3. *konjugáció* (közvetlen sejtkapcsolat során cserélődik ki a DNS) révén (2. ábra lásd [25]).



2. ábra: A horizontális géntranszfer mechanizmusai mikroorganizmusok között. Készítette: Goda Zoltán [26] alapján

A rezisztencia mechanizmusai

Leginkább az antibiotikum-rezisztencia mechanizmusát vizsgálták, de több mechanizmus a nehézfémek és a biocidek esetében is hasonlóan működik. A rezisztencia nem egyetlen mechanizmussal valósul meg, a mikroorganizmusok több stratégiát dolgoztak ki a számukra káros vegyületek hatásainak közömbösítésére:

- **Biofilm kialakítása.** A biofilm komplex és funkcionálisan szervezett mikrobiális közösség, elsősorban baktériumok alkotják, de vírusok, algák, egysejtűek is megtalálhatók az extracelluláris kocsonyás mátrixba, az ún. **EPS**-be (*extracellular polymer substance*) ágyazottan. Az EPS-t a mikrobák maguk termelik, a háromdimenziós biofilm struktúrájának kialakításáért felel, egymáshoz, illetve a felszínhez tapasztja a mikrobákat. Az egész biofilm tömegének akár 99%-át is az EPS teheti ki, a mikrobák csupán néhány %-át képviselik a biofilmben. A biofilmben szerves törmelékek és szervetlen vegyületek is beépülnek, tovább növelve a biofilm stabilitását, illetve biztosítják a tápanyagellátást. Az EPS diffúziós gátat képez, és védelmet nyújt az antibiotikumok, fertőtlenítőszer ellen. A biofilm kialakításának képessége természetes rezisztencia, mivel öröklött, kromoszómán kódolt tulajdonságról van szó, de egyes esetekben olyan mutánsok is szelektálódhatnak, amelyek erőteljesebb biofilmképző képességgel rendelkeznek [27].
- **Az antibiotikum módosítása** a sejten kívül, például adenil-, foszfát-, acetilcsoportok hozzáadásával az aminoglikozid típusú antibiotikum esetében.

- Az antibiotikum *enzimatis elbontása*. Ez történhet extracelluláris enzimekkel a sejten kívül, vagy a sejten belül intracelluláris enzimekkel. Az enzimek hatástalanítják az antibiotikumot, amely ezáltal nem képes kifejteni káros hatását a sejtre. Például a penicillináz a pencillint bontja, de más rokon vegyületek inaktiválását is képes elvégezni, vagyis keresztrezisztenciát mutat (lásd később).
- A *hatásos koncentráció kialakulásának megakadályozása* több mechanizmussal történhet. A sejt felületi struktúrái megakadályozzák a kötődést, bejutást, ami csökkenti a felvett antibiotikum mennyiségét. A hatásos koncentráció kialakulásának másik módja, hogy a már bejutott antibiotikumot aktív kiáramoltatás során ún. efflux pumpákkal folyamatosan kipumpálja a sejtől. Az efflux pumpák jellemzően több vegyület kiáramoltatására is alkalmasak (jellemzően kromoszómán kódoltak), de vannak vegyületspecifikus pumpák is, amelyek plazmidokon vagy mobilis genetikai elemeken kódoltak [28, 29]. Gyakran más mechanizmusok, például az antibiotikum módosítása vagy a célmolekula megváltoztatása is működik ugyanazon sejtben. Efflux pumpák nehézfémek kipumpálását is végzik, de fontos szerepet játszanak a szerves mikroszennyezők lebomlásában is, mivel megvédik a baktériumokat a toxikus anyagoktól, így azok átalakítását, lebontását el tudják végezni anélkül, hogy a sejt elpusztulna [28].
- A vegyület *célpontjául szolgáló molekulák megváltoztatása* akkor válik fontossá, amikor az antibiotikum eléri a sejtben a hatásos koncentrációt. Ez történhet például a célmolekulát kódoló gén pontmutációjával.
- Az *antibiotikum megkötése* is hatékonyan megakadályozhatja a célmolekula elérését.
- Az adott mikroorganizmusban meglévő rezisztencia mechanizmus jellemzően nem egyetlen vegyületre specifikus, például több vegyület kipumpálását is végezheti egyetlen efflux pumpa (például tetraciklin és higany [30]). Ezt a jelenséget *keresztrezisztenciának* nevezzük. A mikrobák jellemzően nem egyetlen rezisztenciagént tartalmaznak, hanem több, egymással nem rokon vegyület, például antibiotikumok és fémek elleni rezisztenciát kódoló gének is lehetnek a mikroorganizmusban. Ez a jelenség a *társrezisztencia*. A meglévő rezisztenciagének közül nem mindegyik jelent szelektív előnyt az adott környezetben a jelen lévő antimikrobiális vegyületekkel szemben, de mégis hordozza a mikroba. Ezt úgy lehet elképzelni, mint egy szerszámosdoboz, amelyben több szerszám van, közülük egyszerre csak egy vagy két szerszámot használunk, de megtartjuk a többit is, mert még szükség lehet rájuk. Ezzel szemben a keresztrezisztencia egy multifunkcionális szerszám, amely önmagában számos funkció ellátására képes [23]. A *koszelekció* során például az egy plazmidon található rezisztenciagének kapcsoltan adódnak tovább a másik mikrobába, ezzel az egyik rezisztenciagén szelekciójával ugyanazon a mobilis elemen található rezisztenciagén vagy -gének is együttesen szelektálódnak. Emiatt az antibiotikum-rezisztencia kiváltásában az antibiotikumok mellett egyéb vegyületek is fontos szerepet játszanak.

Antibiotikumok

Az antibiotikumok nem metabolizálódnak teljes mértékben a szervezetben, a nem metabolizált aktív hatóanyagok 55–80%-a a vizelettel és a széklettel távozik, és bejut a vízkészletekbe, míg az állatgyógyászatban használt antibiotikumok 90%-a jut részben metabolizált formában a környezetbe. 2003 előtt mind az USA-ban, mind Európában a betegségek kezelése mellett

azok megelőzésre, illetve növekedésserkentésre is használtak antibiotikumot. 2006-ban az EU megszüntette az antibiotikumok használatát növekedésserkentés céljából, az USA-ban pedig 2012-től csak receptre lehet antibiotikumot állatoknak adni. A fejlődő országokban ezek a szabályozások még hiányoznak. Az Egyesült Államokban a felhasznált antibiotikumok 80%-át az állattartásban és a haltenyészetekben használják fel. Az állatfarmokról, mezőgazdasági területekről kikerülő csurgalékvizek jelentős mennyiségű antibiotikumot szállítanak a környezetbe, emellett a lakossági szennyvizekből és a kórházak szennyvizeiből kerül jelentős mennyiségű antibiotikum a környezetbe. A vízkészletekben különböző koncentrációkban mutathatók ki az antibiotikumok, olyan mennyiségben, amely befolyásolhatja a fajok előfordulását, valamint antibiotikum-rezisztens baktériumok és antibiotikum-rezisztencia gének kialakulásához és elterjedéséhez vezethet. Az ABR-baktériumok megjelenése csökkentette az antibiotikumok hatékonyságát, ami egyre nagyobb egészségügyi kockázatot jelent.

Az antibiotikum-rezisztencia olyan globális problémává vált, amelyet csak teljes paradigma-váltással lehet megállítani, ehhez pedig közös összefogásra van szükség a háziorvosok és a betegek, a kórházak, valamint a helyi és globális egészségvédelmi szervezetek között. Az amerikai Járványügyi és Betegségmegelőzési Központ (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*) becslése szerint a háziorvosok által felírt antibiotikumok 30–50%-a felesleges, kb. 269 millió felírt antibiotikumot nem szedtek be, míg a kórházakban felírt antibiotikumok 30%-a volt felesleges, vagy nem megfelelő dóziszú. Csak az Egyesült Államokban több mint 2 millió ember fertőződik meg évente antibiotikum-rezisztens baktériummal. A gyógyszerrezisztens fertőzések kb. 25 ezer ember halálát okozták Európában évente [31], a helyzet ennél rosszabb a fejlődő országokban. A halálozások mellett további gond a megnövekedett egészségügyi költségek, ami 1,5 milliárd euró extrakiadást jelent évente Európában, az antibiotikum-rezisztencia által az egészségügyet közvetlenül érintő károk összköltségét körülbelül 20 milliárd dollárra becsülik, a járulékos költségekkel együtt (például munkából kiesés) ez a szám 35 milliárdra rúg. 2050-re az antibiotikum-rezisztencia összköltsége 100 milliárd dollár lesz, és a halálozások száma elérheti az évi 10 milliót. Ennek egyik oka, hogy az új antibiotikumok kifejlesztése nem képes lépést tartani az újabb és újabb antibiotikumokra rezisztens törzsek kialakulásával. Az antibiotikum-rezisztens baktériumok korábban leginkább a kórházakra korlátozódtak, ma már azonban nem ritka a kórházon kívüli fertőződés sem.

A környezetet tekintjük az antibiotikum-rezisztencia kialakulási gócpontjának, az ipari, bányászati tevékenységekből származó szennyezések, a környezetbe kerülő szennyvizek, a mezőgazdaságból és a halastavakból környezetbe jutó szennyeződések miatt [30]. A környezetben a mikroorganizmusoknak fontos ökológiai szerepük van a lebontástól kezdve a tápanyagok feldolgozásáig, mindemellett alapvető táplálékforrások is. A környezetben előforduló nem patogén baktériumok az antibiotikum-rezisztencia gének „raktáraként” működhetnek, ezért különösen fontos az antibiotikum-rezisztencia gének, illetve baktériumok környezetbe jutásának megakadályozása. Az antibiotikum-rezisztencia gének környezeti jelenlétét vizsgáló tanulmány során egy folyó több pontjáról biofilmmintákat vettek, és vizsgálták az antibiotikum-rezisztencia gének jelenlétét a biofilmekben. Általában az egész folyóban alacsony volt a vizsgált antibiotikum-rezisztencia gének jelenléte, azonban azokon a mintavételi pontokon, ahol az emberi és mezőgazdasági hatások jelentősek voltak (például intenzív emberi jelenlét, tejgázdalkodás), növekedett a folyókban megtalálható antibiotikum-rezisztencia [32]. A mikroorganizmusokban az antibiotikum-rezisztenciát kódoló gének (ARG, *antibiotic resistance genes*) mellett legtöbbször, ha nem mindig, egyéb rezisztenciagének is találhatók. Ezek a rezisztenciagének kiváltói lehetnek az antibiotikum-rezisztencia kialakulásának is [23].

Biocidek

A biocideket az egészségre káros élő szervezetek kontrollálására használjuk kórházakban, kozmetikumokban, háztartási tisztítószerekben, az iparban, mezőgazdaságban stb. Néhány gyakran használt biocid az etanol, formaldehid, klór, klórhexidin, triklozán, kvaterner ammóniumvegyületek (QAC) stb. A triklozánról, klórhexidinről, a QAC-ről is kimutatták, hogy alacsony koncentrációban antibiotikum-rezisztencia-szelektáló hatásuk van. Ivóvízhálózatokban, hosszú távú alacsony (0,3 mg/l alatti) maradéklór-koncentrációnál antibiotikum-rezisztens *Pseudomonas aeruginosa* szelekcióját mutatták ki [33]. *Acinetobacter baumannii* törzseknél alacsony klórkoncentráció esetén a baktériumban megtalálható legtöbb vagy összes antibiotikum-rezisztencia gén aktiválódott, köztük efflux pumpák is [34]. Az antibiotikumokhoz hasonlóan a biocidek környezetbe jutása is főként a szennyvíztisztítókön keresztül történik [23]. A szennyvíztisztítóknál az alacsony koncentrációban jelen lévő biocidek, antibiotikumok, valamint a nagyszámú mikroba kiváló közeget biztosít a horizontális géntranszfer számára.

Fémek

A fémek környezetbe jutásának jelentős pontforrás szennyezői a szennyvíztisztítók, emellett a mezőgazdasági területekről lefolyó esővizek, az ipari tevékenységek és a közlekedés is jelentős szennyező források. Az élelmiszer- és textiliparban, a kórházi termékekben és fertőtlenítőszerekben használt fém nanorészecskék (titánium, réz, ezüst) további forrásai a környezeti nehézfémeknek. Bizonyos fémeket (például ólom, réz, cink, kadmium, arzén) állati növekedésserkentésre vagy peszticidként használnak vagy használtak [23]. Angliában a mezőgazdasági területeket érintő, állati trágyából származó éves (2000-ben) nehézfém-kibocsátás jelentősen nagyobb volt bármely más talajjavító anyaghoz képest. A mezőgazdasági területekre kijutó nehézfémek forrásai csökkenő mennyiségben (g/ha/év) az alábbiak: szerves trágya (11 312), szennyvíziszap (4557), papíriszap (1380), műtrágya (89,7), atmoszféra (221) és öntözővíz (39) [23].

Húsz fémrezisztencia-gént ismerünk, amelynek bizonyított funkciója van az adott fémmel szembeni rezisztenciában. Az alábbiakban azokat a fémeket soroljuk fel, amelyek ellen bizonyított a rezisztencia, a felsorolás az előfordulási gyakoriságuk szerint csökkenő sorrendben történik, az élőlények számára nem esszenciális fémeket zárójelben jelöljük: Cu, Zn, Ni, (Cd), Co, Fe, Mn, (As), (Ag), (Te), (Hg), (Pb), Mn, Cr, (Au), (Ga), (Sb), (V), Se, (Bi).

Fémrezisztenciát hordozó baktériumok nagyobb gyakorisággal hordoznak ARG-t is, mint azok a baktériumok, amelyekben nem volt fémrezisztencia-gén [23]. A fémrezisztencia a fentiekben bemutatott antibiotikum-rezisztenciához hasonló mechanizmusokkal működik: 1. *csökkent membránpermeabilitás* (fémek: As, Cu, Zn, Mn, Co, Ag; antibiotikumok: ciprofloxacín, tetraciklin, kloramfenikol, β -laktámok); 2. *a kémiai elem vagy vegyület megváltoztatása* (fémek: As, Hg, antibiotikumok: kloramfenikol, β -laktámok); 3. *efflux pumpák* (fémek: Cu, Co, Zn, Cd, Ni, As, antibiotikumok: tetraciklin, kloramfenikol, β -laktámok); 4. *célmolekula megváltoztatása* (fémek: Hg, Zn, Cu, antibiotikumok: ciprofloxacín, β -laktámok, trimetoprim, rifampicin); és 5. *a fém vagy antibiotikum megkötése* (fémek: Zn, Cd, Cu, antibiotikumok: coumermycin A) [23].

Rezisztenciagének

A szennyvíztisztítóba történő folyamatos antibiotikumkibocsátás együtt jár a rezisztenciagének kibocsátásával is. A szennyvíztisztítóban található rezisztenciagének elsősorban az emberi szervezet bélrendszeréből származnak. Az antibiotikumok és a rezisztenciagének együttes jelenléte a szennyvíztisztítóban új rezisztenciakombinációk kialakulásához vezethet, amelyet a mikrobák egymásnak horizontális géntranszfer segítségével átadnak. Az antibiotikumok (de a fémek és a biocidek is) kiváltják a baktériumok ún. S. O. S. válaszreakcióját, azaz stressz hatására a baktériumokban átmeneti, genomszintű hipermutációk jönnek létre. A stressz a HGT-mechanizmusokat is kiváltja, ami segíti a rezisztenciagének terjedését. Az S. O. S. válaszreakciót egyes antibiotikumok hatására (például β -laktámok, kinolonok, aminoglikozidok) termelődő reaktív oxigéngyökök (ROS, *reactive oxygen species*) is kiváltják. A ROS jelenléte a környezetben spontán mutációkat okozhat, ami új antibiotikum-rezisztencia kialakulását is eredményezheti. A rezisztenciagének perzisztálnak a környezetben, antibiotikum jelenléte nélkül is.

Az ARG-k jelenlétét vizsgálták szennyvíztisztítóban [35], valamint elemezték a különböző szennyvíztisztítási módszerek eltávolítási hatékonyságát. Az anaerob és anoxikus kezelések sokkal hatékonyabban távolítják el az ARG-ket, mint az aerob kezelés önmagában, illetve az *anaerob kezelést követő aerob kezelés is hatékonyabb volt (85%-os hatékonyság)*, mint ha kizárólag anaerob vagy aerob kezelést alkalmaztak volna. A membrántechnológia alkalmazása tovább növeli az ARG-eltávolítás hatékonyságát. A növényágyas szennyvíztisztítás bár hatékonyan eltávolítja az ARG-ket, raktárként is funkcionálhat azok számára. A megfelelő koncentrációban alkalmazott fertőtlenítés hatékonyan el tudja távolítani az antibiotikum-rezisztens baktériumokat és az ARG-ket, a klórozás, UV-fertőtlenítés és ózonos kezelések közül a klórozás volt a leghatékonyabb [35].

Az antibiotikum-rezisztens mikroorganizmusok kialakulásáért korábban kizárólag a túlzott és kontrollálatlan antibiotikum-használatot tartották felelősnek, ma már látjuk, hogy ez sokkal komplexebb folyamat.

Fejezetzáró kérdések

1. Mit jelent a természetes és szerzett rezisztencia, melyek a kialakulásuk mechanizmusai?
2. Mik azok a rezisztenciagének?
3. Melyek a rezisztencia mechanizmusai (miben nyilvánul meg a rezisztencia)?
4. Jellemezze a biofilm felépítését!
5. Mit jelent a keresztrezisztencia és a társrezisztencia?
6. Mit jelent a koszelektió?
7. Miért probléma az antibiotikum-rezisztencia gének kialakulása és elterjedése?
8. Mi az összefüggés a fémrezisztencia-gének és az ARG-k előfordulása között?
9. Miért kiváló közeg a szennyvíztisztító a horizontális géntranszferhez?
10. Milyen eljárással távolíthatók el hatékonyan a szennyvíztisztítóban az ARG-k?