

5. Félévi beszámoló

Óbudai Egyetem
Anyagtudományok és Technológiák Doktori Iskola

Téma: Könnyűipari termékek antibakteriális hatékonyságának jellemzése

Doktorandusz: Hanczvikkel Adrienn

Témavezetők: Dr. habil. Bayoumi Hamuda Hosam
dr. Tóth Ákos



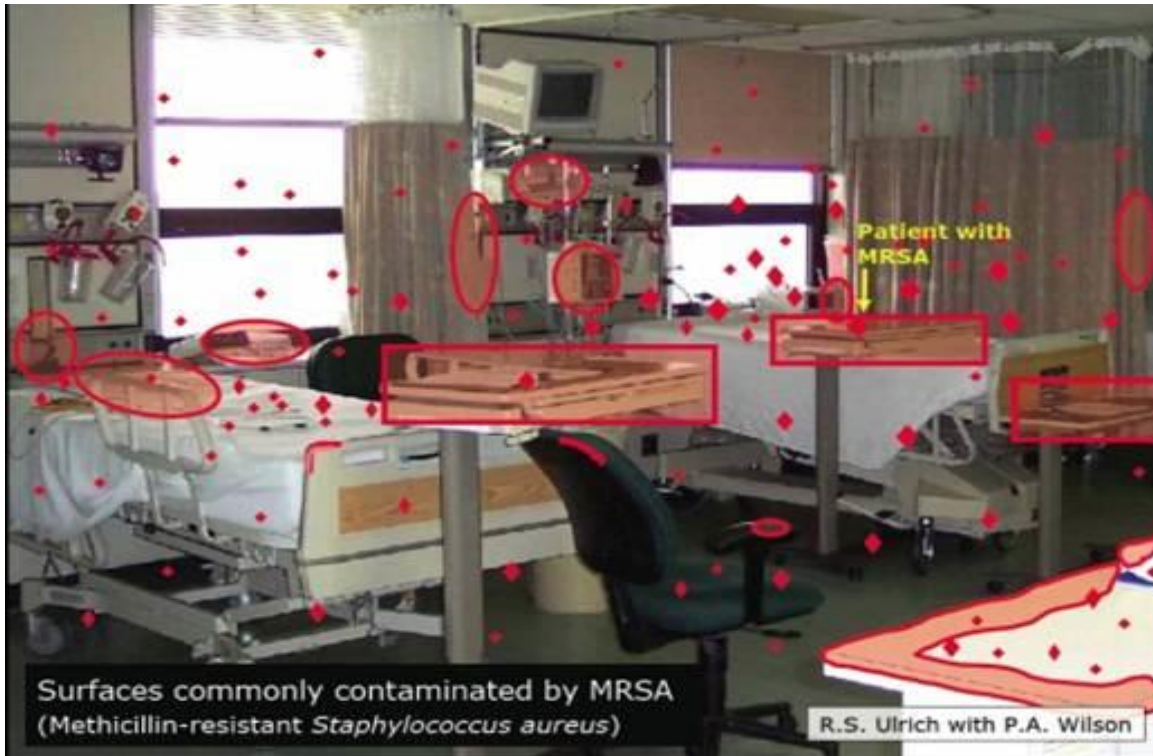
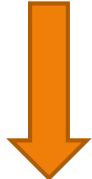
Óbuda University
Pro Scientia et Futuro

Kutatási célok, azok jelentősége

- Miért lenne fontos az antimikrobiális hatóanyagok egészségügyi alkalmazása?
 - **Európa (ECDC – 2014)**
Naponta ~116.000 beteg szerez min. 1 nosocomiális fertőzést
Évi 37.000 haláleset
 - **Magyarország (NNSR – 2014)**
111 nosocomiális járvány
3995 MDR kórokozók okozta fertőzés



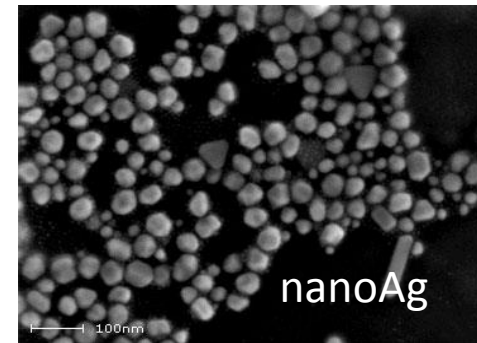
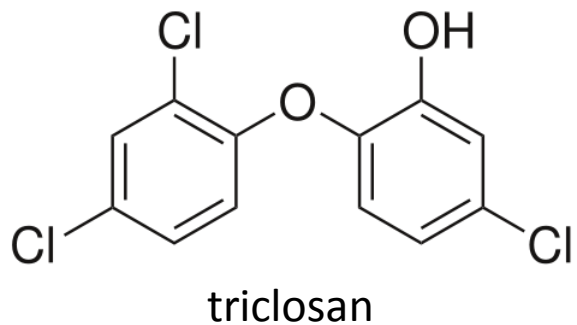
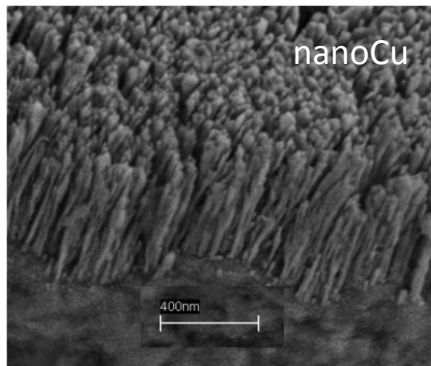
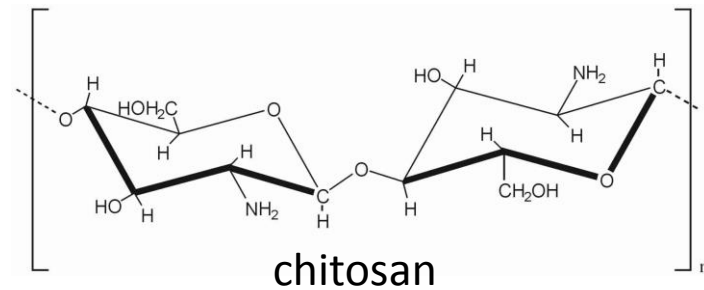
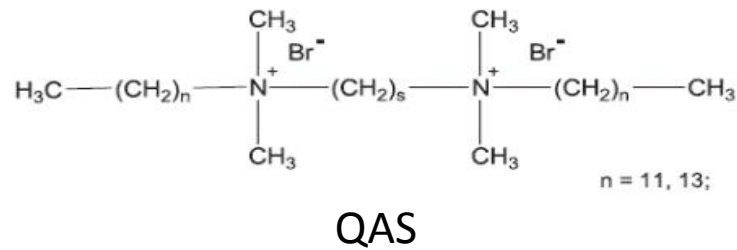
Kórokozók terjedése – abiotikus felületek



Surfaces commonly contaminated by MRSA
(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

R.S. Ulrich with P.A. Wilson

Antibakteriális bevonatok



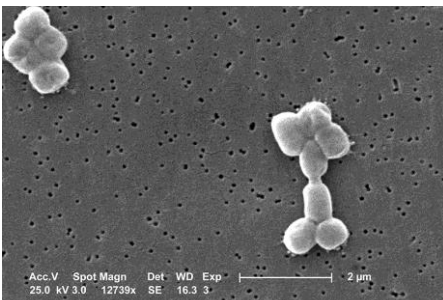
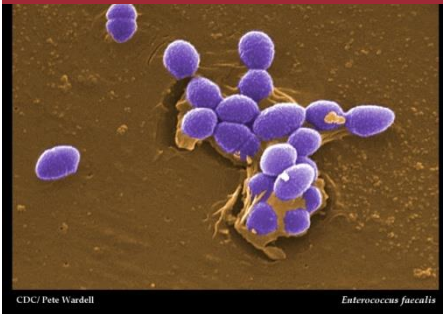
- Hatékonyság ellenőrzése célzottan kiválasztott, jól túlélő, multirezisztens patogénekkal ->



4 faj, 15-15 baktériumtörzs

VRE: vancomycin-rezisztens

Enterococcus faecium



MACI: multirezisztens
Acinetobacter baumannii

MRSA: meticillin-rezisztens

Staphylococcus aureus



MRKP: multirezisztens
Klebsiella pneumoniae

- intenzív osztályok
- nosocomiális járványok
- véráram-, húgyúti fertőzés
- tüdő-, agyhártyagyulladás
- antibiotikum-rezisztencia

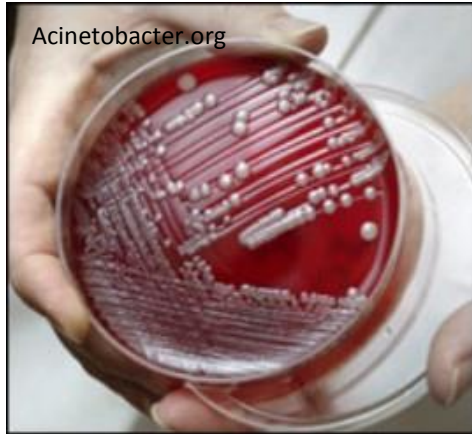
Kutatási munka csoportosítása

1. Kórházi patogének túlélésének vizsgálata bevonat nélküli felületeken.
 - 1.1. Kórtermi körülmények (2-3. félév)
 - 1.2. 100 % CO törölköző és CO-PE (80-20%) lepedő (5.félév)
 - 1.3. Beteg testéhez közeli textília modellezése (5. félév)
2. Antibakteriális hatóanyagok vizsgálata
 - 2.1. MIC és MBC mérések táplevesben (3-4. félév)
 - 2.2. Ag-vegyületekhez való szoktatási kísérlet (4-5. félév)
3. Antibakteriális hatóanyaggal bevont felületek hatékonyságának vizsgálata. (4-5. félév)

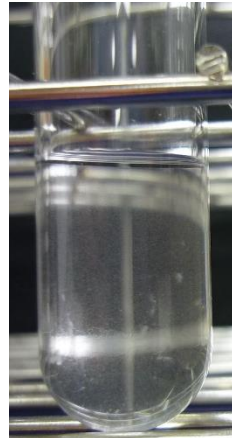
1. Kórházi patogének túlélésének vizsgálata bevonat nélküli felületeken

- 1.1.** Kórtermi körülmények (2-3. félév)
- 1.2.** 100 % pamut törölköző és pamut-poliészter (80-20%) lepedő vizsgálata (5. félév)
- 1.3.** Beteg testéhez közeli textília modellezése (5.félév)

Kísérleti protokoll



24 h -ás tenyészet

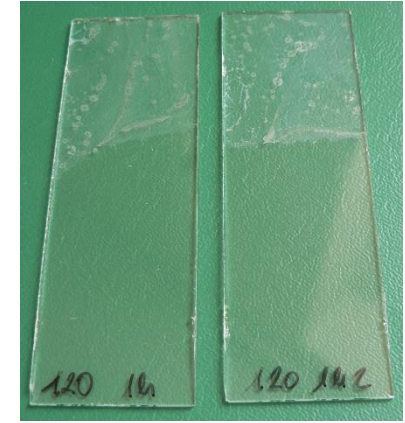
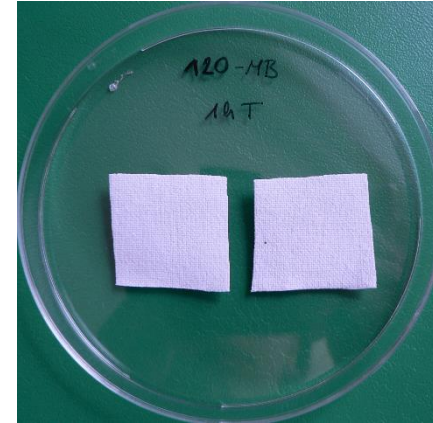


0,5 McF

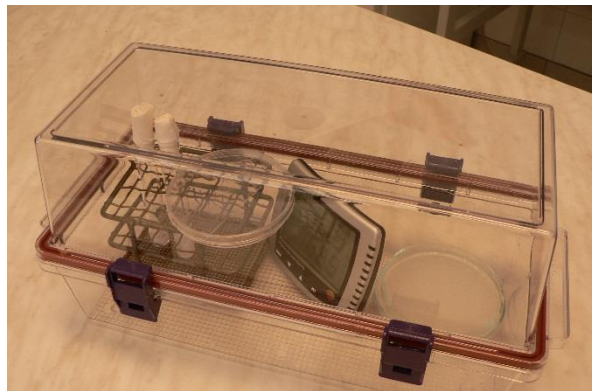
hígítás



20-20 μ l

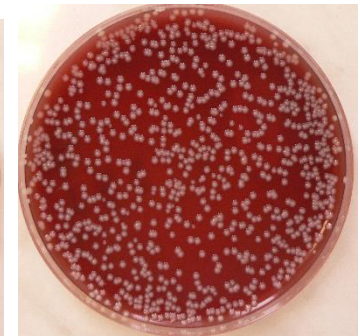


2,5*2,5 cm felület; $2 \cdot 10^5$ CFU



35 °C; Rh = 82-83 %; KCl

25 °C; Rh = 52,5-53 %; $Mg(NO_3)_2$



hígítási sor, 24h inkubálás, telepszámlálás

1.1. Túlélés kórtermi felületeken (2-3. félév)

- 25 °C; Rh = 52,5-53 %; $Mg(NO_3)_2$; üveg és 100% pamut, használt kórházi lepedő
- **Gram-negatív törzsek:**
 - A kórházakban gyakoribb genetikai típusok jobb túlélők.
 - **MRKP:** legkevésbé ellenálló felületeken.
 - **MACI:** textilen szignifikánsan jobban túlélnek ($P=0,017$).
- **Gram-pozitív törzsek:**
 - **MRSA:** üvegen szignifikánsan jobban túlélnek ($P<0,01$).
 - **VRE:** mindkét felületen nagy túlélőképességet mutatnak.
- **Izolálási hely (abiotikus felszín ↔ invazív minta):**
nincs különbség
- **Biofilmképzés ↔ megtapadás, túlélőképesség:**
nincs különbség

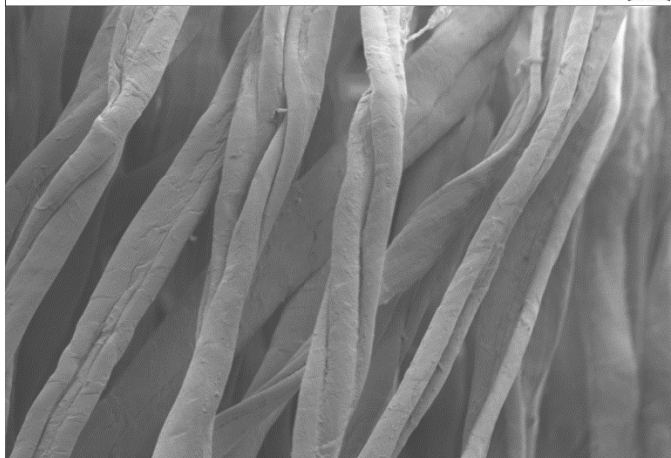
1.2. Túlélés törölköző felületén (4-5. félév)

25°C, Rh=52,5-53%; $Mg(NO_3)_2$

100% pamut törölköző



100µm EHT = 2.00 kV Signal A = SE1 Date :29 Oct 2015
WD = 8.0 mm Mag = 100 X File Name = torolkozo_06.tif ZEISS

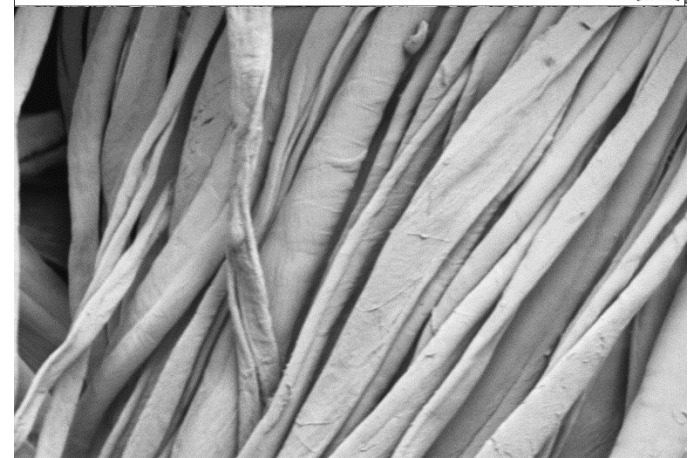


10µm EHT = 2.00 kV Signal A = SE1 Date :29 Oct 2015
WD = 8.0 mm Mag = 2.00 K X File Name = torolkozo_02.tif ZEISS

100% pamut lepedő



200µm EHT = 2.00 kV Signal A = SE1 Date :29 Oct 2015
WD = 12.0 mm Mag = 200 X File Name = kontrol_02.tif ZEISS



10µm EHT = 2.00 kV Signal A = SE1 Date :29 Oct 2015
WD = 12.0 mm Mag = 2.00 K X File Name = kontrol_05.tif ZEISS

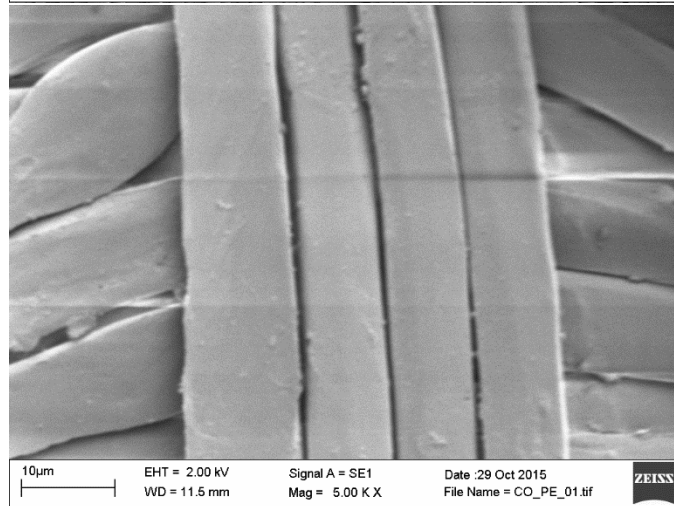
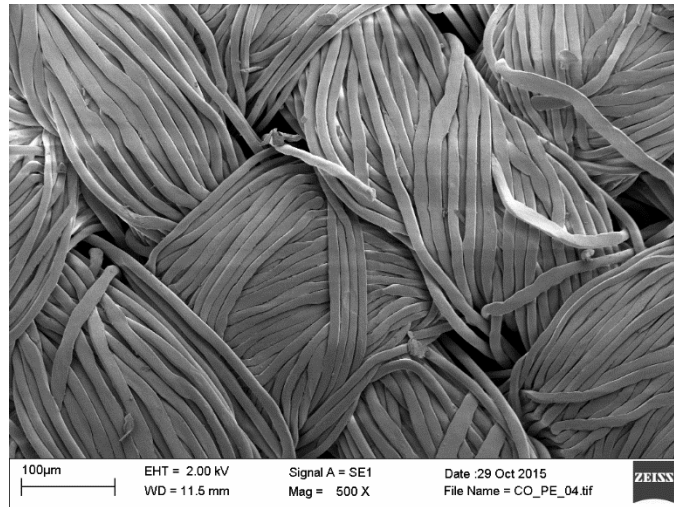
1.2. Túlélés törölköző felületén (4-5. félév)

- **Pilot study:** fajonként 3 törzs ($\Sigma 12$), korábbi kísérleteink alapján
 - a legmagasabb,
 - a közepes és
 - a legkisebb túlélési képességű törzs
- A **törölköző** felületén átlagosan nagyobb számban élnek túl a baktériumok, de a különbség **nem szignifikáns** (páros T-próba).

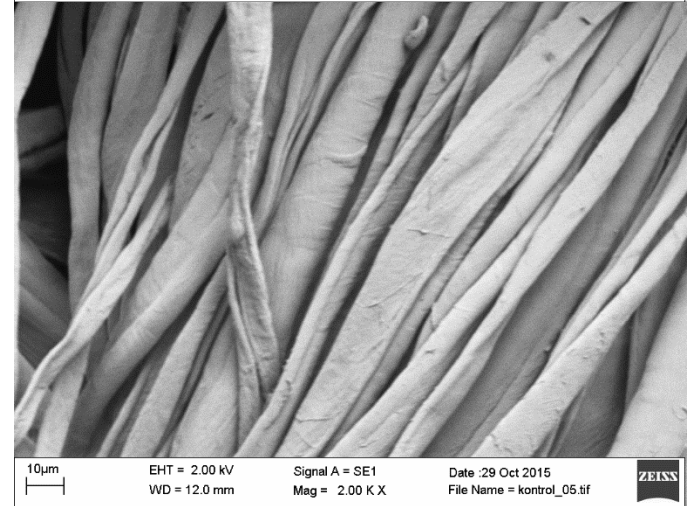
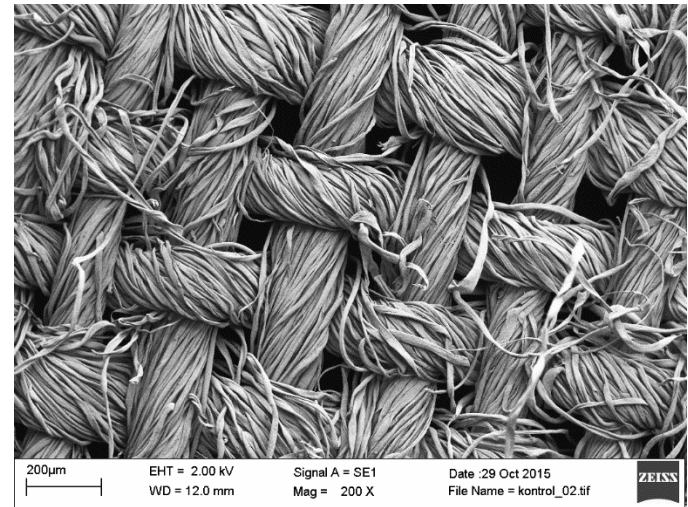
1.2. CO-PE lepedő (4-5. félév)

25°C, Rh=52,5-53%; Mg(NO₃)₂

pamut-poliészter (80-20%) lepedő



100% pamut lepedő



1.2. CO-PE lepedő (4-5. félév)

- **Pilot study:** fajonként 3 törzs (Σ 12)
- A **Gram-pozitív** törzsek túlélőképessége átlagosan nagyobb a **pamut-poliészter** (80-20%) keveréken.
- A **Gram-negatív** törzsek a **100% pamut** szöveten éltek túl magasabb számban.
- Az eredmények **nem szignifikánsak** (páros T-próba)

1.3. Beteg testéhez közeli textília modellezése (5. félév)

- Több publikációban nem szabályozzák precízen a körülményeket.

Pl.: 22-38 °C; RH = 39-79%

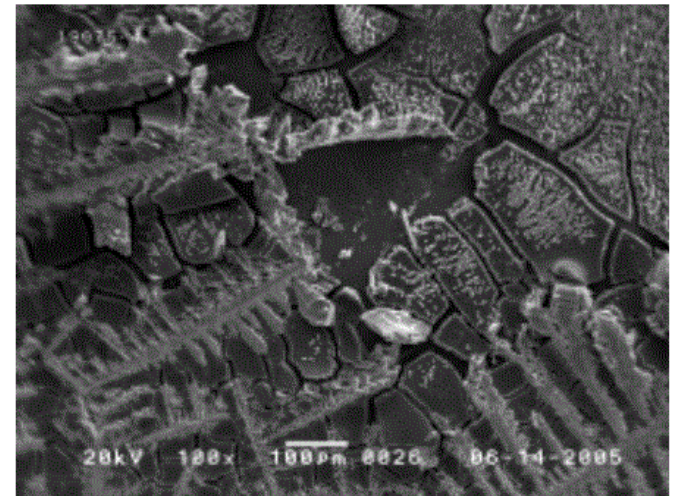
- Nincs egységes álláspont a hőmérséklet és páratartalom hatásának kérdésében.



- **Pilot study:** 2. kórházi körülmény: 35°C; Rh = 82-83 % (KCI)
- **Nincs szignifikáns** különbség a túlélési képességben kórtermi körülményekhez képest (páros t-próba).

További tervek

- Fiziológias sóoldat \leftrightarrow szerves oldatok
- Az irodalmi adatok alapján a **biológiai szennyezés** várhatóan **növelni** fogja a törzsek túlélési képességét.
- Biológiai szennyezés modellezése:
 - mesterséges izzadtság (MSZ EN ISO 105-E04 szabvány);
 - marha szérum-albumin;
 - ló-szérum.



MAKISON, C.; SWAN, J. The effect of humidity on the survival of MRSA on hard surfaces. *Indoor and Built Environment*, 2006, 15.1: 85-91.

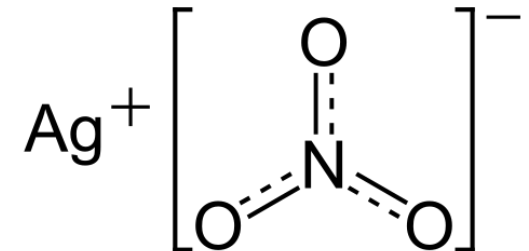
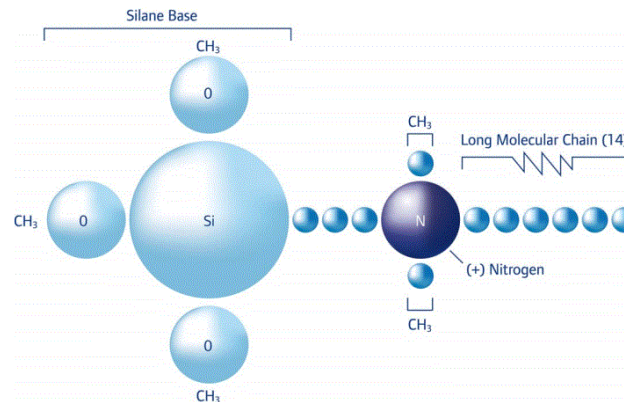
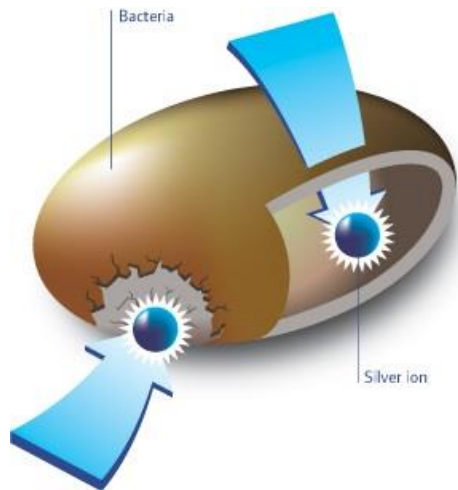
2. Antibakteriális hatóanyagok vizsgálata

2.1. MIC és MBC mérések táplevesben (3-4. félév)

2.2. Ag-vegyületekhez való szoktatási kísérlet (4-5. félév)

2.1. Hatóanyagok

- Oldatok:
 - Sanitized T27-22 **Silver**: (2 m/m% AgCl és 8 m/m% TiO₂)
 - Sanitized **T99-19**:
50 m/m% Dimethyltetradecyl(3-(trimethoxysilyl)propyl)ammonium-klorid)
 - 0,1N-os **AgNO₃** oldat (Szkarabeusz vb.)



2.1. MIC és MBC mérése (3-4. félév)

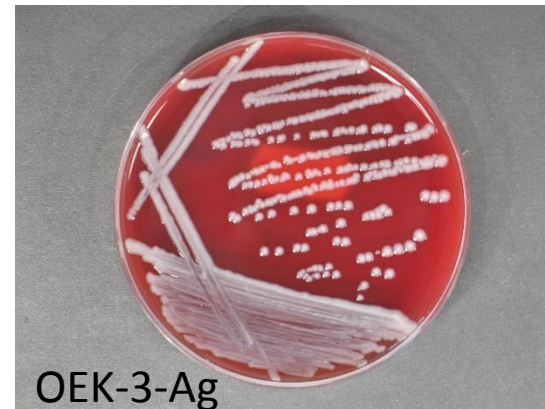
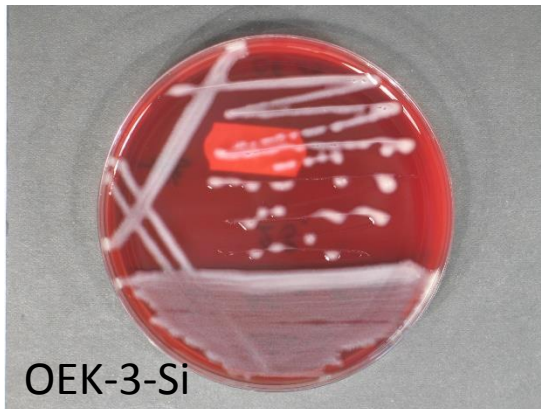
- **MIC** = minimális gátló koncentráció
- **MBC** = minimális baktericid koncentráció

$$\text{Baktericid hatóanyag} = \frac{\text{MBC}}{\text{MIC}} \leq 4$$

- A Sanitized hatóanyagok baktericidek az összes kórokozóra.
- A Gram-negatív törzsek MIC és MBC értékei szignifikánsan magasabbak mindkét Sanitized hatóanyag esetén ($P < 0,01$)
- Az AgNO_3 baktericid a Gram-negatív, bakteriosztatikus a Gram-pozitív törzsek esetében.

2.2 Szoktatási kísérlet eredménye

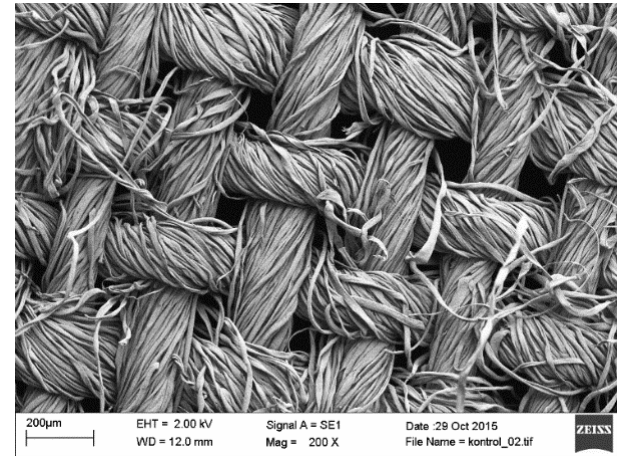
- **OEK-3:** ST15-ös nemzetközi klón, Ag-rezisztenciagének
 - Silver: 7,81 → 500 mg/L (**56x**);
AgNO₃: 3,32 → >8500 mg/L (**2560x**).
 - Antibiotikum rezisztencia megtartása, stabil MIC értékek
 - Fenotípus-változás:



3. Antibakteriális hatóanyaggal bevont felületek vizsgálata. (4-5. félév)

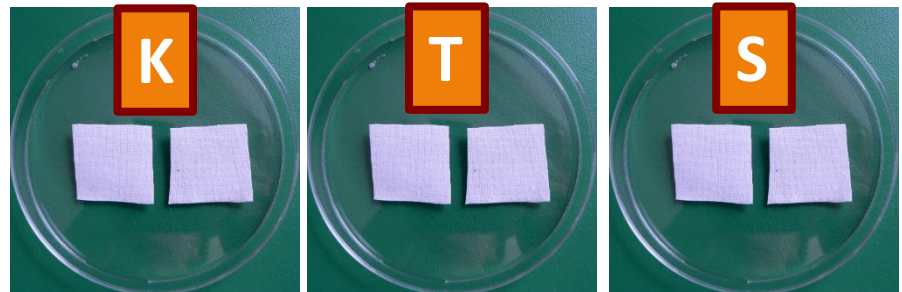
3.1. Antimikrobiális kikészítés

- 100% pamut lepedő
- A gyártó utasításai szerint.
- Hálás köszönet a BME-n
Dr. Vígh Andrásnak
Frank Zsuzsannának



3.2. Átfogó kísérlet

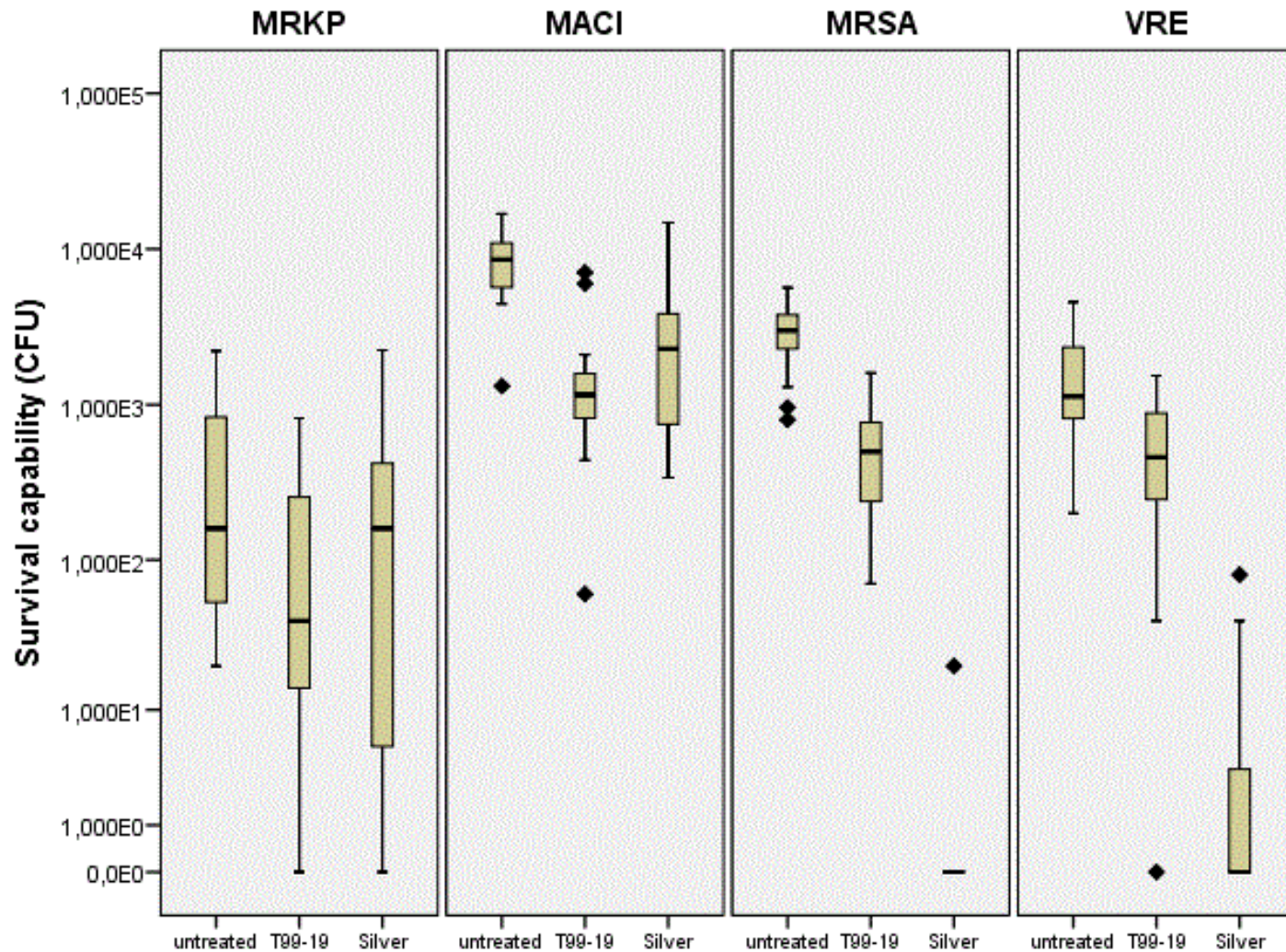
- Fajonként 15 törzs;
- Inkubációs idő:
1 óra és 1 nap.



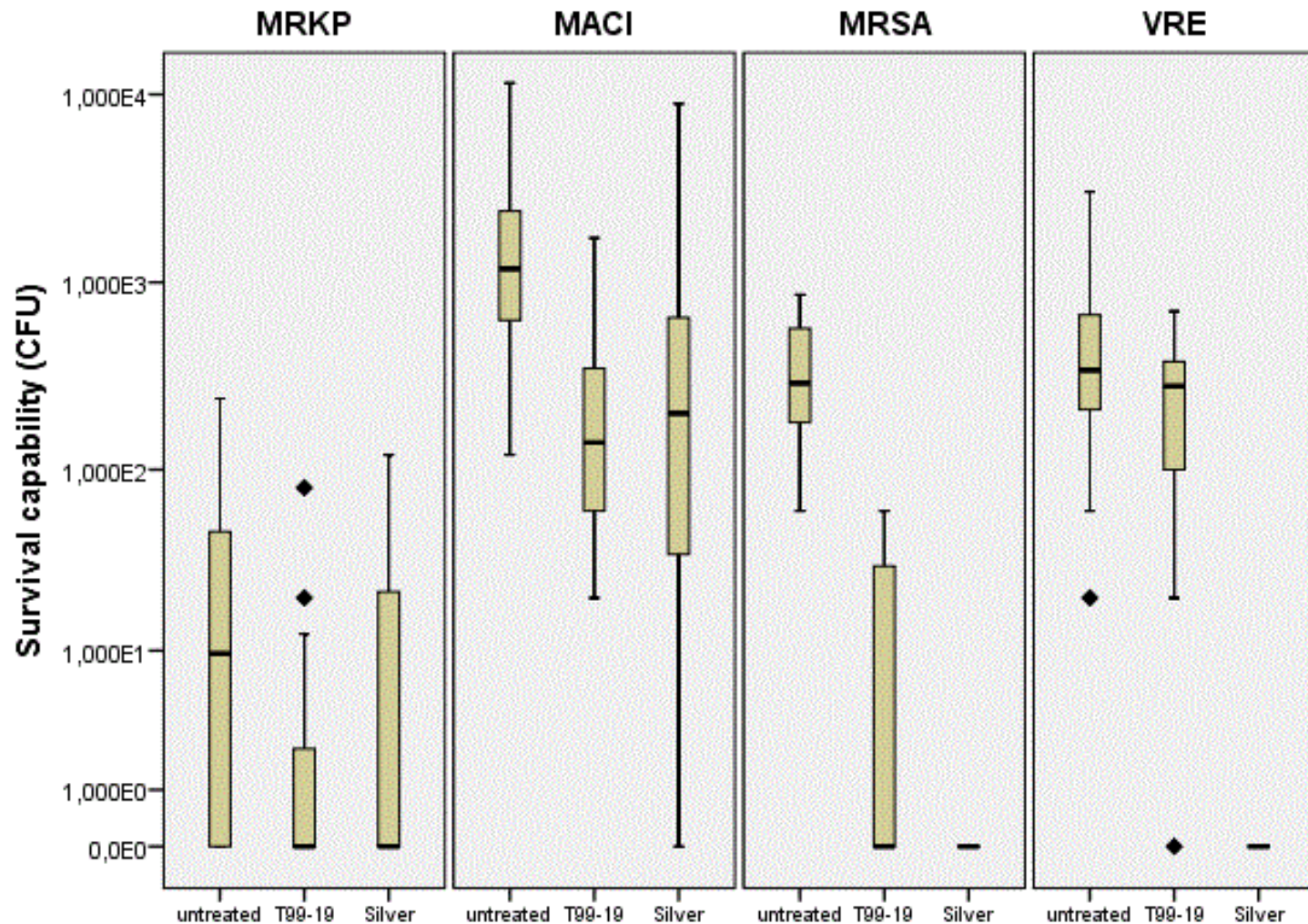
2,5*2,5 cm felület; $2 \cdot 10^5$ CFU
2-2 párhuzamos

- IBM SPSS Statistics Data Editor program:
 - One-Way ANOVA modell;
 - páros t-próba;
 - Pearson-féle korreláció.

Túlélőképesség (CFU) 1 óra inkubáció után



Túlélőképesség (CFU) 1 nap inkubáció után



Baktericid aktivitás mértéke

- $B = \log(\text{átlag CFU kontrolon}) - \log(\text{átlag CFU kezelt textilen})$

	Baktericid aktivitás mértéke			
	1 órás inkubáció		1 napos inkubáció	
	T99-19	Silver	T99-19	Silver
MRKP	0,61	0,44	0,55	0,33
MACI	0,83	0,59	0,91	0,77
MRSA	0,81	3,34	1,79	2,48
VRE	0,66	2,7	0,32	2,51

Baktericid aktivitás mértéke

- $B = \log(\text{átlag CFU kontrolon}) - \log(\text{átlag CFU kezelt textilen})$

	Baktericid aktivitás mértéke			
	1 órás inkubáció		1 napos inkubáció	
	T99-19	Silver	T99-19	Silver
MRKP	0,61	0,44	0,55	0,33
MACI	0,83	0,59	0,91	0,77
MRSA	0,81	3,34	1,79	2,48
VRE	0,66	2,7	0,32	2,51

szignifikáns hatás

Baktericid aktivitás mértéke

Baktericid hatás: $B > 2$

	Baktericid aktivitás mértéke			
	1 órás inkubáció		1 napos inkubáció	
	T99-19	Silver	T99-19	Silver
MRKP	0,61	0,44	0,55	0,33
MACI	0,83	0,59	0,91	0,77
MRSA	0,81	3,34	1,79	2,48
VRE	0,66	2,7	0,32	2,51

szignifikáns hatás

Konklúzió

- A vizsgált antimikrobiális textilek nem képesek az összes multidrog-rezisztens kórokozó elpusztítására, illetve túlélőképességének szignifikáns csökkentésére.
- Adataink felhívják a figyelmet a nosocomiális baktériumtörzsek használatának fontosságára az antimikrobiális szerek hatékonyságának tesztelése során.
- Vizsgálataink alapján nincs korreláció a MIC/MBC értékek és a felületi túlélőképesség között.

Egyéb

- Kötelező tárgyak teljesítve.
- FIDIFÓ előadás, 2015.11.24.
- Nosocomiális kórokozók túlélése kezeletlen és antimikrobiális kikészítésű textileken.
- 17th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, July 8-10, 2015.
- Silver-susceptibility of multidrug resistant nosocomial Gram-positive and Gram-negative pathogens.

Silver-susceptibility of multidrug resistant nosocomial Gram-positive and Gram-negative pathogens

Adrienn Hanczvikkel¹, Akos Tóth^{2,3}

¹Obuda University, Budapest, Hungary; ²National Center for Epidemiology, Budapest, Hungary;

³European Program for Public Health Microbiology Training (EUPHIM), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden.

Introduction

Surfaces contaminated with multidrug resistant bacteria contribute to the transmission of hospital pathogens and can be the source of nosocomial infections and outbreaks. According to investigations performed by ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), in European long-term care facilities 4.2 million patients were suffered from at least one HAII (Hospital Acquired Infection) in 2013.

Many types of antimicrobial finishing agents are available which are able to destroy the microorganisms on fabric, surface. Silver compounds belong to the most popular ones, because they are usually microbicidal at low concentrations without adverse effects for humans. Ag⁺ ions have multiple target sites within the bacterial cell:

- they attach to the cell membrane or envelope;
- go in the pathogen through transmembrane proteins;
- bind to thiol groups (SH) by an enzyme or ATP production, inactivation them to cause the death of cells;
- intercalate between the base pairs of DNA, disrupting the hydrogen bonding and denaturing the molecule.

Silver compounds are used to treat burns, wounds and ulcers, to coat medical medical devices to inhibit microbial colonization and biofilm development. In recent years silver is also routinely incorporated into a variety of personal products (deodorant, clothing, water filtration cartridges).

The relevant question is could the increasing and occasionally unnecessary use of silver lead to widespread resistance among nosocomial bacteria (described the clinical study)? Our goal was to investigate the silver susceptibility of the most important multidrug resistant nosocomial pathogens and the effect of continuous exposure to subinhibitory concentrations of silver ions.

Materials and methods

Strains

We examined 15 strains each of:

- VRE (i.e., vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*);
- MRSA (i.e., methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*);
- MDRK (i.e., multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*);
- multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*.

Diversity in genetic and type of the origin (surface, clinical samples) were the main considerations during the selection of strains collected from different areas of Hungary between 1998 and 2014.

MIC and MBC

Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values were determined for GINA AgNO₃ solution and Santidol T27-22 Silver liquid (20 mg/L Ag⁺ and 8 mg/L TCA) by broth microdilution method. We used IBM SPSS Statistics Data Editor and One-Way ANOVA models to perform the statistical tests.

Exposure to silver ions

In the case of two selected *Klebsiella pneumoniae* strains (OEK-3, OEK-4) passage experiments were performed by continuous exposure to increasing concentrations of AgNO₃ and Santidol T27-22 Silver liquid. OEK-3 strain belongs to the ST15 major international epidemic clone and produces CTX-M-15-type extended spectrum β -lactamase (ESBL). OEK-4 is a member of ST126-type ESBL-producing ST25 minor clone.

After the silver exposure we verified the ESBL-producing ability of the derivative strains.

The stability of the silver resistance is examined by subculturing the derivatives onto blood agar without silver. We measured the MIC value of the isolates after every fifth doubling.

Relative changes in the fitness of bacterial strains were determined in propagation assays. All strains were tested three times and the results were averaged. Area under curve (AUC) and apparent growth rates (AGR) were compared to compare the fitness of the isolates.

References

1. Hanczvikkel A, Tóth A. Silver-susceptibility of multidrug resistant nosocomial Gram-positive and Gram-negative pathogens. *Journal of Hospital Infection* 2015; 155: 1-8.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report of ECDC 2013. <http://ecdc.europa.eu/en/en/files/content/130912main.pdf>.
3. Hanczvikkel A, Tóth A. Silver-susceptibility of multidrug resistant nosocomial Gram-positive and Gram-negative pathogens. *Journal of Hospital Infection* 2015; 155: 1-8.

Results and conclusions

MIC and MBC

The Santidol T27-22 Silver liquid proved to be bactericidal regarding all examined pathogens, but Gram-negative strains can tolerate significantly (p<0.0001) higher concentrations than Gram-positive ones (Table 1). AgNO₃ was bactericidal against Gram-negative bacteria, this is consistent with other investigations. According to our results significantly lower concentration is needed from AgNO₃ solution than Santidol Silver liquid to inhibit the reproduction of the strains (p<0.0001) and to destroy 99.9% of the cells (p<0.0001).

Although the AgNO₃ MIC values of Gram-positive strains were similar to Gram-negative, the agent is proved to be bactericidal against 93% and 93% of MRSA and VRE strains, respectively. The investigation is in progress, but we already have found one VRE and one MRSA strain, whose MIC values are 800 and 1500 mg/L without any selection, respectively.

Exposure to silver ions

The OEK-3 derivative isolates had 64 times (from 7.81 to 500 mg/L) and more than 2540 times (from 3.22 to 8500 mg/L) higher MIC values than the parent strain in case of Santidol liquid and AgNO₃, respectively. It did not matter which silver content agent the strains was exposed to. Several studies have reported significant passage experiments to induce also resistance for Gram-negative bacteria, but to the best of our knowledge, no such increase of the AgNO₃ MIC value of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain has been described.

OEK-3 derivative isolates also retained their ESBL-production during induction of silver resistance. Moreover the silver resistance was stable. After 20 subculturing we did not find changes neither in the silver MIC values nor in the ESBL production.

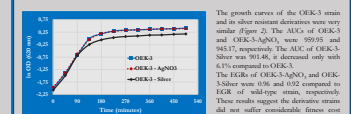


Figure 2. Growth curves of the OEK-3 strains and silver resistance derivative. The growth curves of the OEK-3 strain and its silver resistant derivative were very similar (Figure 2). The AUCs of OEK-3 and OEK-3-AgNO₃ were 99.95 and 98.57, respectively. The AUC of OEK-3-Silver was 90.48, a decreased only with 4.1% compared to OEK-3. The EGRs of OEK-3-AgNO₃ and OEK-3-Silver were 0.08 and 0.02 compared to EGR of wild-type strain, respectively. These results suggest the derivative strains did not suffer considerable fitness cost during developing of silver resistance.

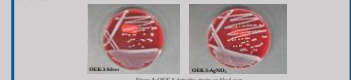


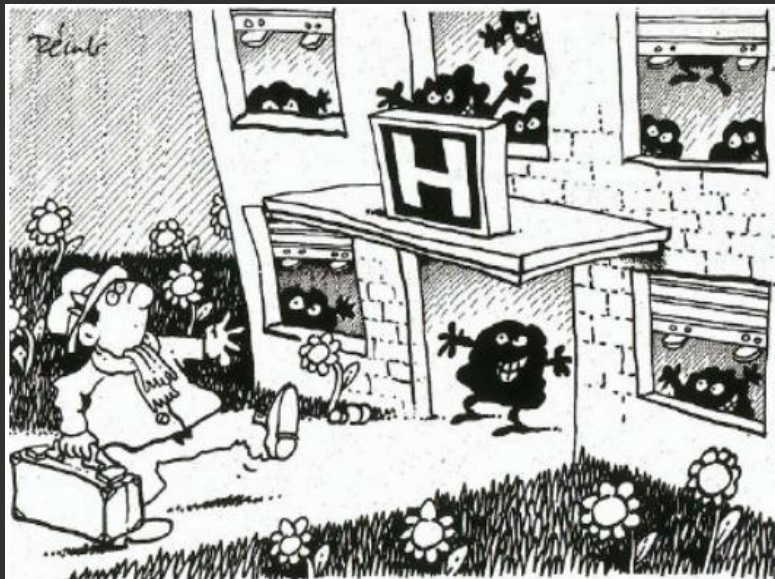
Figure 3. OEK-3 derivative strains on blood agar. During the passage experiments the MIC values of strain OEK-4 were not elevated. Based on whole genome DNA sequencing we know, the OEK-4 strain has plasmid-mediated silver resistance (E2 and Cargenes, which can encode Ag⁺ binding proteins and efflux transporters), while OEK-4 does not. This can explain the differences between the capacity of two strains to develop silver resistance.

According to our investigation performed so far, there exist multidrug resistant nosocomial pathogens in Hungarian hospitals, which are able to resist the effects of different silver compounds.

Acknowledgments

The authors wish to express their sincere thanks to Ágnes Visk, Zsuzsanna Csizmadia, Blanka Csizmadia for making excellent AgNO₃ standard and Santidol T27-22 Silver liquid samples. We are grateful to Dr. Mária Földi for providing the whole genome sequencing of the OEK-3 and OEK-4 strains.





Köszönöm
a figyelmet!

Budapest, 2016.01.20.