

Klinikailag fontos humán patogén anaerob baktériumok
diagnosztikája és antibiotikum rezisztencia vizsgálata

Zsoldiné Dr. Urbán Edit



Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar

Szeged
2019.

Tartalomjegyzék

1. Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke	3.
2. Bevezetés	4.
2.1. Anaerob baktériumok szerepe a humán mikrobiomban	
2.2. <i>Clostridioides (Clostridium) difficile</i>	4.
A <i>C. difficile</i> jellemző tulajdonságai, előfordulása, az infekció kialakulását elősegítő tényezők	4.
A <i>C. difficile</i> patogenitási tényezői	5.
A <i>C. difficile</i> törzsek típus meghatározásai	6.
2.3. A <i>Bacteroides/Parabacteroides</i> (genus) nemzetségek tagjainak fő jellemzői	6.
Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok és a surveillance fontossága	7.
2.4. A MALDI-TOF-MS módszer klinikai mikrobiológiai alkalmazása	7.
3. Célkitűzések	9.
4. Alkalmazott módszerek	10.
4.1. Vizsgálatok <i>C. difficile</i> törzsekkel	10.
A törzsek gyűjtése	10.
A törzsek tenyésztése	10.
Toxin kimutatási vizsgálatok	11.
BD GeneOhm Cdiff vizsgálat	11.
Ribotípusok meghatározása PCR módszerrel	11.
Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok	12.
4.2. Vizsgálatok a <i>Bacteroides/Parabacteroides</i> törzsek körében	12.
A baktériumok gyűjtése és fajok meghatározása	12.
Antimikrobiális szerek és a MIC értékek meghatározása	12.
A rezisztencia gének meghatározása PCR módszerekkel	13.
A <i>gyrA</i> gén szekvenálása	13.
A <i>bft</i> , <i>bfp1-4</i> és <i>fpn</i> gének meghatározása RT-PCR módszerrel	13.
4.3. MALDI-TOF módszer alkalmazása az anaerob baktériumok identifikálására	13.
A törzsek tenyésztése, tárolása	13.
Mintaelőkészítés és MALDI-TOF MS mérés kivitelezése	14.
16S rRNS gén szekvenálás az ellentmondásos izolátumok esetén	14.
<i>B. fragilis</i> <i>cfiA</i> Divízió I.-II.-be tartozó törzsek azonosítása	14.
<i>Cutibacterium acnes</i> törzsek tipizálása	14.
Multi Locus Szekvencia Tipizálás (MLST) analízis	14.
5. Eredmények és megbeszélés	15.
5.1. Vizsgálatok <i>C. difficile</i> törzsekkel	15.
5.2. Vizsgálatok a <i>Bacteroides/Parabacteroides</i> törzsek körében	20.
5.3. A MALDI-TOF MS alkalmazása a humán, klinikai eredetű anaerob baktériumok azonosításában	23.
7. Az értekezés legfőbb megállapításai	26.
8. Irodalomjegyzék	30.
9. Publikációs adatok	32.
9.1. Az értekezés alapját képező „ <i>in extenso</i> ” közlemények	32.
9.2. Tudományometriai összefoglaló táblázat	34.
10. Köszönetnyilvánítás	35.

1. Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke

AAD	Antibiotikum asszociált hasmenés
ATCC	American Type Culture Collection
BEXA	<i>Bacteroides</i> Exporter A
BFT	<i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxin
CCEY	Cefoxitin-cikloszerin egg yolk agar
CCFA	Cikloszerin-cefoxitin fruktóz agar
CDIs	<i>C. difficile</i> infekciók
CDT	<i>C. difficile</i> binary toxin
<i>cdtA</i>	<i>C. difficile</i> binary toxin enzimatis domént kódoló gén
<i>cdtB</i>	<i>C. difficile</i> binary toxin receptorkötő domént kódoló gén
CdtLoc	<i>C. difficile</i> binary toxin géneket hordozó lókus
CE	Kapilláris elektroforézis
CFU	Telepképző egység
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
CT	Konjugatív transzpozon
Da-kDa	Dalton-kilo-Dalton
DNS	Dezoxi-ribonukleinsav
ELFA	Enzimhez kötött immunfluoreszcencia vizsgálat
ESCMID	Európai Klinikai Mikrobiológiai és Infektológiai Társaság
ESGAI	ESCMID Anaerob fertőzések vizsgálati csoportja
ETBF	Enterotoxikus <i>Bacteroides fragilis</i>
EUCAST	Európai Antimikrobiális Érzékenységvizsgálati Bizottság
FAA	Fastidious Anaerobe Agar
GDH	Glutamát dehidrogenáz
HCCA	α -ciano-4-hidroxi fahéjsav
IC	Immun-kromatográfia
IgA	Immunglobulin A
IS	Inszerációs szekvencia
ISR	Kódoló gének által közrefogott szakaszok
MALDI-TOF-MS	Mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria
MATE	Multidrog és Toxikus Compound Extrusion
MDR	Multidrog rezisztens
MIC	Minimális gátló koncentráció
MLST	Multilókus Szekvencia Tipizáló Módszer
MSP	Fő tömegspektrum
NAP1	North American pulsed-field gel electrophoresis type 1
NFB	Nem-fragilis <i>Bacteroides</i> sp.
NPV	Negatív Prediktív Érték
PaLoc	Patogenitási sziget
PCR	Polimeráz láncreakció
PFGE	Pulzáttatott mezejű gélelektroforézis
PPV	Pozitív Preditív Érték
REA	Restrikciós endonukleáz analízis
RFLP	Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
rRNS	Riboszómális ribonukleinsav
ST	Szekvencia típus
SZTE ÁOK KMDI	Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet
<i>tcdA</i>	<i>C. difficile</i> A toxint kódoló gén
TcdA	<i>Clostridioides difficile</i> A toxin
<i>tcdB</i>	<i>Clostridioides difficile</i> B toxint kódoló gén
TcdB	<i>Clostridioides difficile</i> B toxin
VPI	Virginia Polytechnic Institute
WHO	Egészségügyi Világszervezet

2. Bevezetés

2.1. Anaerob baktériumok szerepe a humán mikrobiomban

A mikrobiomot alkotó fajok sokasága (diverzitás) és épsége/funkciója döntő szerepet játszik a gazdaszervezet egészséges homeosztázisának fenntartásában (Lederberg J. 2001). Tulajdonképpen a humán szervezet egy komplex biológiai „szuperorganizmus”-nak tekinthető, ahol a metabolikus szabályozás egy része átkerül a mikrobiológiai szimbionták felelősségébe (Kinross JM. *et al.* 2011). A mai kutatások alapján a humán bélflóra egészében a baktériumok több mint 99%-a obligát-, vagy fakultatív anaerob baktérium.

Az anaerob baktériumok, mint a mikrobiom domináns tagjai fontos szerepet töltenek be a nyálkahártyák ökológiai egyensúlyának fenntartásában, a szimbiózis révén. Fontos szerepük van a fiziológiás homeosztázis fenntartásában, egyes vitaminok termelése, az összetett poliszaccharidok emésztése, az immunológiai környezet befolyásolása, a normál nyálkahártya immunitás kialakítása, az IgA termelés indukálása révén. Jelentőségük van az epiteliális barrier kialakításában az epiteliális sejtek proliferációjára és differenciálódására való hatással (Börning D. *et al.* 2013). Fontosak a gasztrointesztinális patogén kórokozók elleni védelemben, szükségesek az egészséges élet fenntartásához, azonban, ha ez az ökológiai egyensúly valamilyen okból felborul, számos esetben felelősek lehetnek súlyos, gyakran az életet veszélyeztető infekciók kialakulásáért (Wallace TC. *et al.* 2011).

Az anaerob baktériumok által okozott fertőzések laboratóriumi diagnosztikája egyike a rutin bakteriológiai vizsgálatok legmunkaigényesebb és legidőigényesebb területeinek. Az anaerob baktériumok igen sokféle, súlyos, gyakorlatilag bármely testtáját érintő infekciót okozhatnak, melyek fő jellemzői a tályogképződés, a szöveti nekrozis.

2.2. *Clostridioides (Clostridium) difficile*

Bár az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organisation; WHO) jelentései alapján az 1980-as évektől a kórházi környezetben leggyakrabban előforduló enterális patogénként tartják számon a toxintermelő *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) törzseket, az általuk okozott infekciók csak a 2000-es évek közepétől, a több földrészre terjedő járványos előfordulásuk után kerültek az érdeklődés előterébe.

2016-ban a speciest a 16S rRNS gén szekvencia analízise alapján reklasszifikálták (Lawson PA. *et al.* 2016), a fenotípusos, kemotaxonomiai és filogenetikai vizsgálatok alapján a species új genusba, a *Clostridioides gen. nov.* került, mint *Clostridioides difficile gen. nov. comb. nov.* A *C. difficile* által okozott fertőzések (*Clostridioides difficile* Infections: CDIs) előfordulásában és súlyosságában drámai növekedés figyelhető meg világszerte az elmúlt két évtizedben, ami főként az úgynevezett NAP1/BI/027 epidémiás törzs elterjedésével függ össze (Rupnik M. *et al.* 2009).

A *C. difficile* jellemző tulajdonságai, előfordulása, az infekció kialakulását elősegítő tényezők

A *C. difficile* obligát anaerob spóráképző, Gram-pozitív, egyenes láncba rendeződött nagy pálca, mérete változó: hossza 3 µm-től a 16 µm-ig is terjedhet, szélessége elérheti a 1,9 µm-t. A *C. difficile* spórái kimutathatóak a talajban, a felszíni- és szennyvizekben, a porban, igen gyakori a környezetben (Al Shaif N., Brazier JS. 1996). A felnőtt emberi szervezetben a bél mikrobiom tagjaként van jelen, azonban az egészséges mikrobiom egyensúlyának felbomlása elősegíti a toxin-termelő törzsek túlszaporodását, ezt az állapotot számos tényező elősegítheti, ami a bélflórát károsítja: úgymint antibiotikum kezelés, proton pumpa inhibitorok szedése, kemoterápia, stb.

A toxin-termelő *C. difficile* patogén szerepének tisztázása óta ezt tekintik a legfontosabb enteropatogén kórokozónak az antibiotikumok okozta hasmenésben (AAD): felelős ezek 10–25%-áért és szinte valamennyi pseudomembranosus colitis kialakulásáért. Az AAD kialakulásában szerepet játszó egyéni tényezők közé a 65 évesnél idősebb kor, az

immunszuppresszió, az intenzív osztályos kezelés és a tartós hospitalizáció tartoznak (Bagdasarian N. *et al.* 2015). Az antibiotikumok okozta hasmenés klinikai képe az enyhe hasmenéstől a fulmináns pseudomembranosus colitisig terjedhet, súlyos, esetleg letális kimenetelű szövődményei a toxikus megakolon, a perforáció és a sokk.

A toxintermelő *C. difficile* törzsek által okozott nozokómiális fertőzések kialakulásának két útja lehetséges: a kórházi ápolás során antibiotikum és/vagy kemoterápiás kezelés miatt a betegnél sérül a normál bélflóra egyensúlya, amely lehetővé teszi az endogén toxin-termelő *C. difficile* törzsek elszaporodását. A másik út a kórházi ápolás során, vagy idősök otthonában a leromlott fizikai állapotú, valamilyen alapbetegségben szenvedő, idős, vagy károsodott immunrendszerű beteg a kórházban perzisztáló, székletszórás útján terjedő *C. difficile* törzsekkel fertőződik (Lamont JT. *et al.* 2018). Súlyos vagy elhúzódó hasmenések esetén a cél a *C. difficile* okozta fertőzések diagnosztizálása: a diagnózis elsősorban az A és/vagy a B toxin közvetlenül a székletből történő kimutatásán alapszik, melyre a nemzetközi-hazai ajánlásokat figyelembe véve különböző diagnosztikai módszereket alkalmazhatunk (Urbán E. 2015; Crobach MJ. *et al.* 2016).

A *C. difficile* patogenitási tényezői

A *C. difficile* törzsek enterális infekciókban játszott humán patogén képességét elsősorban a toxin termelésük okozza. A baktériumok által termelt toxinok exotoxinok, fehérje természetűek, a baktériumok a stacioner fázisban termelik, hőre érzékenyek, a proteolitikus enzimek többségüket elbontják és hatásukra a szervezetben ellenanyagok termelődnek.

A *C. difficile* törzsek különböző toxinokat termelhetnek: A toxin (TcdA); B toxin (TcdB) és aktin-specifikus adenozin-difoszfát (ADP) riboziltranszferáz („binary toxin”) (CDT).

Az A és B toxinok biológiai aktivitások széles spektrumával rendelkeznek, amelyek hozzájárulnak a CDI tüneteikhez. Az A és B toxin ugyanazon mechanizmus alapján fejt ki hatását, mindkét toxin receptor-mediálta endocitózis révén jut be a sejtekbe. A két toxin közti különbség a sejtekhez való kötődésükben van: a B toxin 1000-szer erősebb toxin, mint az A, mivel több a toxin specifikus receptor sűrűsége a sejten. Bár a TcdB jóval hatékonyabb, mint a TcdA, mindkettő citotoxikus a legtöbb tenyésztett sejtre, ahol a kaszpáz-függő apoptózist kiváltja. **A toxin (TcdA):** 308 kDa molekulatömegű fehérje, melynek az elsődleges klinikai tünetek kiváltásában van szerepe. Az A toxin potens enterotoxin, de citotoxikus hatása is bizonyított, hatáserőssége a koleratoxin szintjét éri el (eltérő mechanizmussal) és extenzív epiteliális károsodást okoz a kolonban. **B toxin (TcdB):** 269 kDa molekulatömegű fehérje, amely a citotoxikus hatásért felelős. A B toxin a sejtváz pusztulását okozza, a sejtek lekerekednek, majd bekövetkezik a sejtek pusztulása. A B toxin nem okoz enterotoxikus hatást és az ép epitéliumot sem károsítja, csak az A toxin okozta destrukció után lép működésbe, az A-toxinnal szemben folyadék akkumulációt nem okoz. **Aktin-specifikus ADP riboziltranszferáz (binary toxin: CDT):** a célsejt aktin citoszkeletont károsítva a sejt pusztulását okozza. A toxin az ún. A-B toxintípusba sorolható szerkezet és funkció alapján, két részből áll: egy 48 kDa molekulatömegű enzimatis régióból (cdtA) és egy 94 kDa molekulatömegű kötő ún. binding régióból (cdtB). A binary toxin citotoxikus aktivitása *in vitro* bizonyított: a CDT által módosított aktin károsítja az aktin citoszkeletont, és citopátiás hatást eredményez a sejtvonalon (Sundryal *et al.* 2010). A TcdA és TcdB-vel ellentétben, a binary toxin kódoló cdtA és cdtB gének nem a PaLoc-ban lokalizálódnak, hanem az ún. binary toxin lókuszon (CdtLoc).

Az A és B toxinokat kódoló gének egy 19,6 kb nagyságú patogenitási szigeten, az ún. PaLoc régióban helyezkednek el, a legtöbb törzsből a PaLoc a kromoszóma azonos régióján lokalizálódik. Az A és B toxint nem termelő törzseknél a PaLoc régió nincs jelen. A toxinok mellett számos egyéb tényező, így tok, kemotaxis, adhézio, illetve a különböző hidrolitikus enzimek (hialuronidáz, zselatináz, kollagenáz, heparináz) is jelentős szerepet játszhatnak a baktérium patogenitásában.

A *C. difficile* törzsek típus meghatározásai

A restrikciós endonukleáz analízis (Restriction Endonuclease Analysis: REA) alapján BI típusú, a pulzáltatott mezejű gél elektroforézis (Pulsed-field Gel Electrophoresis: PFGE) NAP1 (North-American pulsed-field gel electrophoresis type 1) típusú és a polimeráz láncreakció (PCR) 027-es ribotípusú (RT) (BI/NAP1/027) *C. difficile* törzs (továbbiakban: 027-es ribotípus) által okozott nagy kiterjedésű járványokkal a törzsek molekuláris tipizálása is egyre nagyobb hangsúlyt kapott. *In vitro* vizsgálatban az epidémiás 027-es PCR-ribotípusú törzsek 16-szor több toxin A-t és 23-szor több toxin B-t termelt, mint más ribotípusú *C. difficile* törzsek. A 027 PCR-ribotípusú törzsek szelektálódása elsősorban a fluorokinolonok széles körű alkalmazásával hozható összefüggésbe, körükben a fluorokinolon-rezisztencia előfordulása nagyobb arányú (Kuijper EJ. *et al.* 2006). A tipizálási módszerek segítségével követhetjük a *C. difficile* által okozott infekciókat, elkülöníthetjük a sporadikus eseteket és a járványokat, adatokat kaphatunk az egyes törzsek regionális vagy globális terjedéséről, követhető egy-egy virulensebb törzs cirkulációja.

Az elmúlt években számos molekuláris tipizálási módszer terjedt el a törzsek típusának meghatározására. Európában a PCR ribotipizálás terjedt el: a módszer a 16S és 23S rRNS-t kódoló gének által közrefogott ISR (Intergenic Spacer Region) szakaszok amplifikálásán és a keletkezett PCR fragmentumok gélelektroforézissel történő szétválasztásán és detektálásán alapszik. A képződött termékek mérete és száma törzsenként eltér, az egyedi mintázat lehetőséget biztosít a törzsek epidemiológiai célból történő vizsgálatára. A PCR termékek detektálására korábban speciális agaróz gél futtatást alkalmaztak, ma már a módszer jobb reprodukálhatóságát és az eredmények könnyebb kiértékelhetőségét speciális kapilláris gélelektroforézis (CE) biztosíthatja.

2.3. A *Bacteroides/Parabacteroides* (genus) nemzetségek tagjainak fő jellemzői

A humán bél mikrobiom több ezer különböző baktériumfajból áll, amelynek kb. 99,9%-a obligát anaerob baktérium (Xu J. és Gordon JL. 2003) és ezek igen jelentős hányada a *Bacteroidetes* phylumba (főként: *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides* és *Prevotella*) tartozik (Wexler AG., Goodman AL. 2017). A modern metagenomikai vizsgálatok a *Bacteroidetes* és *Firmicutes* fajok intesztinális mikrobiomban való dominanciáját erősítették meg (Könnönen E. *et al.* 2011).

A *Bacteroides/Parabacteroides* genusokba tartozó speciesek obligát anaerob, epe-rezisztens, spórát nem képző Gram negatív pálcák. A *Bacteroidaceae* családon belül a *Bacteroides/Parabacteroides* nemzetségekbe tartozó fajok elkülöníthetőek a jellegzetes DNS guanin-citozin összetételük (40-48 mol%) alapján. Taxonómiájuk az elmúlt évtizedekben igen jelentős változásokon ment keresztül, az ide sorolt speciesek száma -köszönhetően az új, molekuláris diagnosztikai eljárásoknak- jelenleg is állandóan változó, a *Bacteroides/Parabacteroides* genusokon belül >50 (Garett WS., Onderdonk AB. 2015).

A *Bacteroides/Parabacteroides* nemzetségekbe tartozó fajok tagjainak számos élettani hatásuk van a táplálkozásban: az epesavak lebontása, vitaminok termelése, az emésztetlen tápanyagok tovább bontása, felszívhatóvá tétele révén. Szerepet játszanak az immunrendszer érése során: a Peyer-plakkok és intesztinális immunitás indukálása, illetve a tápcsatorna más szervrendszerekre való közvetett kihatásában (Wexler AG. 2017). Jelentős élettani szerepük mellett, mint opportunistáknak képesek a bélből kijutva súlyos fertőzéseket is okozni, az általuk okozott infekciók általában polimikrobiálisak, melyekben fakultatív- és obligát anaerob baktériumok együttesen mutathatók ki. A bél mikrobiomban nagyszámban jelenlévő *Bacteroides/Parabacteroides* fajok okozzák az anaerob baktériumok által okozott humán infekciók 50-60%-át.

A *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek virulencia faktorai három csoportba sorolhatóak: melyek szerepet játszanak (i) a szöveti adherenciában, (ii) a gazdaszervezet immunrendszere elleni védekezésben (oxigén toxicitás és fagocitózis) és (iii) a szövetek destrukciójában. A *B. fragilis* egyik fontos patogenitási tényezője az enterotoxin (BFT), egy cink metalloproteáz termelése (Kling JJ. *et al.* 1997; Moncrief JS. *et al.* 1995; Claros MC. *et*

al. 2006), mely az intesztinális epitéliumban a zonula adherensek szoros illeszkedéseit (tight junction) károsítja az E-cadherin hasításával, mely az epitéliális sejtek aktin-citoszkeleton átrendeződését és a „tight junction”-ok károsodását eredményezi. Ezen a barrieren rés keletkezik, így hasmenés alakul ki. A BFT-t az úgynevezett enterotoxigenikus *B. fragilis* (ETBF) törzsek szekretálják, melyek a három BFT izotípust eltérő *bft* locuson kódolják, melyek egy 6-kb nagyságú genom szegmensén helyezkednek el (Sears CL. 2001). A BFT a ciklooxygenáz-2-termelését és a folyadék szekrécióját indukálja a bél epitélsejtjeiben (Kim JM. *et al.* 2006), egyes újabb kutatások szerint a BFT lehetséges karcinogén szerepet tölt be a vastagbélrákban (Toprak NU. *et al.* 2006; Chung L. *et al.* 2018).

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok és a surveillance fontossága

A *Bacteroides/Parabacteroides* fajok rendelkeznek a legmagasabb rezisztencia-szintekkel és a legtöbb antibiotikum rezisztencia-mechanizmussal az összes anaerob kórokozó faj közül. Az anaerob-ellenes antibiotikumok száma eléggé korlátozott: cefamycinek (pl. cefoxitin), β -laktám/ β -laktamáz gátló kombinációk, karbapenemek, 5-nitroimidazolok, clindamycin, egyes makrolidok, tetracyclinek, tigecyclin, chloramphenicol, fluorokinolonok. Egészen az elmúlt évtizedekig az anaerob baktériumok terápiája nem jelentett gondot, azonban egyre több közlemény számol be az anaerob baktériumok fokozódó rezisztenciájáról a különböző anti-anaerob szerekekkel szemben. A *Bacteroides* fajok potenciálisan rezisztensek lehetnek az antibiotikumok széles körére, és az adott antimikrobiális rezisztencia nagymértékben eltérhet a földrajzi helyek és az adott intézmények között, így néhány, a múltban gyakran használt antibiotikum-terápia már nem alkalmazható az empirikus kezelés során. A rezisztencia mértéke a *Bacteroides/Parabacteroides* csoport különböző fajai között is változhat.

Egyre több közlemény számol be -a ma még sporadikus előfordulását- multi-drug-rezisztens (MDR) *Bacteroides* spp. törzsek megjelenéséről, ami a kezelés átgondolásának szükségességét veti fel (Boyanova L. *et al.* 2015; Husain F. *et al.* 2013; CDC Morbidity and Mortality Weekly Report 2013; Hartmeyer GN. *et al.* 2012; Katsandri A. *et al.* 2006; Nakamura I. *et al.* 2017). Ezek a közlemények, az epidemiológiai adatok azt sugallják, hogy a klinikusoknak nem szabad kizárólag a nemzetközi felmérésekből származó kumulatív érzékenységi adatokra támaszkodniuk a betegek kezelése során, ismerniük kell a helyi rezisztencia viszonyokat és figyelembe kell venniük a minimális gátló koncentráció (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) értékek meghatározásán alapuló érzékenységi vizsgálatot a súlyos fertőzések kezelésében.

2.4. A mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight-Mass Spectroscopy: MALDI-TOF-MS) módszer klinikai mikrobiológiai alkalmazása

A rutin klinikai bakteriológiai diagnosztikai laboratóriumok számára elsődleges fontosságú a kitenyészett baktériumok fajsztípusú azonosítása (identifikálás). Ez kétféle megközelítéssel lehetséges: a fenotípusos jellemzőkön alapuló identifikálás során a baktériumtörzs fenotípusos (pl. morfológiai, citológiai, biokémiai, fiziológiai) tulajdonságait határozzuk meg, amelyek az adott baktériumtörzs génjei által kódolt tulajdonságok megnyilvánulásával jönnek létre. A genotípus meghatározásán alapuló módszerek során a baktérium genotípusát egyértelműen meghatározó, a genomot felépítő nukleinsavak szekvenciáját határozzuk meg, amely stabil, a környezettől független állandó jellemző.

A tömegspektrometria (Mass Spectrometry: MS) olyan kémiai/biokémiai analitikai módszer, amely a vizsgálandó anyagminta atomjainak vagy molekuláinak ionizációját követően a keletkező kisebb-nagyobb vegyületeket töltésegységre eső tömegük (mass to charge [m/z]) szerint elválasztja. Az eredmény a keletkező ionokat jelző csúcsokból álló tömegspektrum, amelyben egy-egy csúcs egy adott m/z fajlagos tömegű ionizált molekulát jelez, a csúcsok magassága pedig arányos az adott molekula mennyiségével.

A mikrobák jellegzetes, a taxonra jellemző fehérjeprofíllal rendelkeznek, így a MALDI-TOF MS-vizsgálat során keletkező tömegspektrum egy adott mikrobafajra (species), illetve nemzetségre (genus) jellemző. Az azonosítására használt módszer a mikrobák konzervált, riboszómális (és bizonyos esetekben egyéb, transzlációs és transzkripció) proteinjeinek analízisén alapulnak, kihasználva azt a tényt, hogy ezek a fehérjék nagy mennyiségben találhatóak meg a sejtekben. A mért fehérjeprofíll, illetve tömegspektrum azonosítása egy már meglévő adatbázishoz történő hasonlítás útján megy végbe. Az azonosítható mikrobák köre elsősorban az adatbázisban található referenciaspektrumok számától függ, annak bővítésével a módszer egyre többféle mikroba azonosítására tehető alkalmassá.

Az anaerob baktériumok species szinten történő identifikálásában számos előnnyel jár ez a módszer (Nagy E., Schuetz A. 2018). A hagyományos biokémiai próbákon alapuló identifikálás ezen baktériumok esetében akár 5–7 napig is eltarthat, vagy csak a 16S rRNS gén szekvenálása ad pontos, végleges eredményt. A MALDI-TOF MS-módszer előnye ebben az esetben az, hogy a vegyes tenyészetben jelenlévő, de izolált telepek is alkalmasak lehetnek akár a tenyészetből közvetlenül történő (“direkt”) species identifikálásra, másik előnye a megtakarított idő, mivel az adott baktériumtörzs azonosítása kevesebb, mint egy óra alatt végezhető el.

Bizonyos esetekben a tömegspektrum alapján lehetőség van virulens és kevésbé virulens patotípusok elkülönítésére is. Az azonos speciesbe tartozó izolátumok MS csúcsai közötti különbségek melyeket a MALDI-TOF mérések láthatóvá tesznek lehetőséget ad a néhány mikroorganizmus esetében a gyors és pontos szubtípus elkülönítésre is.

A módszer ígéretesnek mutatkozik a mind a klinikusok, mind a mikrobiológusok számára sok problémát okozó *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes* patogén szerepének, illetve kontamináns szerepének eldöntésére egy adott klinikai helyzetben. Az újabb, molekuláris alapokon nyugvó kutatások összefüggést találtak a baktérium egyes filotípusai és a patogenitásban betöltött szerepe között.

A *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek karbapenem rezisztenciájának kimutatását is elvégezhetjük a módszer alkalmazásával: a *B. fragilis* populáció két genetikailag és fenotípusosan meghatározott alcsoportra oszlik (Divízió I és II), amelyekben a DNS-DNS homológia szintek és a konstitutív gének szekvenciái is eltérnek, és bizonyos gének előfordulása más és más. Így a Divízió I a cefalosporinázt kódoló *cepA* gént, míg a Divízió II a karbapenemázt kódoló *cfiA* gént hordozza kizárólagosan, a genetikai különbség megmutatkozik a MALDI-TOF-MS-profilokban is, így a karbapenemázt termelő Divízió II-es törzseket is felismerhetjük (Nagy E. et al. 2011).

3. Céltűzések

Az értekezésben szereplő kísérletes klinikai-epidemiológiai vizsgálatok közös vonása az, hogy a legfontosabb, a klinikai mikrobiológiai diagnosztikai laboratóriumokban leggyakrabban izolált humán patogén anaerob baktériumok által okozott kórfolyamatok esetében a molekuláris diagnosztika eszközeivel, valamint *in vitro* körülmények között vizsgáltuk e kórokozók európai-magyarországi elterjedésének jellemzőit, antibiotikum érzékenységi viszonyainak alakulását, a főbb rezisztencia-, illetve egyes patogenitásért felelős gének előfordulását. Vizsgálatainkat az alábbi három tématerületen végeztük: a *C. difficile* törzsek toxin-termelésének, epidemiológiájának és antibiotikum érzékenységének vizsgálatait; a *Bacteroides/Parabacteroides* csoportba tartozó törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálatait, egyes rezisztencia mechanizmusokért és patogenitási tényezőkért felelős génjeinek kimutatása és az új diagnosztikai módszer, a MALDI-TOF MS alkalmazhatósága a humán klinikai anaerob izolátumok species szinten történő identifikálására, egyes fajok esetében típusmeghatározására.

Ezen tématerületeken belül közvetlen célkitűzéseinket az alábbiakban részletezem:

A *C. difficile* törzsek vizsgálatai során célul tűztük ki, hogy

- mivel Magyarországon a *C. difficile* törzsek molekuláris jellemzése eddig még nem történt meg, irodalmi adatok alapján összeállított, saját „home-made” PCR módszerekkel vizsgáljuk a hasmenéses székletmintákból gyűjtött izolátumok esetében a toxinok (így a binary toxin is) termeléséért felelős *cdtA*, *cdtB*, *tcdA* és *tcdB* gének jelenlétét, az A toxin gén 3'-végében lévő deléciót, vagy inszerciót.
- összehasonlítsuk a kereskedelmi forgalomba bevezetett, új molekuláris diagnosztikai módszer eredményeit a “gold standard”-ként használt szövettényészet citotoxicitási vizsgálatának és a kereskedelembe beszerezhető enzimhez kötött immunfluoreszcencia vizsgálattal (ELFA) az A és B toxinok közvetlen kimutatására hasmenéses székletmintákból.
- tanulmányozzuk molekuláris diagnosztikai vizsgálatok segítségével Magyarország egyes különböző részeiből származó *C. difficile* izolátumok PCR ribotípusainak megoszlását, térbeli- és az elmúlt húsz évben az időbeli változását, az adatainkat összevetjük a publikált nemzetközi adatokkal.
- vizsgáljuk a magyarországi *C. difficile* törzsek antibiotikum érzékenységét, ennek időbeli változását, illetve vizsgáljuk a hasmenéses székletmintákból izolált törzsek érzékenységét az újonnan bevezetett antibiotikummal a fidaxomicinnel szemben.
- saját 10 éves beteganyagunkban megvizsgáljuk az extraintesztinális *C. difficile* fertőzések epidemiológiáját.

***Bacteroides/Parabacteroides* csoportba tartozó törzsek körében végzett vizsgálatok során célul tűztük ki, hogy**

- kivitelezünk egy európai szintű antibiotikum érzékenységi vizsgálatot standardizált módon, több országból gyűjtött *Bacteroides/Parabacteroides* izolátumok esetén, ahol vizsgáljuk a különböző fajok antibiotikum-érzékenységét: ezt összehasonlítjuk a CLSI (Clinical Laboratory Institute) illetve az EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) határértékeit alkalmazva, keressük a fajok- és a régiók közötti különbségeket és nyomonkövetjük, vizsgáljuk a rezisztencia-arányok alakulását európai szinten az elmúlt 20 évben.
- vizsgáljuk a Magyarország különböző területeiről származó 400, klinikailag releváns *Bacteroides/Parabacteroides* csoportba tartozó izolátum antibiotikum érzékenységi viszonyait, majd az adatainkat összehasonlítjuk az előző hazai, illetve a nemzetközi adatokkal.
- a magyarországi gyűjteményünkből származó klinikailag jelentős multirezisztens (MDR) *Bacteroides/Parabacteroides* izolátumok antibiotikum rezisztenciáját vizsgáltuk a prevalencia, a genetikai kifejeződés mikéntje és a hordozó genetikai elemek jelenléte szempontjából.
- meghatározzuk a hazai *Bacteroides/Parabacteroides* izolátumok multi-drog efflux transzporter fehérje termeléséért felelős gén (*bexA*) jelenlétét.
- meghatározzuk a *B. fragilis* törzsek enterotoxin gén (*bft*) hordozásának arányát, jellemezzük ezek izotípusait, valamint a C10 és C11 cisztein proteáz géneket (*bfp1-4*, *fpn*) majd összehasonlítottuk adatainkat az előző hazai, illetve a nemzetközi adatokkal.

A MALDI-TOF MS alkalmazása során az anaerob baktériumok diagnosztikájában, célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk:

- a klinikailag releváns mintákból nyert anaerob izolátumok milyen arányban azonosíthatók a fajok vagy nemzetségek szintjén a MALDI-TOF MS-módszerrel, a klasszikus biokémiai tesztekkel ugyanazon izolátumok esetén el lehet-e fogadni az eredményeket, a 16S rRNS gén szekvenálással meg lehet-e erősíteni az eltérő eredmények esetében a MALDI-TOF módszer fajmeghatározását.

- a MALDI-TOF MS profilok alkalmazhatóságát a különböző, *Bacteroides/Parabacteroides* csoportba tartozó izolátumok species szintű identifikálására, így a MALDI-TOF MS módszer esetén egy mások számára is jól alkalmazható adatbázist hozunk létre ezen leggyakrabban izolált anaerob baktérium csoport fajai között.
- a rutin, klinikai mikrobiológiai diagnosztikában alkalmas-e a MALDI-TOF MS a filogenetikailag két különböző csoportot alkotó *B. fragilis* izolátumok elkülönítésére, melyek hordozzák a karbapenem rezisztenciáért felelős *cfiA* gént azoktól a törzsektől, amelyek nem (a Divízió I és II).
- értékeljük az MS-alapú tipizálási módszer eredményességét a humán kórfolyamatokból izolált és a kontamináns *Cutibacterium (C.) acnes* törzsek esetén, összehasonlítva az MLST módszerrel.

4. Alkalmazott módszerek

Vizsgálatok *C. difficile* törzsekkel

A törzsek gyűjtése

A SZTE ÁOK KMDI-be beérkezett hasmenéses székletmintákból izolált, valamint a vizsgálatok kivitelezése alatt még az Intézetben működő Humán Patogén Anaerob Baktériumok Országos Referencia Laboratóriumába az ország különböző régióiból, különböző laboratóriumokból beküldött székletmintákból izolált *C. difficile* törzsek vizsgálata történt meg: egyrészt a toxinok termeléséért felelős gének kimutatása, másrészt a törzsek ribotipizálása, illetve az antibiotikum érzékenységük meghatározása. A hasmenést okozó ribotípusok magyarországi elterjedésének-ribotípus váltásának epidemiológiai vizsgálatait saját munkacsoportunk 1998-ban, 2002-2004 között, 2006-2007 között, 2010-ben, 2014-ben és 2018-ban végezte el, míg a 2011 és 2015 közötti időszakban évente törzsgyűjtéssel csatlakoztunk egy-egy páneurópai vizsgálathoz.

A törzsek tenyésztése

A friss/fagyasztott hasmenéses székletmintákból a *C. difficile* szelektív tenyésztését CCFA (Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar, Oxoid, Basingstoke, UK) és/vagy Brazier CCEY (Cefoxitin/Cycloserine Egg Yolk, Mast Diagnostics, Bootle, UK) agaron végeztük el, anaerob kamrában (85% N₂, 10% CO₂, 5% H₂; Bactron; Sheldon Man. Inc. USA) 24-48 órán át 37°C-on. A törzsek azonosítása a Wadsworth Manual alapján hagyományos biokémiai módszerekkel (Jousimies-Somer HR *et al.* 2002), API ANA (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Fr), illetve MALDI-TOF (Bruker Daltonik Bréma, Gr.) módszerrel történt.

Toxin kimutatási vizsgálatok

Az izolált törzsek **citotoxicitás** vizsgálatát HeLa sejtvonal alkalmazásával végeztük. A szűrt baktérium tenyészet felülúszóinak egyrészt az eredeti hígítatlan alikvotját (20 µl) vittük rá a HeLa sejtvonalra, illetve a tízszeres hígításait (10⁻¹-10⁻⁴) beoltottuk a lyukakba, és inkubálás után (37°C-on 5% CO₂-on 24 órán át) a citotoxikus hatást vizsgáltuk. **Gyári módszerek:** a mind a székletből történő közvetlen toxin vizsgálatokat, mind a kitenyésztett törzsből végzett toxin vizsgálatokat VIDAS *C. difficile* Tox A/B (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Fr) ELFA módszerrel, illetve 2010 után a *C. diff* QIUK CHEK Complete (Techlab, Blacksburg, VA, USA) A/B toxinok és a specifikus glutamát dehidrogenáz (GDH) egyidejű kimutatására alkalmas immunkromatográfiás módszerrel végeztük el a gyártók előírásának megfelelően.

A főbb toxin gének, a binary toxin gén és a *tcdC* gén PCR vizsgálata („home-made” módszer)

Az adott *C. difficile* törzs egyetlen telepét szuszpendáltuk TES pufferben (50 mM Tris-hidroklorid [pH 8,0], 5 mM etilén-diamin-tetraecetsav: EDTA, 50 mM NaCl), és a szuszpenziót 95°C-on 10 percig melegítettük, majd 15,300 g fordulatszámon centrifugáltuk 5 percig. Az NK2 és az NK3 primerek az A toxin gén nem ismétlődő szekvenciájához, míg az

NK104 és az NK105 a B toxin gén szekvenciájához vannak tervezve. Az NK9 és NK11 primerek az A toxin gén ismétlődő szekvenciájához vannak tervezve; hogy detektáljuk az A toxin gén 3' végét érintő deléciókat. A PCR reakciókörülmények az irodalmi adatok alapján állítottuk össze (Kato N. *et al.* 1991; Kato H. *et al.* 1998; Stubbs S. *et al.* 2000). A PCR-termékeket 0,8-1,5% agarózgélben vizualizáltuk. A géleket UV fényben Kodak digitális fényképezőgéppel fényképeztük, és a Kodak 1D 3.5 szoftverrel elemeztük. A *tcdC* gén szegmensét C1 és C2 primerek segítségével amplifikáltuk (Spigaglia P., Mastrantonio P. 2002).

BD GeneOhm Cdiff vizsgálat

A BD GeneOhm Cdiff módszer gyors, gyári molekuláris diagnosztikai eljárás a *C. difficile* B toxin gén (*tcdB*) kvalitatív kimutatására hasmenéses székletmintákból. A teszt a *tcdB* gén amplifikációján és az amplifikált DNS kimutatásán alapul fluorofor festékkel jelölt próbákkal. A kapott PCR eredmények kiértékelését a SmartCycler készülék (Cepheid, Sunnyvale, CA. USA) automatikusan végzi. A BD GeneOhm Cdiff vizsgálatot a gyártó (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) utasításai szerint végeztük.

Ribotípusok meghatározása PCR módszerrel

A tenyésztési körülmények és a DNS kivonása

A PCR-ribotípusok meghatározásához a törzseket Fastidious Anaerobe Agar-on (FAA) (LabM, Heywood, Lancashire, UK) tenyésztettük; a lemezeket 37° C-on inkubáltuk 24 órán át anaerob körülmények között. A sejteket 5%-os (w/v) Chelex-100 (Bio-Rad, Hercules, Cal., USA) oldatban reszuszpendáltuk. A szuszpenziót 95°C-on 12 percig inkubáltuk, majd 15,000 g fordulatszámon 10 percig centrifugáltuk. A PCR reakciókat az irodalomban közölt adatok alapján állítottuk össze (Stubbs SL. *et al.* 1999), a PCR termékek kimutatása agaróz gélelektroforézissel történt. A PCR ribotípus profilokat GelCompar képelemző szoftverrel (4.0 verzió; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belg) elemeztük.

PCR ribotípusok meghatározása kapilláris gélelektroforézissel (CE)

A CE ribotípus meghatározását az ausztriai Egészségügyi és Élelmiszerbiztonsági Ügynökségben (Bécs, Ausztria) végeztük el, ahogy azt korábban leírták (Indra A. *et al.* 2008). A DNS izoláláshoz MagNA Pure Compact (Roche, Basel, Sw.) gyári kitet használtunk a gyártó utasításai szerint. Az egyes csúcsok méretét szoftverrel (Applied Biosystems, Foster City, Cal. USA) számítottuk ki. A kapott adatokat elemeztük a webalapú adatbázis (<http://webribo.ages.at>) alapján, amelyet a CE-alapú PCR-ribotípusok eredményei alapján hoztak létre (Indra A. *et al.* 2008).

Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok

Az antibiotikumok: erythromycin, clindamycin, metronidazol, moxifloxacin, vancomycin és rifampicin vizsgálata történt meg E-teszt-el (AB BIODISK, Solna, Sv) a gyártó előírásainak megfelelően. A clindamycin és a metronidazol határértékeinek interpretálása a vizsgálat elvégzésekor érvényben lévő CLSI anaerob baktériumokra vonatkozó ajánlásokat (CLSI 2008, CLSI 2011) vettük figyelembe, a rifampicin és az erythromycin határértékei – mivel anaerob baktériumokra nem voltak abban az időszakban határértékek - a CLSI *Staphylococcus aureus*-ra vonatkozó ajánlások alapján voltak értékelve. A moxifloxacin anaerob baktériumokra vonatkozó határértékei Ambler közleménye (Ambler J. *et al.* 2008) alapján lettek meghatározva. A fidaxomicin (Astellas Pharma Ltd. Tokio, Jp) MIC értéket agar-hígításos módszerrel határoztuk meg.

4.2. Vizsgálatok a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek körében

A baktériumok gyűjtése és fajok meghatározása

Európai törzsek

Az European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group for Anaerobic Infections (ESGAI) által koordinált vizsgálatba 13 országot (Belgium, Horvátország, Cseh Köztársaság, Finnország, Franciaország, Németország, Görögország, Magyarország, Olaszország, Spanyolország, Svédország, Hollandia és Törökország) vontunk be. Minden ország 3-103 egymást követő, nem duplikált *Bacteroides-Parabacteroides* nemzetségbe tartozó **824 releváns klinikai izolátumot** küldött laboratóriumunkba. Abban az esetben, ha a beküldő laboratórium és a vizsgáló laboratórium identifikálása nem egyezett a MALDI-TOF MS módszert is használtuk az identifikálásra.

Magyarországi törzsek

Humán klinikai mintákból **400 *Bacteroides/Parabacteroides*** csoportba tartozó törzset gyűjtöttünk random össze 2014 és 2016 között négy nagy magyarországi laboratóriumból: 1: Semmelweis Egyetem Mikrobiológiai Laboratórium Részleg, Budapest; 2: SYNLAB Ltd., Budapest; 3: Debreceni Orvostudományi Egyetem Mikrobiológiai Laboratórium Részleg; 4: Szegedi Tudományegyetem Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet. A törzsek species-szintű identifikálása először mindegyik laboratóriumban a saját MALDI-TOF MS készülékükkel (mindegyik laboratórium Bruker Daltonik, Bréma, Gr.) történt a Biotyper Version 3.0 software-t használva, majd a SZTE KMDI-ben ismételtén identifikáltuk a törzseket MALDI-TOF módszerrel, ATB ID 32A (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Fr) módszerrel, illetve amennyiben eltérő eredményt kaptunk szekvenálással.

Antimikrobiális szerek és a MIC értékek meghatározása

Az európai törzsek esetében kilenc antimikrobiális szer MIC-értékét a CLSI irányelvei alapján "gold standard"-ként javasolt agar hígítási módszerrel határoztuk meg (CLSI 2006). A vizsgált antibiotikumok: ampicillin, cefoxitin, clindamycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Seelze, Gr), amoxicillin/klavulánsav (GlaxoSmithKline, Budapest, Mo), piperacillin/tazobaktám, tigecyclin (Wyeth Whitehall GmbH, Bécs, Au), imipenem/cilasztatin (MSD, Budapest, Mo), metronidazol (Richter Gedeon Rt, Budapest, Mo) és moxifloxacin (Bayer Hungary Kft, Budapest, Mo) voltak. A magyarországi törzsek esetében a MIC értékeket tíz antibiotikummal szemben vizsgáltuk meg agar dilúciós módszerrel. A vizsgált antibiotikumok: ampicillin, cefoxitin, tetracyclin, tigecyclin, chloramphenicol, amoxicillin/klavulánsav, meropenem, moxifloxacin, clindamycin és metronidazol.

A rezisztencia gének meghatározása PCR módszerekkel

A hazai MDR törzsek molekuláris vizsgálatait a leggyakrabban előforduló antibiotikum rezisztencia gének kimutatására végeztük el: *cepA*, *cfxA*, *cfiA*, *nim*, *ermB*, *ermF*, *ermG*, *tetQ*, *tetX*, *tetX1*, *bexA*, az IS4351 jelenléte a *cfiA* és *cfxA* gének upstream régióiban, a PCR reakciókat az irodalomban közölt adatok alapján állítottuk össze. Az MDR törzsek között a *gyrA*, *gyrB*, *parC* és *parE* gének esetében vizsgáltuk az aminosav szubsztitúciókat is. Valós idejű (Real-Time: RT-PCR) PCR módszert végeztünk a *cepA*, *cfxA*, *cfiA*, *ermF*, *ermB*, *ermG*, *tetQ*, *tetX*, *tetX1*, *bexA*, *gyrA* gének és az IS4351 elem kimutatására, végpont (End-Point) PCR módszert használtunk a *cfiA*, *cfxA* gének upstream régióinak és az IS4351 elem amplifikációjára. A PCR termékeket 1,2%-os agaróz gél elektroforézissel mutattuk ki. A RT PCR vizsgálatokat a MXPro3000 (Stratagene, Santa Clara, CA, USA), vagy a StepOne (LifeTechnologies) Real-Time PCR készülékeken végeztük el.

A *gyrA* gén szekvenálása

A SZ38 *B. fragilis* törzs DNS amplikonját (proportional scale-up to 30 µl) a Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit-el (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) tisztítottuk, a PCR

termékek szekvenálása az ABI BigDye® Terminator Version 3.1 kit-el a Series Genome Analyser 3500 (Life Technologies, Carlsbad, Ca, USA) készüléken történt.

A *bft*, *bfp1-4* és *fpn* gének meghatározása RT-PCR módszerrel

A *bft* gének jelenlétét RT-PCR módszerrel mutattuk ki a vizsgált *B. fragilis* törzsekből a korábban már közölt (Sóki J. *et al.* 2006) módszer alapján, *bftF* és *bftR* primereket használva. A *bft* gén tipizálására a *bft* gén internális fragmentjét amplifikáltuk a BTT1 és a BTT2 primerekkel és melting pont analízist végeztünk, a PCR termékeket a Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit-el (Geneaid Biotech Ltd., Tw) tisztítottuk és RFLP-vel vizsgáltuk azért, hogy a gén különböző izotípusait azonosítsuk (Prindiville T. *et al.* 2006).

A három *bft-1* és három *bft-2* gént hordozó *B. fragilis* izolátum internális fragmentjeit ABI BigDye® Terminator Version 3.1 kit-el szekvenáltuk és a Series Genome Analyser 3500-at (Life Technologies, Carlsbad, Ca, USA) használtuk a *bft-1* és *bft-2* hordozó izolátumok esetén, hogy igazoljuk az RT-PCR melting-point analízis alapján történő szétválasztást. A *bfp1-4* és *fpn* gének és a C10 és C11 proteázok prevalenciáját vizsgáltuk a 26 *bft*-pozitív és 46 *bft*-negatív *B. fragilis* törzsben RT-PCR módszerrel, a StepOne RT-PCR készüléken (Applied Biosystems, Foster City, Cal. USA) végeztük.

4.3. MALDI-TOF módszer alkalmazása az anaerob baktériumok identifikálására

A törzsek tenyésztése, tárolása

A törzseket 5% (v/v) marhavérrel, 1 mg/l heminnel és 5mg/l K₁ vitaminnal kiegészített Columbia-agaron (Oxoid, Basingstoke, UK) tenyésztettünk 24–48 órán át, 37°C-on anaerob körülmények között (Bactron, Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius, Or, USA). Az identifikációt különböző fenotipizálási módszerekkel végeztük: klasszikus biokémiai tesztek a Wadsworth Manual ajánlásai alapján (Jousimies-Somer H. *et al.*, 2002) és a Rapid ID 32A (ATB) módszer (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Fr).

Mintaelőkészítés és MALDI-TOF MS mérés kivitelezése

Minden baktérium törzs egy önálló, izolált telepéből 24 órán keresztül szubkultúrát készítettünk, majd a friss tenyészetből kacsas 2-3 telephez hozzáérve 10 µl-es kacsnyi mennyiséget Eppendorf fiolába helyeztük át és 300 µl bidesztillált vízzel szuszpendáltuk. megszáritottuk. A baktérium tartalmú pelletet 20–50 µl 70%-os vizes hangyasavban és ugyanannyi mennyiségű acetonitrilben reszuszpendáltuk. A centrifugálás után 1 µl felülúszót helyeztünk a készülék polírozott acél target lemezének minta pozíciójába és szobahőmérsékleten szárítottuk. Ezt követően adtunk hozzá a mintafolthoz 1 µl mátrixot [10 mg/ml α-ciano-4-hidroxifahéjsav oldat (HCCA) 50% acetonitril/2,5% trifluorecetsavban] és újra szárítottuk. A target lemezt a Microflex LT MALDI-TOF tömegspektrométerbe helyeztük (Bruker Daltonik, Bréma, Gr) automatikus mérésre és adatértékelésre, minden mintát duplikátumban, 3-szor mértünk le. Ahol a log(score) ≥ 2,0 helyes identifikációként lettek elfogadva; ha a fenotípusos identifikáció eltérő volt, szekvenálást végeztünk a törzsből.

16S rRNS gén szekvenálás az ellentmondásos izolátumok esetén

A szekvenálás ugyanabból az eredeti etanol extraktumból (600 µl) történt. A 16S rRNS gén fragmentum amplifikációjához egyedi univerzális primereket használtunk. A primerek tervezéséhez az Oligo_6.37 szoftvert használtuk (Molecular Biology Insights). A szekvenálás az ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, Cal. USA) és egy ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Hitachi, Chiyoda, Tokyo, Tokió, Jp) alkalmazásával történt. A 16S rRNS gének szekvencia adatait, a BLAST szoftver (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) GenBank adatbázissal hasonlítottuk össze >98%-os homológiát tartottunk megfelelőnek a faj azonosításhoz (Song Y. 2005).

B. fragilis *cfiA* Divízió I.-II.-be tartozó törzsek azonosítása

Az általunk izolált és megvizsgált *B. fragilis* törzsekből készült tömegspektrumokat a MALDI Biotyper 2.0 szoftver és adatbázis használatával azonosítottuk. Ezután a *cfiA*-pozitív és *cfiA*-negatív specifikus csúcsok detektálására a klinikai izolátumaink MSP-inek a gyártó által megalkotott könyvtárhoz történő mintázati illesztését a MALDI Biotyper 2.0 alkalmazásával hajtottuk végre, standard beállításokat alkalmazva. Meghatároztuk a törzsek karbapenem MIC értékét is és a törzs *cfiA*-pozitivitását ellenőriztük PCR módszerrel.

Cutibacterium acnes törzsek tipizálása

A vizsgálatba bevont baktériumtörzsek *C. acnes*-nek bizonyultak a MALDI Biotyper 3.0 szoftver és adatbázis használatával. A jól meghatározott I. típus (négy IA, egy IB és egy IC), II. típus (egy) és III. típus (három) referencia törzs és egy klinikai izolátum (76618 HU), amire az MLST tipizálást elvégeztük a vizsgálat elején és a II. típusba tartozónak bizonyult, tömegspektrum beállításait a ClinProTools 2.2 szoftverbe (Bruker Daltonik, Bréma, Gr) importáltuk. Ezt követően a csoportra jellemző csúcsokat kerestünk a spektrumok gondos vizuális átnézésével. Továbbá a három csoport közötti csúcstéréseket a FlexAnalysis 3.3 szoftver (Bruker Daltonik, Bréma, Gr) alkalmazásával kerestük.

Multi Locus Szekvencia Tipizálás (MLST) analízis

A PCR termékeket PCR fragment extrakciós kittel tisztítottuk (Geneaid, New Taipei City, Taiw) majd a 3500 Series Genetic Analyser (Life Technologies, Carlsbad, Ca, USA) készüléken szekvenálták. Az előállított szekvenciákat Genomics Workbench 5.5 (CLC Bio) szoftverrel analizáltuk; minden egyes lókuszra az új allélokat új allél számmal jelöltük meg és az eltérő allélikus profilok egy új ST számot jelöltek ki. Minden allélszekvencia elérhető a (<http://pubmlst.org/pacnes>) weboldalon.

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

5.1. Vizsgálatok *C. difficile* törzsekkel

Tanulmányoztuk a különböző magyarországi régiókból származó *C. difficile* izolátumok toxintermelését molekuláris diagnosztikai módszerekkel: járó- és fekvőbetegek hasmenéses székletmintájából random gyűjtött törzseket vizsgáltunk, melyeket magyarországi laboratóriumokban izoláltak és azonosították (a budapesti régióban, Észak-Dunántúlon, Szolnokon és Szegeden) **2002-ben**.

A vizsgált **száztizenkét** *C. difficile* törzsből az A toxin és a B toxin gének együttes jelenlétét 79 törzsben igazoltuk, morfológiai változásokat mutattunk ki a HeLa sejtvonalon. PCR módszerrel harminchárom izolátum volt negatív mind az A toxin, mind a B toxin gének esetében. A toxintermelő izolátumok nem rendelkeztek delécióval, vagy inszercióval az A toxin gén 3' régiójában. Két izolátumban mutattuk ki PCR-el a binary toxin jelenlétét: a várt 375 bp (*cdtA*) és 510 bp (*cdtB*) DNS-fragmenseket detektáltuk a binary toxin-specifikus primer párokkal. Mindkét esetben deléció a *tcdA*-gén 3'-végén az NK9 és NK11 primer párokkal nem volt kimutatható, a sejtvonalon kifejezett citotoxikus hatást figyeltünk meg, a *tcdA* és a *tcdB* gének jelenléte PCR-el igazolható volt. A PCR ribotipizálási vizsgálataink eredményei azt mutatták, hogy a törzsek a 023 és 075 ribotípusokhoz tartoztak, a két törzs PaLoc régiójának szekvenálási elemzése azt mutatták, hogy a törzsek a III-as és IV-es toxin típusokba tartoztak. Ebben az időszakban még nem találtunk binary toxin-pozitív, A toxin- és B toxin-negatív törzseket a magyarországi gyűjtött törzsek között és nem találtunk A toxin-negatív, B toxin-pozitív törzset sem.

Az előző vizsgálatainkat mintegy 10 év múlva nagyszámú mintán ugyanezekkel a módszerekkel folytattuk: az **1 371 törzs** 95%-ában tudtuk kimutatni az A- és a B toxinok termeléséért felelős géneket (1 300 törzs). A törzsek 0,2%-a, **két törzs volt A toxin-negatív**

és B toxin-pozitív: további részletes molekuláris vizsgálataink alapján 1,2 kB deléción volt kimutatható az A toxint kódoló gén 3' régiójában, mindkét toxin A/B⁺ törzs a VIII-as toxintípushoz és a 017-es PCR ribotípushoz tartozott és nem hordozta a binary toxin termeléséért felelős *cdtB* gént. Az összes törzs 41,1%-a (534 törzs) hordozta a binary toxin termeléséért felelős gént, ezeknek a törzseknek a ribotípus meghatározása történt meg, a törzsek 97,8%-a (522 törzs) 027-es PCR ribotípusának bizonyult, a többi, tizenkét törzs közül hét a 078-as; három a 023-as kettő a 045-ös PCR ribotípusba tartozott. 2010-ben a vizsgált 601 A- és B toxin-pozitív törzs 30,4%-a (183 izolátum) volt binary toxin-pozitív, míg 2011-ben a vizsgált 699 toxintermelő törzs 50,2%-nál (351 izolátum) igazoltuk a binary toxint kódoló gének jelenlétét.

A BD GeneOhm Cdiff Assay módszer összehasonlítása a hagyományos toxin kimutatási eljárásokkal a toxin-termelő *C. difficile* kimutatására közvetlenül hasmenéssel székletmintákból

2008-ban **600 hasmenéssel székletmintát** gyűjtöttünk a SZTE klinikáin kezelt fekvőbetegektől és a járóbetegektől 3 hónapos mintagyűjtési időszakot alkalmazva. Kezdetben négy minta inhibitoros volta miatt gátolta a PCR-t, ám a fagyasztott lizátumok mintáinak ismételt teszteléskor mindezen minták negatívnak bizonyultak. A vizsgálati időszak alatt a minták 9,7%-a pozitív volt a BD GeneOhm Cdiff teszttel. A HeLa sejtvonalon végzett citotoxicitási vizsgálat és a Vidas *C. difficile* toxin A/B vizsgálat 6,3% és 4,7% -os pozitivitási arányt mutatott a székletminták közvetlen vizsgálatával.

A kezdeti vizsgálatok során közvetlenül a székletmintából 36 (6%) minta pozitív és 536 (90%) negatív volt a PCR-el és a szövetkultúra citotoxicitási vizsgálatával. A két módszerrel kapott ellentmondásos eredmények esetében a székletből célzottan *C. difficile* tenyésztést végeztünk és a kitenyésztett törzs toxin státuszát ismételtlen megvizsgáltuk. Tizenhét minta volt pozitív a BD GeneOhm Cdiff vizsgálatával, de negatív a citotoxicitási vizsgálatával közvetlenül a székletből történő vizsgálatnál, azonban a mintákból kitenyésztett törzsek minden esetben toxin-termelőnek bizonyultak a további vizsgálat során. Öt esetben a PCR vizsgálat pozitív eredményt adott, míg a citotoxicitási vizsgálat negatív volt és a tenyészetből megismételt toxin teszt is negatív volt. Két minta pozitív volt a citotoxicitási vizsgálatban, de negatív a PCR-el; ezeket a tenyészetek további toxin vizsgálatai valós pozitívnak igazoltak. A citotoxicitási vizsgálat alkalmazásával és az ellentmondásos eredményt adó minták esetében a minták tenyésztésével és a törzsek toxinstátuszának ellenőrzésével a BD GeneOhm Cdiff assay érzékenysége 96,4%, specificitása 99,1% és pozitív és negatív prediktív értékei (PPV és NPV) 92% és 100% voltak. 600 mintából 39 a Vidas *C. difficile* A/B vizsgálatával „equivocal” (kétes, határérték) eredményeket adott; ezekben az esetekben a citotoxicitási vizsgálatával és a tenyészet toxinstátuszának ismételt ellenőrzésével erősítettük meg az eredményeket. A 39 széklet mintából 30 negatívnak bizonyult a BD GeneOhm Cdiff assay-al, a citotoxicitási vizsgálatával és a tenyészetből végzett toxin-vizsgálattal, míg a kilenc minta pozitív eredményt adott a PCR-el és a tenyészetből végzett toxin-vizsgálattal. Egybehangzó eredményeket figyeltünk meg a 20 pozitív és 500 negatív minta esetében, hat minta volt pozitív csak a Vidas *C. difficile* A/B vizsgálatával.

A *C. difficile* PCR ribotípusok megoszlása Magyarországon 2002-2004.

A vizsgálatba összesen **százöt, hasmenéssel székletmintákból** származó *C. difficile* izolátumot válogattunk be azért, hogy meghatározzuk az adott időszakban jellemző hazai PCR ribotípusokat: melyeket három magyarországi régióból: Szeged/Szolnok, Budapest és Veszprém gyűjtöttünk.

A vizsgált százöt *C. difficile* izolátumból 83 (79%) hordozta a *tcdA* és *tcdB* géneket, míg 22 volt a *tcdA* és *tcdB*-gének jelenlétére negatív és nem találtunk A toxin-negatív és B toxin-pozitív izolátumot. A ribotipizálás során 23 különböző ribotípust találtunk és a 5 olyan új ribotípust fedeztünk fel, amelyeket eddig még nem írtak le. Ezeket az addig még

ismeretlen, új ribotípusokat 161, 162, 164, 165 és 166 PCR ribotípusoknak nevezték el. Ebben a vizsgált időszakban a magyarországi izolátumok közül a leggyakoribb típusok a PCR 014 (24,8%), 002 (13,3%) és 085 (8,6%) ribotípusok voltak, a toxin-negatív törzsek többsége (41%) a 085 PCR ribotípushoz tartozott.

A ribotípusok eloszlása a három földrajzi régióban jelentősen különbözött: a budapesti régióban a domináns típusok a 014 (29%), 002 (19,4%) és a 018 (12,9%), ribotípusok voltak, Nyugat-Magyarországon a leggyakoribb szintén a 014-es ribotípus volt (28,9%), azonban ezt követték a 049 (11,1%), 085 (8,9%) és 002 (8,9%) ribotípusok, illetve a 012 (20,7%), 002 (13,8%) és 014 (13,8%) volt jellemző Dél-Magyarországra. Külön kiemelendő, hogy a 049-es típus (11,1%) csak Nyugat-Magyarországon volt jelen, míg a 005-ös (9,7%) ribotípus csak a budapesti régióban volt kimutatható. Három binary toxin-termelő törzset találtunk: két olyan ribotípust mutattunk ki, amelyek binary toxint termeltek, ezek a törzsek 023-as és 075-ös ribotípusúak voltak. A binary toxin-termelő törzsek jelenlétét Nyugat-Magyarországon (egy 023-as ribotípusú törzs) és a budapesti régióban (egy 023-as- és egy 075-ös ribotípusú törzs) mutattuk ki, de Dél-Magyarországon ebben az időszakban még nem jelentek meg binary toxin- termelő törzsek.

A *C. difficile* 027-es PCR ribotípus első izolálása Magyarországon: 2007.

2007. júniusában egy 53 éves, súlyos hasmenés- és hányinger tünetekkel rendelkező férfibeteg került kórházba Budapesten. A kórtörténetben 2 héttel a jelen felvétele előtt kórházba került a szisztémás lupus erythematosus miatt, akkor antibiotikum-kezelést (ceftriaxon, clarithromycin és imipenem) kapott. A kolonoszkópia kimutatta, hogy az ileális nyálkahártya érintetlen volt, de a vastagbélben fekélyek voltak láthatóak. *C. difficile* toxin kimutatás (VIDAS[®] *C. difficile* A toxin II; bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Fr) pozitív eredményt adott a kezelő intézmény mikrobiológiai laboratóriumában. Hat hónappal később, a fentebb ismertetett nemzeti *C. difficile* felmérés részeként a laboratóriumunkban toxintermelő *C. difficile* törzset sikerült kitenyésztenünk a beteg fagyasztott székletmintájából. Az izolált törzs A és B toxin-termelőnek bizonyult, molekuláris vizsgálattal az A és B toxin gének, továbbá a binary toxin termeléséért felelős gének jelenlétét igazoltuk. A *tcdA* gén 3'-végén deléciót nem detektáltuk, a törzs *tcdC* génjének részletes szekvencia analízise egy 18 bp és egy egyetlen nukleotidot érintő deléciót tárt fel, amelyek a 027 ribotípusra jellemzőek. A törzs PCR ribotípus eredményét összehasonlítottuk a nagy-britanniai Anaerob Referencia Referencia Laboratórium könyvtárból (ARL Cardiff, UK) rendelkezésünkre bocsátott 027 ribotípusú kontroll törzsek mintáival, ami alapján egyértelmű volt, hogy az izolált törzs 027 ribotípusú, ez volt az elsőként felfedezett hazai 027-es PCR ribotípus okozta eset, amely felhívta a figyelmet a *C. difficile*, mint nozokómiális enterális patogén lehető legrövidebb időn belül történő kimutatására és az időben történő mikrobiológiai diagnózis fontosságára.

2006 és 2007 között négy nagy hazai mikrobiológiai laboratóriumból (Budapest, Szeged, Székesfehérvár és Veszprém) gyűjtöttünk törzseket a *C. difficile* epidemiológiájának nyomonkövetése céljából. Járó- és fekvőbetegek hasmenéses székletmintájából izolált százötven *C. difficile* törzset vizsgáltunk.

A vizsgált időszakban a törzsek 80%-ából tudtuk kimutatni mind a *tcdA* és *tcdB* gének jelenlétét. A *tcdA* gén 3' végén deléciót egy törzs esetében sem detektáltunk a NK9 és NK11 primer párt használva, 8 izolátum (5,3%) hordozta a binary toxin termeléséért felelős *cdtB* gént, ezekben a törzsekben a *tcdA* és a *tcdB* géneket is kimutattuk. Mivel ebben az időszakban a hipervirulens 027 ribotípusú törzsek jelentős, járványszerű európai elterjedéséről számoltak be a közlemények, a binary toxin-pozitív törzseket választottuk ki a további PCR ribotipizálásra. A vizsgált 8 törzsből csak 1 törzs (fentebb ismertetett eset) bizonyult 027-es ribotípusúnak, 4 törzs a 078-as ribotípusba tartozott, három a 131-es ribotípusba tartozott.

2014 meghatározott időszakában gyűjtött százkilencvenkét toxin-termelő *C. difficile* törzset vizsgáltunk kapilláris gélelektroforézis (CE) PCR ribotípus meghatározási módszerrel. A törzseket hasmenéses székletmintákból izoláltuk két laboratóriumban, amelyek

a közép- és délkelet-magyarországi régiókat képviselik: a Synlab Hungary (Budapest) és a SZTE KMDI.

A 192 toxin-termelő *C. difficile* törzs közül összesen 31 különböző ribotípust találtunk és azonosítottunk: a leggyakrabban talált ribotípusok: 027 (33,3%), 036 (19,7%), 014 (6,7%) és 176 (6,7%). Hat izolátum ugyanaz volt, mint az AI-3, AI-12, AI-75 és AI-83 néven ismert osztrák ribotípusok, és 16 izolátumot (8,3%) „új” ribotípusnak tekintettünk, mivel mintázatuk nem felelt meg semmilyen eddig ismert ribotípusnak. A 027-es ribotípus (45,8%) volt a leggyakrabban előforduló ribotípus a Budapesten összegyűjtött izolátumok között, ezt követte a 176-os és a 036-as ribotípus. Szegeden a leggyakoribb ribotípus a 036-as (29,1%) ribotípus, majd a 027 (20,8%) volt. A Szegeden gyűjtött izolátumok között a talált ribotípusok diverzitása sokkal szélesebb volt, sokkal változatosabb volt a ribotípus eloszlás, más, csak egy-három izolátummal reprezentált ribotípust sokkal gyakrabban (30,2%) találtunk szemben a budapesti laboratóriumban izoláltakkal, ahol ez kevesebb volt (19,8%).

2018. január és 2018. június között száz random gyűjtött, az SZTE ÁOK különböző helyi fekvőbeteg osztályairól származó hasmenéses székletmintákból általunk izolált *C. difficile* törzs ribotípusát határoztuk meg, illetve vizsgálatokat végeztünk a toxin B-t kódoló gén (*tcdB*) és binary toxin gén A komponens (*cdtA*) jelenlétének kimutatására RT-PCR módszerrel. A törzsek ribotípus megoszlása ebben a vizsgálati időszakban rendkívül heterogén volt, összesen 25 különböző PCR ribotípust határoztunk meg, melyek közül a leggyakrabban még mindig a 027 (40%) ribotípus fordult elő. A többi ribotípus előfordulási aránya nem volt jelentős, a hatvan, nem 027-es ribotípusú törzs 24 különböző, egyéb ribotípusba tartozott 5-1% közötti megoszlással. A 100 törzsből 59 esetben tudtuk kimutatni a binary toxint kódoló specifikus gén PCR termék jelenlétét, tehát a törzsek 59%-a binary toxin-termelő volt, ezek közül 19 törzs nem a 027-es ribotípusba tartozott, de csak 1-2 törzs reprezentálta a más, binary toxin-termelő adott ribotípust.

A *C. difficile* törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálatai

Első vizsgálatunkban **száz toxin-pozitív** *C. difficile* törzs (80-at 2006-2007-ben izoláltunk, 20-at 2002-2003-ban) antibiotikum érzékenységi vizsgálatát végeztük el öt antibiotikummal szemben: erythromycin, clindamycin, metronidazol, moxifloxacin és rifampicin. Az összes vizsgált izolátum érzékeny volt metronidazolra. A kapott rifampicin MIC értékei széles határok között változtak: az izolátumok többsége (86,3%) alacsony MIC (0,002 mg/ml) értéket mutatott, csak 5 (6,3%) olyan törzs, melyet 2006-7-ben izoláltunk volt rifampicin rezisztens, míg az összes 2002-3-ban izolált törzs érzékeny volt erre az antibiotikumra. A rifampicin rezisztens törzsek magas fokú rezisztenciával rendelkeztek az erythromycin, clindamycin és moxifloxacinnal szemben is. Az erythromycin, clindamycin és moxifloxacin rezisztencia aránya a 2006-7-ben izolált törzsek között 25%, 27,5% és 25% volt, míg a 2002-2003-ban izolált törzsek között még nem találtunk erythromycin, clindamycin és moxifloxacin rezisztens törzset. Társult-rezisztencia az erythromycin, clindamycin és a moxifloxacin esetében 16,3%-ban (13 izolátum) volt kimutatható 2006-2007-ben és az erythromycin rezisztens törzsek többsége (13 a 20 törzsből) szintén rezisztens volt a clindamycinre és a moxifloxacinra, míg társ-rezisztenciát az erythromycinre és a clindamycinre csak 3 törzs esetében találtunk.

Vizsgálatunkat 2008-2010 között gyűjtött **kétszáz toxin-termelő** *C. difficile* törzsszel ugyanezekkel a standardizált módszerekkel folytattuk. Az összes, ebben az időszakban vizsgált törzs érzékeny volt metronidazolra mind a CLSI, mind az EUCAST határértékei alapján, a MIC₅₀ 0,5 µg/ml, míg a MIC₉₀ 1 µg/ml volt.

Az erythromycin, clindamycin és moxifloxacin rezisztens törzsek aránya 2008-2010-ben 31%; 29,5% és 21,5% volt. A törzsek 25,5%-a mérsékelten érzékeny volt erythromycinre, 16%-a clindamycinre és 3,5%-a a moxifloxacinra. A vizsgált törzsek közül 34 (17%) törzs mutatott rezisztenciát csak az erythromycinrel és/vagy a clindamycinrel szemben, míg 18 (9%) törzs esetében társ-rezisztencia volt kimutatható a makrolid/linkozamid és a moxifloxacin között. Társ-rezisztenciát makrolid/linkozamid, moxifloxacin és rifampicinre

együttesen 20 (10%) törzs esetében mutattunk ki, míg 5 (2%) törzs volt rezisztens csak a moxifloxacinra és egy (0,5%) törzs mutatott rezisztenciát a rifampicinnel szemben. A rifampicin esetében a MIC megoszlási tartományok meglehetősen széles határok között mozogtak: $\leq 0,002$ – ≥ 32 mg/l; azonban a törzsek többségének (88%) alacsony MIC értéke volt, míg a vizsgált törzsek 11,5%-a magas fokú rezisztenciát mutatott rifampicinnel szemben.

Következő vizsgálatunkban az újonnan bevezetett **fidaxomicinnel** (szűk spektrumú, a makrociklusos antibiotikumok egy osztályának első tagja) szembeni érzékenységi viszonyokat vizsgáltuk meg CDI-ben szenvedő betegek székletmintáiból izolált *C. difficile* törzsek esetében. Komparátor antibiotikumokként a metronidazolt, vancomycint, moxifloxacint és a rifampicint alkalmaztuk.

188 toxin-termelő *C. difficile* törzset vizsgáltunk meg, a vizsgálatból nem zártuk ki a 027-es ribotípusú törzseket, mivel a szer hatékonyságát vizsgáltuk CDI-ben szenvedő betegek székletmintáiból izolált törzsek esetében “*in vitro*”. Metronidazol és vancomycin rezisztens, vagy csökkent érzékenységgű törzset nem találtunk, a törzsek 19,7%-a (37 törzs) volt rezisztens moxifloxacinra és 28 törzs (14,9 %) volt rezisztens a rifampicinre. Minden vizsgált antibiotikum esetében a MIC₅₀ értékek viszonylag alacsonyak voltak, azonban a moxifloxacin és a rifampicin MIC₉₀ értéke 32 mg/l volt. Az összes *C. difficile* törzs érzékeny volt fidaxomicinre (MIC $\leq 0,5$ mg/l), az izolátumok többségének 0,125 mg/l, vagy alacsonyabb fidaxomicin MIC értéke volt, csak 4 izolátum MIC-e volt 0,5 mg/l. Ezek közül a törzsek közül egy volt rezisztens moxifloxacinra (MIC 32 mg/l) és egy másik törzsnek csökkent érzékenysége volt rifampicinre (MIC 1 mg/l). Vizsgálatunkban a fidaxomicin MIC értékek megoszlása teljesen megegyezett az EUCAST adatbázisában található “vad” típusú törzsek MIC értékeinek megoszlásával (<http://eucast.org>).

Extraintesztinális *C. difficile* infekciók

Az irodalmi adatok alapján rendkívül ritka az extraintesztinális, illetve a nem székletszóródással összefüggő, bizonyítottan exogén eredetű *C. difficile* infekciók előfordulása. Bizonyítottan *C. difficile* által okozott extraintesztinális infekciót Magyarországon elsőként munkacsoportunk publikált egy 31 éves, jó általános állapotú, egészséges, alapbetegségben, immunhiányos állapotban nem szenvedő frissen traumatizált férfibeteg esetében, aki mezőgazdasági munka során szenvedett nagy kiterjedésű, mély, egészen a csont felszínéig terjedő jobb alsó végtagi sérüléseket.

A mikrobiológiai tenyésztés során a beteg mintáiból az aerob inkubálás során nagy csíraszámban *Bacillus subtilis*, az anaerob inkubálás során toxin-termelő *C. difficile* törzs tenyésztett ki, mely a szoba jöhető anaerob ellenes antibiotikumokkal szemben, a metronidazol és a karbapenemek kivételével rezisztens volt. A betegnek hasmenése sem otthonában, sem kórházi ellátása során nem volt, székletmintájából sem szabad toxint nem sikerült kimutatni, sem *C. difficile* törzset nem tudtunk izolálni. Az aerob módon kitenyésztett *Bacillus subtilis* törzsszel történő együttes előfordulás felvetette a földdel történő szennyeződés gyanúját. Későbbi mintavételek során már nem sikerült a *C. difficile* törzset izolálni a beteg sebéből.

Az izolált törzs A/B toxin-termelőnek bizonyult, a molekuláris vizsgálatokkal a törzs mind az A toxin-termeléséért, mind a B toxin-termeléséért felelős géneket hordozta, azonban binary toxin-negatívnak bizonyult. A PCR ribotípus meghatározás során a törzs 014-es PCR ribotípusúnak, illetve a szekvenálási vizsgálatok során XVIII. toxin-típusúnak bizonyult.

Az első publikált esetünk után megvizsgáltuk a SZTE ÁOK klinikáiról beküldött **nem széklet mintákból** izolált *C. difficile* infekciók epidemiológiáját a 2008 és 2017 közötti tíz éves periódusban. Ebben az időszakban huszonnégy beteg (11 férfi, 11 nő, átlagéletkor: 55,4 év, 9 hó-84 év) extraintesztinális (nem széklet) 24 mintájából tenyésztett ki *C. difficile* törzs. A betegek többsége komorbid, súlyos alapbetegségekkel rendelkező beteg volt, tíz beteg (45,5%) életkora volt 65 év feletti. Nyolc beteg esetében volt az infekció valamilyen abdominális eredetű, hét beteg esetében bőrgyógyászati tályog- sebváladék mintából izoláltuk a kórokozót. Érdekesség egy 38 éves nőbeteg, akinél a Fog- és Szájsebészeti Osztályon

nyálmirigy gyulladást okozó infekcióból (steril punkcióval vett sebváladékból) vegyes flóra tagjaként, illetve egy 54 éves nőbeteg, ahol igazolt PID-esetből, rendellenes méh- és hüvelyvérzést követő műtét során vett mintából izoláltuk a törzset egyedüli kórokozóként.

Az összes CDI eset 0,58%-a volt extraintesztinális, az esetek száma 0-4 között változott évente, az éves átlag 2,2 eset/év volt, 4-4 esetet találtunk 2009-ben és 2011-ben, nem izoláltunk extraintesztinális infekcióból *C. difficile*-t 2015-ben. Csak 8 beteg volt (36,7%) járóbeteg, ezek közül négynek volt valamilyen bőr- és légyszívás infekciója. A legtöbb esetben a *C. difficile* törzset egyéb, más aerob, fakultatív- és obligát anaerob baktériumokkal együtt izoláltuk, csak 4 minta (3 beteg) esetében volt a *C. difficile* törzs színtenyésztésben, egyedüli izolátum. A leggyakoribb társzpatogének az *E. coli* (6 eset) és az *E. faecalis/faecium* (6 eset) voltak, négy beteg mintájában csak anaerob kórokozó volt jelen a *C. difficile* mellett társzpatogénként. A törzsek toxin-termelését 19 izolátum esetében határoztuk meg és 15 (79%) bizonyult A és B toxin-termelőnek. Ribotipizálást 14 esetben végeztünk el, ezek közül 7 (50%) törzs tartozott a 027 PCR ribotípusba, három törzs viszont a más országokban rendkívül ritka előfordulású, 198-as PCR ribotípusba tartozott.

5.2. Vizsgálatok a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek körében

Európai törzsek antibiotikum érzékenységének meghatározása

Az ESGAI által koordinált vizsgálatban **824 releváns klinikai** izolátumot vizsgáltunk. A legtöbb izolátum *B. fragilis* volt (72,8%), majd ezt követte a *B. thetaiotaomicron* (10,1%), *B. ovatus* (5,9%) és *B. vulgatus* (5,1%); további 11 *Bacteroides/Parabacteroides*-fajt találtunk alacsonyabb számban a különböző fertőző folyamatokból származó mintákban.

A CLSI és az EUCAST határértékek alapján a vizsgált törzsek 99%-a és 98%-a volt rezisztens az **ampicillinre**, a különböző fajok közötti lényeges különbségek nélkül. A *B. fragilis* törzsek 8,7%-a és az összes *Bacteroides/Parabacteroides* izolátum 10,4%-a volt **amoxicillin/klavulánsav** rezisztens, az összes nem *fragilis* izolátum esetében ezen antibiotikum rezisztencia aránya magasabb volt, mint a *B. fragilis* izolátumoké, 11,5% és 30% között mozgott. Jelentős különbségek voltak megfigyelhetők a rezisztencia arányaiban, amikor a CLSI vagy EUCAST határértékeket alkalmaztuk a **piperacillin/tazobaktám** MIC meghatározásakor: 3,1% vs. 10,3% az összes izolátum esetében, 1,7% vs. 6,5% a vizsgált *B. fragilis* izolátumok esetében. Az összes „non-*fragilis*” species jóval magasabb rezisztencia arányokat mutatott, mint a vizsgált *B. fragilis* izolátumok, mindkét határérték esetében. A cefoxitin esetében az összes izolátum 17,2% -a és a *B. fragilis* törzsek 13,7%-a rezisztensnek bizonyult. A rezisztencia aránya a legmagasabb a *P. distasonis* (35,7%), a *B. thetaiotaomicron* (27,1%) és a *B. ovatus* (24,5%) törzsek között volt, azonban a kevésbé gyakori *Bacteroides* fajok is magas rezisztencia arányt mutattak (26,9%).

Az összes izolátum kevesebb mint 1%-a és a *B. fragilis* izolátumok 1,2%-a volt csak rezisztens az **imipenemre**. A 22 csökkent érzékenységű törzs tíz országból származott, egyenlően eloszlott a különböző régiókban, más antibiotikummal szembeni rezisztenciát minden csökkent imipenem érzékenységű törzsben megfigyeltünk. Valamennyi vizsgált antibiotikum esetében -a tigecyclin kivételével- a rezisztens törzsek aránya szignifikánsan magasabb volt az imipenemre nem érzékeny izolátumok között, mint az imipenem érzékeny törzsek között.

Az ampicillin után a legmagasabb rezisztencia-arányokat a **clindamycin** esetén találtunk: ez a különböző fajok esetében 28,5–60% között változott, a rezisztencia 32,4% volt az összes izolátum esetében és 28,5% a *B. fragilis* izolátumok esetében. A *B. uniformis* és a *B. vulgatus* törzsek voltak a legrezisztensek. A CLSI rezisztencia határérték (≥ 8 mg/l) alapján az összes izolátum 13,6% -a és *B. fragilis* 14%-a rezisztenciát mutatott a **moxifloxacin** szemben. A *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek túlnyomó többsége érzékeny volt a **metronidazolra**, mind a CLSI (≥ 32 mg/l), mind az EUCAST rezisztencia határértékeket figyelembe véve (>4 mg/l), az összes izolátum esetében $<1\%$ rezisztenciát találtunk: egy

hemokultúrából izolált *B. thetaiotaomicron* törzs (MIC>256 mg/l) és egy tályogmintából izolált *B. fragilis* törzs (MIC: 32 mg/l) volt rezisztens a CLSI határérték alapján. Két további *B. fragilis* törzs mutatkozott rezisztensnek az EUCAST határértékek alapján (MIC: 8 és 16 mg/l). A 824 törzsből 22 olyan volt, amelynek a metronidazol MIC értéke ≥ 4 mg/l volt (2,7%), ezek közül mindössze hat olyan volt, amely több mint két másik antibiotikummal szemben is rezisztens volt. A **tigecyclin** esetében az összes izolátum mindössze 1,7% -a bizonyult rezisztensnek, míg a *B. fragilis* törzsek 1,8%-a, a *B. vulgatus* és a *B. ovatus* törzseknek volt a legmagasabb rezisztencia mértéke: 4,8% és 2,0%.

Régiók közötti különbségek a rezisztencia arányok között

A résztvevő országokat **négy különböző régióba** soroltuk: **skandináv**: Finnország és Svédország, **nyugati**: Hollandia, Belgium és Németország; **mediterrán**: Spanyolország, Franciaország, Görögország, Olaszország és Törökország és **keleti**: Horvátország, Csehország és Magyarország.

Az ampicillinnel szembeni rezisztenciában nem volt különbség az országok és régiók között. Az amoxicillin/klavulánsav rezisztenciája változó volt: Franciaország 2%-tól Belgium 18,5%, míg a piperacillin/tazobaktám rezisztencia két szélső értéke Hollandiában 3,1%, Svédországban 19,6% volt. A cefoxitin-rezisztencia jelentősen változott, a legalacsonyabb rezisztencia-arányt Hollandiában (3,1%) a legmagasabbat Finnországban (30,6%) találtunk. A Cseh Köztársaságon (17,6%) és Németországon (19,5%) kívül a clindamycin-rezisztencia minden országban magasabb volt, mint 20%, legmagasabb Görögországban (50,7%) illetve Törökországban (52,9%).

A regionális adatok leginkább kifejezett különbségeit a clindamycin esetében figyeltük meg, a legmagasabb rezisztenciát a mediterrán régióban (41,9%) találtunk, melyet a keleti országok követtek (29,7%), míg a két másik régió viszonylag alacsonyabb rezisztencia értékei (22,5% vs. 23,2%) voltak. A moxifloxacin rezisztencia jelentősen változott: Olaszországban nem találtunk rezisztens törzseket, míg Svédországban a rezisztencia arány 28,9% volt, ezt az antibiotikumot vizsgálva a regionális különbségek igen figyelemre méltóak voltak, a skandináv országokban 21,4%, a mediterrán régióban pedig csak 5,4%.

Magyarországi centrumokból gyűjtött törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálatai

A vizsgált **négyszáz** magyarországi *Bacteroides* klinikai izolátumból a törzsek 98%-a volt rezisztens ampicillinre, mindössze 4,5%-a mutatott rezisztenciát amoxicillin/klavulánsavval szemben. A cefoxitin rezisztencia aránya 6,75%-os volt, míg a meropenemmel és clindamycinnel szemben az izolátumok viszonylag magas aránya: 7%-a, illetve 36,5%-a volt rezisztens. A moxifloxacin rezisztencia aránya 18,5%-os volt; az izolátumok 65,25%-a volt a tetracyclin rezisztens. A tigecyclin igen jó hatékonyságot mutatott: a törzsek 94,75%-a érzékeny volt, mindössze 4 törzs volt rezisztens, egy metronidazol rezisztens törzset találtunk, a chloramphenicolra az izolátumok 99,5%-a érzékeny volt és rezisztens törzset nem találtunk.

A különböző antibiotikumokkal szembeni rezisztencia faj szerinti vizsgálatát tekintve ampicillinnel szemben a *Bacteroides* speciesek 91,67-100%-a volt rezisztens. A *P. distasonis* törzsek 26,67%-a amoxicillin/klavulánsavval, 20%-a pedig cefoxitinnel szemben mutatott rezisztenciát. A *B. ovatus* izolátumok 16,66%-a volt rezisztens meropenemmel szemben, ugyanakkor a *P. distasonis*, *B. uniformis* és más *Bacteroides* fajok érzékenyek voltak. Clindamycinnel szemben a *B. thetaiotaomicron* izolátumok többsége (55,7%) volt rezisztens, miközben a *B. fragilis* esetében ez az arány csak 25,75% volt.

Régiók közötti különbségek a rezisztencia arányok között

A magasszintű ampicillin rezisztenciát mutató törzsek (≥ 64 mg/l) aránya centrumonként jelentős eltérést mutatott: 1-es és 4-es centrum ($p<0,001$); 2-es és 4-es ($p<0,001$); valamint a 3-as és 4-es ($p=0,002$) centrum között. A cefoxitin rezisztencia esetén

szintén jelentős különbség volt tapasztalható a 3-as (3%) és 4-es centrum (13,0%) között. A meropenem rezisztens törzsek megoszlása viszonylag jelentős eltérést mutatott: összesen 28 meropenem rezisztens izolátumot azonosítottunk, melyek közül 25 volt *B. fragilis* (89,28%). Meglepő eredmény, hogy ezen *B. fragilis* törzsek közül 11-et, valamint 1 *B. ovatus*-t is a szegedi centrumban izoláltuk, más centrumokban a meropenem rezisztencia jóval alacsonyabb arányú volt (4-7%), de szignifikáns különbség az 1-es és 4-es centrumok esetén volt tapasztalható ($p < 0,001$). A clindamycin rezisztencia jelentős földrajzi különbséget mutatott, főleg az 1-es és 4-es centrumok között volt ez szembetűnő (48% vs. 27%). A tetracyclin rezisztens törzsek legnagyobb arányban az 1-es (63%) és a 4-es (74%) centrumból származó mintákból tenyészték ki, de a különbség nem volt szignifikáns ($p = 0,003$).

A fluorokinolon érzékenység és a MATE multidrug efflux pumpa gén (*bexA*) vizsgálata

A vizsgált 400 magyarországi törzs közül 18,5% volt rezisztens moxifloxacinra (a *B. fragilis* törzsek 15,45%-a, a nem-fragilis törzsek 22,75%-a). A *bexA* gént RT-PCR módszerrel a 400 törzsből 82 esetben tudtuk kimutatni (20,5%), 79,5%-a a törzseknek nem hordozta ezt a gént. A *bexA* gén prevalenciája szignifikánsan magasabb volt ($p = 0,002$) a NFB törzsek között, mint a *B. fragilis* izolátumokban, legmagasabb előfordulási arányt a *B. thetaiotaomicron* törzsek között találtunk (80,1%), míg a mind *B. ovatus* mind a *B. vulgatus* törzsek 14,3%-a hordozta a gént, bár a törzsek száma lényegesen kevesebb volt.

A moxifloxacinra rezisztens *B. fragilis* törzsek közül csak két törzs hordozta a gént, míg a moxifloxacin rezisztens NFB törzsek között ez az arány 38,9% volt. Érdekes megfigyelés, hogy a moxifloxacin érzékeny NFB törzsek 42,4%-a (50/118) hordozta a *bexA* gént; míg a moxifloxacin érzékeny *B. fragilis* törzseknek csak 6,04%-a (11/182). Nem találtunk a moxifloxacinra mérsékeltén érzékeny törzsek között *bexA* gén hordozót, míg ez az arány a moxifloxacinra mérsékeltén érzékeny nem-fragilis törzsek között 62,5% volt: 8-ból 5 törzs hordozta a gént.

MDR *Bacteroides* törzsek molekuláris vizsgálata

Kutatócsoportunk 2014-ben Magyarországon elsőként publikált egy MDR *B. fragilis* törzset és részletesen jellemezte a rezisztencia mechanizmusok hátterét molekuláris diagnosztikai módszerekkel: egy 57 éves komorbid krónikus veseelégtelenség miatt dializált férfibeteg, aki osteomyelitis gyanújával került felvételre. Többszörös műtétek után a betegnél a kórházi bennfekvés során sigmoid kolon tumora igazolódott, így transzverzotómiát készítettek. 3 hét múlva a kontrollra jelentkezett beteg szubfebrilis volt, kevés szeropurulens váladékozást észleltek a sztóma körül, innen mintát küldtek mikrobiológiai tenyésztésre, illetve hemokultúra mintavétel is történt.

A minta anaerob tenyésztése során nagy csíraszámban (10^5 CFU/ml) egy *B. fragilis* törzset izoláltunk, illetve aerob módon néhány telep *Escherichia coli*-t. A kitenyésztett *B. fragilis* törzs antibiotikum MIC értékei: penicillin >256 mg/l, ampicillin >256 mg/l, amoxicillin/klavulánsav >256 mg/l, piperacillin/tazobaktám 64 mg/l, metronidazol 2,0 mg/l, imipenem >32 mg/l, meropenem >32 mg/l, cefoxitin >256 mg/l, clindamycin >256 mg/l, erythromycin >256 mg/l, tetracyclin >256 mg/l, tigecyclin 0,125 mg/l, moxifloxacin 0,5 mg/l.

A törzset a MALDI-TOF MS módszerrel egyértelműen identifikáltuk, magas log(score)-al, majd a következő lépésben a *cfiA*-pozitivitást erősítettük meg mind a MALDI-TOF módszerrel, mind PCR-el, a vizsgált törzs a *cfiA*-pozitív volt és a *B. fragilis* Divízió II-be tartozott. A rezisztenciáért felelős genetikai háttér részletes molekuláris feltérképezése során a törzs egy megfelelő helyzetben, upstream elhelyezkedő IS1187 inszerciós elem által aktivált *cfiA* gént hordozott, ami a karbapenem rezisztenciáért, illetve egy IS1168 elem által aktivált *nimA* gént hordozott, mely az alacsony szintű metronidazol rezisztenciáért volt felelős. A vizsgálat során a tetracyclin rezisztenciáért felelős *tetQ* gén jelenlétét és két plazmid (7,0 és 11,0 kb) hordozását igazoltuk a törzsben. A Southern-blott vizsgálat

kimutatta, hogy a *nimA* gén az IS1168 elemével együtt a 11,0 kb nagyságú plazmidon helyezkedett el. Az általunk izolált MDR törzsben feltérképezett IS1187 elem- és a *nimA*-IS1168 párok együttes jelenléte az eddigi irodalmi adatok alapján rendkívül ritka a karbapenem és metronidazol-rezisztens *B. fragilis* izolátumokban.

A magyarországi gyűjteményből származó 400 *Bacteroides* törzs között hat: 1 *B. fragilis*, 2 *B. ovatus*, 2 *B. vulgatus* és 1 *B. thetaiotaomicron* **MDR törzset** találtunk, ezek esetében a rezisztenciáért felelős gének kimutatása céljából részletes molekuláris vizsgálatokat végeztünk el. Az MDR bacteroidesek közül 1 származott a debreceni és 5 a szegedi centrumból, ugyanakkor a másik 2 centrumból származó izolátumok között nem volt MDR törzs. A *B. fragilis* SZ38 izolátum hordozta a *cfiA* gént, magas szintű rezisztenciát mutatott ampicillinnel, amoxicillin/klavulánsavval, cefoxitinnel és meropenemmel szemben, de a gén upstream régiójában nem mutattunk ki IS-elemet. Egyik izolátum sem hordozta a *cepA* gént, viszont 3 törzsben volt kimutatható a *cfxA* gén (*B. vulgatus* SZ4, *B. ovatus* SZ9 és *B. thetaiotaomicron* SZ35) és a *B. vulgatus* SZ4 törzs *cfxA* génjének 1,2 kb méretű regulátor régióját mutattuk ki. Négy törzs (*B. ovatus* D92, SZ9; *B. vulgatus* SZ34 és *B. thetaiotaomicron* SZ35) magasszintű clindamycin rezisztenciát (MIC>256 mg/l) mutatott, a *B. ovatus* D92 hordozta az *ermG*, míg a *B. vulgatus* SZ4 és a *B. thetaiotaomicron* SZ35 az *ermF* gént, a *B. ovatus* SZ9 mindkét gént. A *B. vulgatus* SZ4 és *B. thetaiotaomicron* SZ35 törzsben jelen volt a teljes hosszúságú IS4351 elem, de PCR-térképezéssel nem volt kimutatható semmilyen fizikai kapcsolat ezen IS-elem és az *ermF* gén között.

Az összes MDR törzs hordozta a *tetQ* gént, közülük 3 (*B. ovatus* D92, SZ9 és *B. fragilis* SZ38) mutatott magasszintű clindamycin rezisztenciát (MIC $\geq$ 32 mg/l), ezenkívül a *B. ovatus* SZ9, *B. vulgatus* SZ34 és a *B. thetaiotaomicron* SZ35 izolátumokban kimutatható volt a *tetX* gén is. Bár egyik törzs sem hordozta a *nim* gént, a *B. ovatus* D92 metronidazzollal szemben rezisztenciát mutatott. A fluorokinolon érzékenységi vizsgálatot moxifloxacin MIC meghatározással végeztük el: négy izolátum moxifloxacin MIC-értéke $\geq$ 32 mg/l volt, közülük csak a *B. thetaiotaomicron* SZ35 hordozta a *bexA* gént, a *B. fragilis* SZ38 *gyrA* génjének QRDR (Kinolon rezisztencia meghatározó szakasz: Quinolone-resistance determining region) régiójában szekvenálással mutáció jelenlétét vizsgáltuk, a GyrA alegységben Ser82-Phe szubsztitúciót igazoltunk.

A *B. fragilis* törzsek jelentős patogenitási faktorainak: enterotoxin és cisztein proteáz termeléséért felelős génjeinek vizsgálata

A gyűjtött **kétszáz** magyarországi *B. fragilis* izolátum közül RT-PCR vizsgálattal 26-ban (13%) igazoltuk a *bft* gén jelenlétét, melyek közül a PCR-RFLP eredményei alapján 20 hordozta a *bft-1* és 6 a *bft-2* izotípust, viszont a *bft-3* izotípust egyik sem. Vizsgálatunk során egy olyan ritka, általunk izolált törzset is azonosítottunk (*B. fragilis* SZ54), amely egyszerre hordozta a *cfiA* gént és a *bft-1* allélt. A *bfp1-4* (C10 proteáz gének) és *fpn* (C11 proteáz gén) gének jelenlétének RT-PCR-rel történő vizsgálata céljából 72 *B. fragilis* izolátumot választottunk ki (26 ETBF és 46 nem ETBF törzsek). A C10 proteáz gének megoszlása: 38 törzs hordozta a *bfp1* gént, 58 a *bfp2*-t, míg 17 a *bfp3*-at, de egyik izolátum sem volt pozitív a *bfp4* génre. Kilenc izolátum egyszerre hordozta a *bfp1*, *bfp2* és *bfp3* géneket, 22 a *bfp1* és *bfp2* géneket, 5 izolátum a *bfp2*-t és a *bfp3*-at, 1 törzs pedig a *bfp1*-et és a *bfp3*-at. A 26 *bft*-pozitív törzs közül 24 (92,3%) hordozta az *fpn* gént, ugyanakkor 46 *bft*-negatív izolátum közül 36-ból (78,3%) is kimutató volt az *fpn* gén.

Összefüggést kerestünk a *cfiA* és a *bfp* gének együttes hordozására: a *cfiA*-pozitív izolátumok közül 3 hordozta a *bfp1* és 2 a *bfp3* gént, ugyanakkor a *cfiA*-negatív törzsek közül 35 volt pozitív *bfp1*, 56 *bfp2* és 17 *bfp3* génekre. A 63 *fpn*-pozitív törzs közül egyik sem hordozta a *cfiA* gént, így a *cfiA* és *fpn* gének között szignifikáns negatív korreláció ($p<0,000$) igazolódott. Szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a *bfp2* és *fpn* gének ($p=0,0000803$) hordozása között, ugyanakkor szignifikáns negatív korrelációt a *bfp2* és *cfiA* gének ($p=0,011$)

között. Ezen génnek prevalenciájáról és egymással való korrelációjukról az irodalomban eddig csak kevés adatot közöltek.

5.3. A MALDI-TOF MS alkalmazása a humán, klinikai eredetű anaerob baktériumok azonosításában

Az első vizsgálatunkban 283, random módon kiválasztott klinikailag releváns anaerob izolátumot identifikáltunk MALDI-TOF módszerrel a Bruker Daltonik laboratóriummal (Bréma, Németország) együttműködve. A 249 izolátum, amiket a MALDI-TOF MS egyértelműen tudott identifikálni, 14 genushoz és 35 fajhoz tartozott.

218 (77%) izolátum esetében a MALDI-TOF MS species-szintű identifikációt adott $\log(\text{score}) > 2,0$ értékkel és 31 izolátumot (10,95%) genus szinten tudtunk identifikálni [$\log(\text{score}) 1,7-2,0$]; azonban egy izolátum kivételével (*Fusobacterium* sp.) ugyanazokat a fajneveket adta meg a Biotyper az első és a második legjobb találat helyén. Öt izolátum esetében (1,8%) (két *Bacteroides* sp. és három *Fusobacterium* sp.) az MS mérés nem adott fajszintű identifikációt; azonban a $\log(\text{score})$ -ok 1,988 és 2,465 között voltak. Harmincnégy izolátum esetében (12,0%) a MALDI-TOF MS mérés nem adott megbízható identifikációs eredményt, $< 1,7 \log(\text{score})$ -ral.

Fenotípusos módszerekkel tévesen azonosítottunk a MALDI-TOF módszerrel *B. fragilis*-nak bizonyuló 16 izolátumot és *B. thetaiotaomicron*-nak bizonyuló 7 izolátumot, ezek a fenotípusos módszerekkel a *Bacteroides/Prevotella* fajok széles variációját mutatták, azonban a szekvenálási eredmények 99–100% hasonlósággal erősítették meg a MALDI-TOF eredményeket. Két *B. ovatus* törzset azonosítottunk MALDI-TOF módszerrel 2,261 és 2,242 $\log(\text{score})$ -okkal, amelyek azonban szekvenálással *B. xylanisolvens*-nek bizonyultak (99,78%-os azonosság).

Négy *Clostridium* és hat *Prevotella* törzs esetében ellentmondásos species identifikációt adtak a konvencionális módszerek; azonban egy eset kivételével a szekvenálás a MALDI-TOF faj identifikációját erősítette meg. Hat Gram-pozitív coccust azonosítottunk fenotípusos identifikálással *Peptostreptococcus* spp.-ként. Közülük kettő a MALDI-TOF módszerrel *Finegoldia magna*- és *Gemella morbillorum*-nak bizonyult, azonban a másik négy törzs nem anaerob fajnak bizonyult, mindegyik eredményt a szekvenálás megerősítette. A négy izolátumból, amelynek a $\log(\text{score})$ értéke 1,7 és 2,0 között volt és a fenotípusos identifikálás eredménye különbözött a MALDI Biotyperrel kapott eredménytől, a szekvenálási adatok három izolátumban a MALDI-TOF MS identifikációt megerősítették, egy izolátumra a MALDI-TOF *C. baratii* [$\log(\text{score}) 1,727$], a fenotípusos identifikálás *C. fallax* eredményt adott, a 16S rRNS szekvenálás 99,77%-os homológiával *Clostridium* sp. eredményt adott. Az általános egyezés a MALDI-TOF és a szekvenálási adatok között azokra a törzsekre, ahol a fenotípusos identifikáció különbözött, 93,2%-nak bizonyult (41/44 törzs). A Gram-negatív anaerob izolátumok közül a hétből öt *Campylobacter ureolyticus* izolátum adott 1,750 és 1,985 közötti $\log(\text{score})$ -okat és a konvencionális módszerek ugyanazokat a fajidentifikációs eredményeket adták. Ugyanez igaz a hét *Actinomyces odontolyticus* izolátumból ötre, amelyeknek 1,730 és 1,947 között volt a $\log(\text{score})$ értékük és amelyekre a fenotípusos identifikáció ugyanazt a fajazonosítást adta.

A következő vizsgálatunkban 277 **klinikai *Bacteroides/Parabacteroides* sp.** izolátumot választottunk ki az európai törzsgyűjteményből, hogy identifikáljuk a MALDI-TOF MS módszerrel és a klasszikus fenotípusos identifikáló módszerekkel. A 277 izolátum közül 270-et egyértelműen [$\log(\text{score}) > 2,0$] sikerült identifikálni a MALDI-TOF MS módszerrel.

Hét izolátum esetén nem történt egyértelmű identifikálás, mivel nem állt rendelkezésre megfelelő referencia spektrum a vizsgálat időszakában az adatbázisban [$\log(\text{score}) < 1,7$]. Mind a hét izolátum esetében elvégeztük a 16S rRNS gén szekvenálást. A szekvenálási adatok egyértelműen alátámasztották a biokémiai azonosítási eredményeket három esetben (*P. distasonis*). A három másik izolátum, amelyet nem sikerült identifikálni a spektrumuk

alapján (amelyek a klasszikus biokémiai módszerek alapján *P. distasonis*-nak és *B. thetaiotaomicron*-nak bizonyultak), az ezutáni megismételt mérések során log(score) >2,5-ös értéket adtak. A három további MALDI-TOF-al nem megfelelően identifikált törzs a szekvenálás során *Bacteroides eggerthii*-nek, *P. goldsteinii*-nek és *B. intestinalis*-nak bizonyult.

Vizsgálataink során a módszer differenciáló kapacitása reprodukálhatónak bizonyult a több, párhuzamosan megismételt mérés során. Az újonnan leírt fajok, mint pl. a *B. salyersae* és a *B. nordii* is identifikálhatók MALDI-TOF MS módszerrel, a humán patogén *Bacteroides/Parabacteroides* fajok között egyértelműen különbséget tudott tenni a módszer.

A 270, MALDI-TOF által egyértelműen meghatározott izolátum közül 23 esetén kaptunk ellentmondó eredményt a klasszikus biokémiai módszerrel végzett identifikálás során. A 23 izolátumból 11 (amelynek a MALDI-TOF MS mérés során 2,0–2,5 közötti log(score)-ja volt), került kiválasztásra 16S rRNS gén szekvenálásra is. A szekvenálásból kapott adatok alátámasztották a MALDI-TOF MS eredményét 10 esetben, azonban egy esetben (ahol a MALDI eredmény *B. vulgatus* volt, 2,017-es log(score)-ral), a szekvenálás során nem jutottunk fajsztípusú identifikáláshoz, csak nemzetség (egy új *Bacteroides* sp.-hez) szintűhöz, a törzs a vizsgálataink alapján közeli rokonságot mutat a *B. uniformis*, *B. eggerthii* és *B. thetaiotaomicron* fajokhoz. A MALDI-TOF MS identifikáló, elválasztó képessége jobbnak bizonyult a biokémiai tesztekénél a *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* és *B. uniformis* fajok esetében.

A **Magyarországból** gyűjtött *Bacteroides* törzsek species szintű meghatározás vizsgálatban a résztvevő centrumokban történt identifikálás és a szegedi centrumban végzett ismételt azonosítás során a 400 törzs közül 379 (94,75%) esetében az identifikálás korrekt, fajsztípusú volt.

Huszonegy ellentmondásos, ismételt azonosítási eredményt adó törzs - 4 *B. fragilis* és 17 nem fragilis *Bacteroides* (7 *B. thetaiotaomicron*, 1 *P. distasonis*, 1 *B. cellulosilyticus*, 1 *B. salyersiae*, 1 *B. stercoris*, 1 *B. intestinalis*, 1 *B. vulgatus*, 2 *B. ovatus* és 2 *B. nordii*) - esetén a vizsgálatot 16S rRNS gén szekvenálással és rapid ID 32A teszttel egészítettük ki. A 21 izolátum közül 5 törzs log(score) értéke volt 2,000 alatti (1,993-1,802), 15 izolátum (71,42%, 15/21) MALDI-TOF MS és szekvenálási eredménye megegyezett. Rapid ID 32A teszttel mindössze 8 törzs (31,01%) esetén kaptunk kiváló (>95%) identifikálási eredményt. Mivel a rapid ID 32A teszt adatbázisa nem tartalmazta az újonnan leírt *B. cellulosilyticus*, *B. nordii*, *B. salyersiae* és a *B. xylanisolvens* biokémiai profilját, a *P. distasonis* SY2 izolátumot pedig *Capnocytophaga* sp.-ként identifikálta, ezen törzsek esetén a fenotípusos azonosítás eredménye nem volt elfogadható.

A szekvenálás pontossága minden esetben $\geq 98\%$ volt, kivéve az SY9 számú törzset, amely esetén ez az érték 95% lett. Az SY9, SY64 és SY81 *Bacteroides* törzsek esetén a MALDI-TOF MS és rapid ID 32A módszerekkel kapott identifikálási eredmények eltérőek voltak. Ennek magyarázata, hogy ezen törzsek filogenetikailag annyira közel állnak egymáshoz, hogy hagyományos biokémiai módszerekkel nem, vagy nehezen különíthetők el (SY9: *B. intestinalis*/*B. cellulosilyticus*; SY64: *B. nordii*/*B. salyersiae*; és SY81: *B. ovatus*/*B. xylanisolvens*). A *B. fragilis* SY23, *B. thetaiotaomicron* SY53 és a *B. fragilis* SE33 törzsek esetében a szekvenálás eredményét fogadtuk el.

Egyes anaerob specioseken belüli típusmeghatározás lehetőségei a MALDI-TOF MS módszerrel

A *Bacteroides fragilis* törzsek I.- (*cfiA*-negatív) és II. csoportjának (*cfiA*-pozitív) elkülönítése

A 277 klinikai *Bacteroides* sp. izolátumból, melyeket a MALDI-TOF MS-sel identifikáltuk fajsztípuson **145 *B. fragilis* izolátum** magas log(score)-os ($\geq 2,5$) spektrumát vizsgáltuk át és a munkacsoportunk által korábban már vizsgált és publikált eredményeinket felhasználva a *B. fragilis* II. csoportra jellemző csúcsokat kerestük. A Divízió I vagy II-be tartozást a MALDI Biotyper 3.1 software “*cfiA* identification” file (a közös tudományos

együttműködésünk segítségével a Bruker Daltonik, Bréma, Gr. által kifejlesztett módszer alapján történt. Méréseink alapján kilenc izolátum (6,2%) tartozott a *B. fragilis* II. csoportba, mind a kilenc izolátum PCR vizsgálattal *cfiA*-pozitívnak bizonyult, az imipenem MIC értékük <0,125 és >32 mg/l között volt. Még a „silent” *cfiA* gént hordozó izolátumokat is ki tudtuk mutatni ezzel a módszerrel. Az alcsoportra jellemző csúcsok közül kettő (4826 és 9649 Da) megtalálható volt mind a kilenc törzsben és egy harmadik (9375 Da) a kilenc törzs közül nyolcban volt jelen.

Saját klinikai anyagunkból **hatvan *B. fragilis* törzset** vizsgáltunk, mindegyik törzs species-szintű identifikációja a MALDI-TOF/MS módszerrel, majd a Divízió I vagy II-be tartozást a MALDI Biotyper 3.1 software “*cfiA* identification” file alapján történt. Kerestük a *cfiA* rezisztencia gén jelenlétét is PCR módszerrel és meghatároztuk az imipenem MIC értékeket is. A vizsgált 60 *B. fragilis* törzsből 5 tartozott a Divízió II-be, ezek mindegyike hordozta a *cfiA* gént, azonban négy törzs érzékeny volt imipenemre (az egyik egy heterogén fenotípusú törzs: *B. fragilis* 88768), csak egy törzs volt rezisztens. Molekuláris genetikai vizsgálataink alapján a *cfiA* gén upstream régiója egy IS elemet (IS1187) hordozott, mely a karbapenem rezisztencia gén aktiválásáért, így a rezisztencia kifejeződéséért, a fenotípusos megjelenésért felelős.

A magyarországi vizsgálatban gyűjtött törzsek közül a MALDI-TOF Biotyper 3.1 szoftver “*cfiA* identification project file” segítségével megvizsgáltunk **200 *B. fragilis* törzset**. 20 izolátum tartozott (10%) a Divízió II-be és RT-PCR módszerrel azt is igazoltuk, hogy ezek közül az összes hordozta a *cfiA* gént. A módszerrel Division II-be tartozó törzsek közül 17 volt fenotípusosan rezisztens meropenemre (MIC≥16 mg/l), egy izolátum MIC értéke 8 mg/l volt, egy másiké 4 mg/l és egy izolátum MIC értéke 0,25 mg/l volt.

A Cutibacterium (Propionibacterium) acnes I., II. és III. filotípusok elkülönítése

61 *C. acnes* izolátumot vizsgáltunk, a legtöbb törzs (49) friss klinikai izolátum volt a SzTE KMDI-ből, különböző humán mintákból származtak, figyelmen kívül hagytuk, hogy valódi patogén volt-e vagy hemokultúra kontamináció. A törzsek között volt egy általunk már kazuisztikaként publikált ritka, bizonyítottan granulomatózus traumatológiai infekciót okozó *C. acnes* törzs is és egy hemokultúrából származó, MLST tipizálással II. típusúhoz tartozó. Tizenkét referencia törzset vontunk be korábban publikált ismert tipizálási eredményekkel, beleértve az ATCC 11828-at (II. típus). Tizenegy *C. acnes* törzset: négy IA1 és IA2 típus (PRP-60, P.acn33, P.acn17, és P.acn31), egy egészséges bőrfelszínről származó apatogén IB típus: 6609 (előzőleg már publikáltuk a törzs teljes genom szekvenálását: Hunyadkúrti J. *et al.* 2011), egy IC típus: PRP-38, két II típus: ATCC11828 (előzőleg már publikáltuk a törzs teljes genom szekvenálását: Horváth B. *et al.* 2012) és egy klinikai izolátum ismert MLST típusúval ezen vizsgálat kezdetétől: 76618 HU) és három III típust (12S, Asn12 és Asn10) ismert MLST típusokkal választottunk ki az első mérésre.

A MALDI Biotyper rendszerrel történt rutin mérések után a tömegspektrumok közötti különbségeket kerestük. A különböző *C. acnes* törzsek spektrumai a csúcspozíciók csak néhány variációjában mutattak nagy mértékű hasonlóságot, azonban néhány csúcs szignifikáns variációt mutatott és ezek összhangban voltak a különböző *C. acnes* típusokkal.

19 klinikai izolátumot találtunk a MALDI-TOF méréssel a *C. acnes* IA típusába tartozónak, azonban az IA1 és IA2 alcsoportokat nem tudtuk megkülönböztetni, míg az MLST tipizálásnál mindegyik IA1 altípus izolátumnak bizonyult. Olyan *C. acnes* klinikai izolátumot nem találtunk a vizsgálat során, ami az IA2 altípushoz tartozott volna az MLST tipizáláskor. Huszonegy klinikai izolátumot találtunk IB típusúnak mind a MALDI-TOF MS-sel mind az MLST-vel (köztük volt a granulomatózus traumatológiai infekciót okozó *C. acnes* törzs), nyolc klinikai izolátum bizonyult a *C. acnes* II csoportjához tartozónak mindkét tipizálási módszerrel. A MALDI-TOF MS-sel vizsgált öt III-as típusú *C. acnes* törzsből egy törzsnek (Asn10) volt a közös (és egyedi) III-as típusú izolátumokra jellemző csúcson kívül (7238 Da) egy kicsit különböző MS mintázata (a megjelenő 7063 Da csúccsal minden más III. típusú törzs esetében), aminek 7004 Da csúcsa volt kimutatható. III/1 típusnak jelöltük.

A MALDI-TOF mérést alkalmazva mind a 61 izolátumot hat külön csoportba tudtuk osztani, amelyek megfeleltek az IA, IB, IC, II, III és III-1 filotípusoknak, egy összesen 71%-os D értékkel (95% CI 65,0–76,6). A jobban megkülönböztető MLST megközelítést alkalmazva összesen 28 csoportot tudtunk elkülöníteni, amik megfeleltek az eltérő ST-nek, 90%-os D értékkel (95% CI 83,4–94,9) ($p < 0,001$) ezen a saját izolátum gyűjteményen alapulva. A két módszer közötti teljes konkordancia a korrigált Rand értékkel 45,6% volt (95% CI 26,6–65,5). Míg az MLST megközelítés –mint ahogy számítottunk rá–, sokkal megkülönböztetőbb volt, jó korrelációt kaptunk a két módszer között, amikor csak a filocsoport elkülönítésre használtuk és nem a törzs elkülönítésre; habár, a törzsek, amiket IA típusnak identifikáltunk a MALDI-TOF-al, az MLST-vel IA1 és IA2 filocsoportokba voltak besorolhatóak. Ezen az alapon a két módszer közötti teljes konkordancia a korrigált Rand értékkel 91% volt (95% CI 81,9–100) a filocsoport elkülönítésre.

7. Az értekezés legfőbb megállapításai, újdonságai

Munkám során a legfontosabb humán patogén anaerob baktériumok szerepét vizsgáltam klinikai témában, Az értekezésben prezentált klinikai-kísérletes munka legfőbb megállapításai a következőkben foglalhatók össze:

Vizsgálatok a *C. difficile* törzsekkel:

- Munkacsoportunk Magyarországon elsőként jellemzett nagyszámú *C. difficile* törzset molekuláris diagnosztikai módszerekkel: irodalmi adatok alapján összeállított, saját „home-made” PCR módszert validáltunk, majd megvizsgáltuk a hasmenéses székletmintákból származó izolátumok esetében a toxinok (így a binary toxin is) termeléséért felelős *cdtA*, *cdtB*, *tcdA* és *tcdB* gének jelenlétét és az A toxin gén 3'-végében lévő deléciót, vagy inszerciót.

- Megteremtettük a toxin-termelő *C. difficile* törzsek által okozott infekciók magyarországi diagnosztikájának alapjait. Megteremtettük a prospektív, folyamatos, országos nyomon követését a sporadikus nozokómiális-, illetve behurcolt *C. difficile* eseteknek, járványoknak hazánkban.

- Vizsgálataink során a *C. difficile* ribotípusok elterjedésének térbeli és időbeli változását hasonlítottuk össze Magyarország különböző területeiről, egymást követő időszakokban gyűjtött törzsek esetén. A különböző ribotípusok eloszlásával összefüggésben megfigyeltük mind a hazai, regionális, mind a nemzetközi különbségeket és a különböző ribotípusok prevalenciájának változását az idő múlásával. Az 1998-as első, helyi vizsgálataink során a 087-es ribotípus volt a domináns ribotípus (toxin-termelő törzsek 50%-a), binary toxin-termelő törzset nem találtunk, a második 2002-es vizsgálatunk során két binary toxin-termelő törzset találtunk. 2002-2004 közötti vizsgálatunkban a leggyakoribb típus a 014-es ribotípus volt (24,8%). Ezekben az időszakokban nem találtunk A toxin-negatív és B toxin-pozitív izolátumokat. Munkacsoportunk írta le, jellemezte és izolálta az első magyar bizonyított 027-es ribotípusú *C. difficile* törzset 2007-ben.

- Későbbi vizsgálataink során igazoltuk az akkor már domináns 027 ribotípus elterjedését Magyarországon: 2010-ben már a toxin-termelő *C. difficile* izolátumok 30,4%-a bizonyult 027-es ribotípusúnak, emellett öt egyéb, binary toxin-pozitív izolátumot találtunk, 2011-ben már az izolátumok 50,2%-a bizonyult a 027-es ribotípusúnak. Ebben az időszakban hét, más ribotípusba tartozó binary toxin-pozitív izolátumot találtunk. 2014-ben a 027-es ribotípus, bár csökkenő arányú, de még mindig meglévő dominanciája (33,3%) mellett jelentős különbség volt megfigyelhető a régiókban a domináns törzstípus arányában: szignifikáns különbséget találtunk a 027-es ribotípusú törzsek regionális megoszlása között. A 2018-ban gyűjtött szegedi fekvőbeteg izolátumaink eredményei azt mutatták, hogy a SZTE klinikáin még mindig jelen van és domináns a 027-es ribotípus (40%-os előfordulás), igen jelentős a binary toxin-termelő törzsek előfordulása (59%), azonban a domináns ribotípus mellett a többi 24 különböző ribotípus reprezentáltsága jóval alacsonyabb volt, 1-5

eset/ribotípus. Az előző vizsgálatainkhoz képest azt találtuk, hogy helyileg a ribotípusok diverzitása 2018-ban már sokkal szélesebb volt, mint az előző vizsgálatainkban.

- Magyarországon elsőként alkalmaztunk a rutin diagnosztikában a kereskedelmi forgalomban kapható, új molekuláris diagnosztikai módszert és hasonlítottuk össze eredményeit a "gold standard"-ként használt szövettényészet citotoxicitási vizsgálattal és a kereskedelembe beszerezhető enzimhez kötött fluoreszcencia immunvizsgálattal (ELFA) az A és B toxinok közvetlen kimutatására hasmenéses székletmintákból. Azt találtuk, hogy a módszer érzékenysége, specificitása, PPV- és az NPV-értéke 96,4%, 99,01%, 92% és 100% volt. A PCR módszer gátlása (inhibitoros minták) vizsgálatunkban 0,6% (4/600) volt; hasonlóképpen az irodalomban fellelhető adatokhoz.

- Elsőként vizsgáltuk és publikáltuk a magyarországi, hasmenéses székletmintákból izolált *C. difficile* törzsek antibiotikum érzékenységét, ennek időbeli változását, illetve vizsgáltuk a törzsek érzékenységét a CDI esetek kezelésére újonnan bevezetett antibiotikummal a fidaxomicinnel szemben. Eredményeink azt mutatták, hogy Magyarországon a *C. difficile* törzsek erythromycin, clindamycin és moxifloxacin rezisztencia aránya mindkét vizsgált időszakban magas volt, a két időtartam alatt szignifikáns változást nem észleltünk a rezisztens törzsek prevalenciájában. Megállapítottuk, hogy az erythromycin, clindamycin és moxifloxacin esetében a MIC₅₀ és a MIC₉₀ értékek nem változtak a vizsgálati időszak alatt szignifikánsan, azonban vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy a társ-rezisztencia a makrolid/linkozamid, moxifloxacin és rifampicin esetében megjelent és jelentősen emelkedett a nem 027-es ribotípusú *C. difficile* törzsek esetében is. A rifampicin esetében a mért MIC szélső értékek meglehetősen tág határok között változtak, azonban 2008-2010-ben már a törzsek 11,5%-a magas fokú rifampicin rezisztenciát mutatott, míg a 2006-2007-es időszakban még csak a vizsgált törzsek 6,25%-a volt magas szinten rezisztens. Ennek ellentmondanak a nemzetközi eredmények, más országokban a rifampicin rezisztens izolátumok aránya -ha kis mértékben is- de csökkent. Az általunk vizsgált időszakokban a magyarországi *C. difficile* törzsek között a szerek fokozott felhasználása ellenére sem találtunk metronidazol és vancomycin rezisztens törzseket.

- A fidaxomicin érzékenységi vizsgálatunk során a vizsgált törzsek fidaxomicin MIC értékek megoszlása hasonló megoszlást mutatott, mint az EUCAST adatbázisában található „vad típusú” törzseké. A binary toxin-termelő izolátumok esetében nem találtunk jelentős különbséget a fidaxomicin érzékenységben az egyéb, más ribotípusba tartozó *C. difficile* törzsek között, hasonlóan az irodalomban közölt adatokhoz.

- Hazánkban először kazuistikaként leírtunk egy ritka, extraintesztinális *C. difficile* infekciót, melyet egy molekuláris diagnosztikai módszerekkel részletesen jellemzett, 014-es ribotípusú, XVIII-as toxin-típusú, A és B toxin-termelő, binary toxin-negatív törzs okozott.

- Saját 10 éves beteganyagunkban megvizsgáltuk az extraintesztinális *C. difficile* fertőzések előfordulását: megállapítottuk, hogy az extraintesztinális *C. difficile* infekciók előfordulása hazánkban is ritka, 0-4 eset/év, a vizsgált periódusban az összes CDI eset 0,57%-a. A betegek 36,7%-a volt járóbeteg, közülük négynek volt valamilyen bőr- és légúti rész infekciója. A legtöbb esetben a *C. difficile* törzs a vegyes, aerob-anaerob flóra tagja volt, 4 minta esetében izoláltuk a kórokozót színtényészetben, a leggyakoribb társpatogének az *E. coli* és az *E. faecalis/faecium* voltak, négy beteg mintáiban csak anaerob kórokozó volt jelen társpatogénként. A törzsek toxin-termelését 19 izolátum esetében határoztuk meg és 79%-uk bizonyult A és B toxin-termelőnek, a 14 törzs esetében, ahol a ribotipizálást elvégeztük a törzsek 50%-a tartozott a 027 PCR ribotípusba, három törzs viszont a más országokban ritka előfordulása, magyarországi 198-as PCR ribotípusba tartozott.

Vizsgálatok a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsekkel:

- Munkacsoportunk nemzetközi kooperáció eredményeképpen több európai országból gyűjtött *Bacteroides/Parabacteroides* izolátumokat, majd antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat végeztünk standardizált módon, vizsgáltuk a különböző *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek antibiotikum-érzékenységét: kerestük a fajok

közötti- illetve a régiófüggő különbségeket. Eredményeinket összehasonlítottuk az elmúlt 20 évben végzett európai szintű nagy felmérések eredményeivel, így nyomon követtük a rezisztencia-arányok alakulását. Az évek során az imipenem és a metronidazol-rezisztenciában nem tapasztaltunk jelentős változásokat, a többi antibiotikum esetében azonban a rezisztencia arányok jelentősen változtak, számottevő különbségeket találtunk a különböző fajok esetében is. A 20 év során végzett három európai vizsgálat eredményei egy vagy több anti-anaerob szerrel szembeni rezisztencia-arányok igen jelentős földrajzi különbségeit tárták fel, valószínűleg a különböző országokban az általános antibiotikum használat különbségei miatt.

- Elsőként végeztük el nagy számú, Magyarország különböző területeiről származó, klinikailag releváns *Bacteroides/Parabacteroides* csoportba tartozó izolátum antibiotikum érzékenységeinek vizsgálatát tíz antibiotikummal szemben, standard agar dilúciós módszert használva. Vizsgáltuk az antibiotikum-rezisztencia alakulását, adatainkat összehasonlítottuk a korábban publikált hazai, nemzetközi adatokkal. Tanulmányunk bizonyította az ampicillin rezisztencia magas arányát, de az amoxicillin/klavulánsavval szemben csak az izolátumok 4,5%-a mutatott rezisztenciát. Azt találtuk, hogy a cefoxitin, tetracyclin és moxifloxacin rezisztencia aránya erősen fajfüggő volt, kiemelkedően magas volt a meropenem rezisztens törzsek aránya (7%), az izolátumok 8,58%-a hordozta a *cfiA* gént. Clindamycin esetén 36,75%-os volt a rezisztens törzsek aránya, amely jelentős faj szerinti és földrajzi variációt mutatott. A metronidazol, tigecyclin és a chloramphenicol kiváló aktivitást mutatott a vizsgált izolátumokkal szemben.

- A nemzetközi szakirodalomban meglehetősen kevés az a vizsgálat, amely a *bexA* gén előfordulását vizsgálja humán klinikai eredetű *Bacteroides* törzsek között. A vizsgált 400 törzs 20,5%-a hordozta a *bexA* gént és a NFB törzsek között szignifikánsabban magasabb volt a gén prevalenciája (főként a *B. thetaiotaomicron* törzsek között), mint a *B. fragilis* izolátumok között. A moxifloxacin érzékeny NFB törzsek 42,37%-a hordozta a *bexA* gént; míg a moxifloxacin érzékeny *B. fragilis* törzseknek csak 6,04%-a. Előző vizsgálatunkhoz képest azt találtuk, hogy mind a moxifloxacin rezisztens törzsek aránya, mind a *bexA* gén prevalenciája emelkedett és jóval több NFB izolátum hordozta a gént.

- Elsőként írtunk le Magyarországon (és a Kelet-európai régióban is) és jellemeztünk részletesen egy multirezisztens klinikai *B. fragilis* izolátumot, majd vizsgáltuk a magyarországi MDR klinikai izolátumok antibiotikum rezisztencia génjeinek és egyéb genetikai elemeinek jelenlétét molekuláris diagnosztikai módszerekkel. A vizsgált 400 *Bacteroides* izolátum közül 6 MDR törzset azonosítottunk, majd molekuláris vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az MDR izolátumok antibiotikum rezisztenciájának molekuláris háttere törzsenként eltért.

- Vizsgálataink során irodalmi adatok alapján összeállított, saját „home-made” PCR módszert validáltunk, majd megvizsgáltuk a különböző klinikai mintákból származó *B. fragilis* törzsek enterotoxin gén (*bft*) hordozásának arányát, jellemeztük ezek izotípusait, meghatároztuk a C10 és C11 cisztein proteáz géneket (*bfp1-4*, *fpn*), adatainkat összehasonlítottuk az előző hazai, illetve a nemzetközi adatokkal. Az izolátumok 13%-a hordozta a *bft* gént, amely hasonló mértékű az általunk korábban közölt eredménnyel összehasonlítva (8,7%). Az izolátumok többsége a *bft-1* allélt hordozta, 23,1%-a a *bft-2*-t, ugyanakkor *bft-3* allélt egyetlen izolátum sem tartalmazta.

- Azonosítottunk egy olyan ritka, különleges *B. fragilis* törzset, amely egyidejűleg hordozta a *cfiA* és a *bft* gént és annak izotípusát. A *bft*-pozitív törzsek között 24 hordozta az *fpn* gént, amely igazolja a fragipainnak a *B. fragilis* enterotoxin aktiválásában betöltött kulcsszerepét.

MALDI-TOF MS alkalmazása az anaerob baktériumok diagnosztikájában

- Hazánkban először alkalmaztuk a MALDI-TOF módszert anaerob baktériumok species-szintű identifikálására: azt találtuk, hogy a klinikailag releváns mintákból nyert anaerob izolátumok esetében a MALDI-TOF MS módszer 86,2%-ban tudta azonosítani egy

rutin diagnosztikai laboratórium mindennapos anyagából véletlenszerűen kiválasztott klinikai anaerob izolátumokat faji szinten. A fajsztípusú identifikáció a gyártó által javasoltnál alacsonyabb log(score)-ral elfogadásra kerülhet és ezt az eredményt a szekvenálás megerősítette. Úgy találtuk, hogy a MALDI-TOF MS teljesítménye számos tényezőtől függ, a helyes fajsztípusú identifikáció arányát párhuzamos mérésekkel és a teljes extrakciós módszerrel javíthatjuk, ha a közvetlen telepből elvégzett mérés alkalmazása nem ad fajsztípusú identifikációt.

- Tanulmányoztuk a MALDI-TOF MS profilok alkalmazhatóságát a különböző, *Bacteroides/Parabacteroides* csoportba tartozó klinikailag releváns izolátumok species szintű identifikálására. Elvégeztük a módszer verifikálását, 3 párhuzamos méréssel és ezek eredményeinek összehasonlításával, ellentmondásos eredmények esetén 16S rRNS gén szekvenálással egészítettük ki az azonosítást, és bizonyítottuk a MALDI-TOF MS módszer igen nagy pontosságú, faj szerinti identifikáló képességét a *B. fragilis* csoport tagjai körében.

- A MALDI-TOF MS módszert alkalmaztuk olyan, filogenetikailag két különböző csoportot alkotó *B. fragilis* izolátumok elkülönítésére, melyek hordozzák a karbapenem rezisztenciáért felelős *cfiA* gént, illetve amelyek nem (a Divízió I és II). Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a törzsek egy *cfiA*-negatív specifikus és egy *cfiA*-pozitív specifikus *B. fragilis* I. és II. csoportba voltak sorolhatóak a törzs spektrum jellemzők alapján. Munkacsoportunk a Bruker Daltonik céggel kutatási együttműködés során segítséget nyújtott olyan MALDI Biotyper szoftver kifejlesztésében, mely vizsgálataink alapján bizonyította a módszer alkalmasságát a *B. fragilis* I. és II. csoportjának megkülönböztetésére.

- Értékeljük az MS-alapú tipizálási módszer eredményességét a humán kórfolyamatokból izolált és a kontamináns *Cutibacterium acnes* törzsek esetén és azt találtuk, hogy a módszerrel történő típusmeghatározása során az MLST-tipizálás eredményével megegyező típusok (IA, IB, II, III) azonosítására volt lehetőség a species meghatározást követő speciális tömegspektrum-analízis alapján. A módszer lehetőséget adhat a *C. acnes*-izolátumok esetében a típusok és szubtipusok elkülönítése révén a kontamináns vagy valódi patogén kérdés eldöntésében mély szövetekből nyert, hemokultúra és egyéb klinikai mintából történő izolálás során.

Az értekezésben bemutatott eredmények jelentőségét egyrészt abban látom, hogy azok a kutatóhelyen egy Magyarországon egyedüli klinikai kutatási témában és részben újonnan kialakított sikeres nemzetközi, több országra kiterjedő kooperációk eredményeképpen jöttek létre. Másrészt maguk az általunk kapott adatok, ill. feltárt összefüggések jelentősége mind epidemiológiai, mind diagnosztikus szempontból, mind a betegek terápiájának vezetése szempontjából fontos tényezők.

Jelenleg Magyarországon a különböző fekvőbeteg intézményekben nincsenek elérhető adatok a *C. difficile* törzsek ribotípusáról, valamint a 027-es ribotípusú járványtörzs cirkulációjáról, eredményeink rávilágítanak arra, hogy egyes kórházakban, osztályokon a még mindig járványtörzs fokozott előfordulásával kell számolni. A fentiek fokozott járványügyi teendők szükségességét indokolják, az eredményeink igazolják, hogy időszakosan szükséges az izolátumok domináns PCR ribotípusának meghatározása, majd esetenként az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok kivitelezése a sporadikus esetek, illetve a lokálisan előforduló járványok igazolására.

Eredményeink alátámasztották, hogy a humán klinikai mintákból leggyakrabban izolált anaerob *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek rendszeres, antibiotikum érzékenységi vizsgálata, a rezisztenciáért felelős gének elterjedtségének monitorozása rendkívül fontos a pontos helyi és nemzeti antibiotikum rezisztencia adatok nyerése, illetve kritikus a betegek számára a megfelelő antibiotic terápia választása szempontjából.

Vizsgálataink alapján egyértelmű, hogy a MALDI-TOF MS használatának egyik fő előnye az anaerob infekciók diagnosztikájában a megtakarított idő, ez az időfaktor kritikus a súlyos alaphetegségekben szenvedő betegeknél, immunhiányos betegeknél, sebészeti, intenzív osztályokon fekvő, lélegeztetett szeptikus betegeknél a helyes, célzott terápia miatt.

8. Irodalomjegyzék

- al Saif N, Brazier JS: The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. *J Med Microbiol* 1996;45(2):133-7.
- Ambler J, Rennie R, Poupard J, Koeth L, Stass H, Endermann R, *et al*: Determination of moxifloxacin anaerobic susceptibility breakpoints according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;61:49-57.
- Bagdasarian N, Rao K, Malani PN: Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review. *JAMA* 2015;313(4):398-408.
- Boyanova L, Kolarov R, Mitov I: Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. *Anaerobe* 2015;31:4-10.
- Börnigen D, Morgan XC, Franzosa EA, Ren B, Xavier RJ, Garrett WS. *et al.*: Functional profiling of the gut microbiome in disease-associated inflammation. *Genome Medicine* 2013;5:65 <http://genomemedicine.com/content/5/7/65>
- Centers of Diseases Control and Prevention: Multidrug-Resistant *Bacteroides fragilis* – Seattle, Washington, 2013. CDC Morbidity and Mortality Weekly Report 2013;62:694-696.
- Chung L, Thiele Orberg E, Geis AL, Chan JL, Fu K, DeStefano Shields CE, *et al.*: *Bacteroides fragilis* toxin coordinates a pro-carcinogenic inflammatory cascade via targeting of colonic epithelial cells. *Cell Host Microbe* 2018;23(2):203-214.
- Claros MC, Claros ZC, Hecht DW, Citron DM, Goldstein EJ, Silva J, *et al.*: Characterization of the *Bacteroides fragilis* pathogenicity island in human blood culture isolates. *Anaerobe* 2006;12:17-22.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. 2011. CLSI document M100-S21. ISBN 1-56238-742-1.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. 2006. CLSI document M100-S168-7. ISBN 1- 56238-588-7.
- Crobach MJ, Planche T, Eckert C, Barbut F, Terveer EM, Dekkers OM, *et al.*: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect* 2016;22Suppl4:S63.
- Garrett WS, Onderdonk AB: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, and *Fusobacterium* species (and other medically important anaerobic Gram-negative bacilli). *in* Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (8th Edition), 2015.
- Hartmeyer GN, Sóki J, Nagy E, Justesen US: Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* group
- Husain F, Veeranagouda Y, Hsi J, Meggerse R, Abratt V, Wexler HM: Two Multidrug-Resistant clinical isolates of *Bacteroides fragilis* carry a novel metronidazole resistance *nim* gene (*nimJ*). *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(8):3767-3774.
- Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, Hasenberger P, Kernbichler S, Fiedler A, *et al.*: Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping. *J Med Microbiol* 2008;57:1377-1382.
- Jousimies-Somer HR, Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Wexler HM, Finegold SM: Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual. 2002. 6th ed. Belmont, CA Star Publishing
- Kato H, Kato N, Watanabe K, Iwai N, Nakamura H, Yamamoto T, *et al.*: Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. *J Clin Microbiol* 1998;36:2178-2182.
- Kato N, Chin-Yih Ou H, Kato S, Bartley VK, Brown VR, Dowell JR, *et al.*: Identification of toxigenic *Clostridium difficile* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991;29:33-37.
- Katsandri A, Papaparaskevas J, Pantazatou A, Petrikkos GL, Thomopoulos G, Houhoula DP, *et al.*: Two cases of infections due to multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* group strains. *J Clin Microbiol* 2006;44:3465-3467.
- Kim JM, Lee JY, Yoon YM, Oh YK, Kang JS, Kim YJ, *et al.*: *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces cyclooxygenase-2 and fluid secretion in intestinal epithelial cells through NF-kappaB activation. *Eur J Immunol* 2006;36:2446-2456.
- Kinross JM, Darzi AW, Nicholson JK: Gut microbiome-host interactions in health and disease. *Genome Medicine* 2011;3:14 www.genomemedicine.com/content/3/3/14.
- Kling JJ, Wright RL, Moncrief JS, Wilkins TD: Cloning and characterization of the gene for the metalloprotease enterotoxin of *Bacteroides fragilis*. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 146:279-284.

- Könnönen E, Wade WG, Citron DE: *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* and other anaerobic Gram-negative rods. Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition, American Society of Microbiology. 2011.
- Kuijper EJ, Coignard B, Tull P: Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect 2006;12(Suppl. 6):2-18.
- Lamont JT, Kelly CP, Bakken JS: *Clostridioides* (formerly *Clostridium*) *difficile* infection in adults: clinical manifestations and diagnosis. Up to Date 2018. <https://www.uptodate.com/contents/clostridioides-formerly-clostridium-difficile-infection-in-adults-treatment-and-prevention>
- Lawson PA, Citron DM, Tyrrell KL, Finegold SM: Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. Anaerobe 2016;40:95-99.
- Lederberg J, McCray AT: Ome Sweet'Omic-A Genealogical Treasury of Words. The Scientist 2001;15(7):8.
- Moncrief JS, Obiso R, Barroso LA, Kling JJ, Wright RL, Van Tassell RL, *et al.*: The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. Infect Immun 1995;63:175-181.
- 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 2011;60:1584-1590.
- Nagy E, Schuetz A: Advancing MALDI-TOF MS applications in anaerobic bacteriology. Anaerobe 2018;54:189-190.
- Nakamura I, Aoki K, Miura Y, Yamaguchi T, Matsumoto T: Fatal sepsis caused by multidrug-resistant *Bacteroides fragilis*, harbouring a *cfiA* gene and an upstream insertion sequence element, in Japan. Anaerobe 2017;44:36-39.
- Prindiville T, Sheikh R, Cohen S, Tang Y, Cantrell M, Silva J: *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene sequences in patients with inflammatory bowel disease. Emerg Infect Dis 2000;6:171-174.
- Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN: *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology 2009;7(7):526-536.
- Sears CL: The toxins of *Bacteroides fragilis*. Toxicon 2001;39:1737-1746.
- Spigaglia P, Mastrantonio P: Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates. J Clin Microbiol 2002;40:3470-3475.
- Stubbs SL, Rupnik M, Gibert M, Brazier JS, Duerden BI, Popoff M: Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *C. difficile*. FEMS Microbiol Lett 2000;186:307-312.
- Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI: PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. J Clin Microbiol 1999;37:461-463.
- Sundriyal A, Roberts AK, Ling R, McGlashan J, Shone CC, Acharya KR: Expression, purification and cell cytotoxicity of actin-modifying binary toxin from *Clostridium difficile*. Protein Expr Purif 2010;74(1):42-8.
- Toprak NU, Yagci A, Gulluoglu BM, Akin ML, Demirkalem P, Celenk T, *et al.*: A possible role of *Bacteroides fragilis* enterotoxin in the aetiology of colorectal cancer. Clin Microbiol Infect 2006;12:782-786.
- Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cabana MD, Gibson G, Hentges E, *et al.*: Human gut microbiota and its relationship to health and disease. Nutr Rev 2011;69:392-403.
- Wexler AG, Goodman AL: An insider's perspective: *Bacteroides* as a window into the microbiome. Nat Microbiol 2017;2:17026.
- Xu J, Gordon JI: Honor thy symbionts. Proc Natl Acad Sci 2003;100(18):10452-10459.

9. Publikációs adatok

9.1. Az értekezés alapját képező *in extenso* közlemények

A PhD megszerzése (2002) előtt:

- Urbán E**, Brazier JS, Sóki J, Nagy E, Duerden BI: PCR ribotyping of clinically important *Clostridium difficile* strains from Hungary. *Journal Med Microbiol* 2001;50:1082-1086. IF: 1,762
- Urbán E**, Sóki J, Brazier JS, Nagy E, Duerden BI: Prevalence and characterization of *nim* genes of *Bacteroides* spp. isolated in Hungary. *Anaerobe* 2002;4:175-179. IF: 0,575
- Tusnádi A, Bakró I, **Urbán E**, Nagy E: *Clostridium difficile* hasmenés két megyei kórházban *Infektológia és Klinikai Mikrobiológia* 2000;7:133-135.
- Urbán E**, Terhes G, Nagy E: Milyen gyakran kell számolni fekvőbeteg intézetben *Clostridium difficile* által okozott hasmenéssel? *Infekt Klin Mikrobiol* 2000;7:136-139.
- Urbán E**, Tusnádi A, Terhes G, Nagy E: Prevalence of gastrointestinal disease caused by *Clostridium difficile* in a university hospital in Hungary. *Journal Hosp Infect* 2002;51:175-178. IF: 1,909

A PhD megszerzése (2002) után:

- Eitel Z, Terhes G, Sóki J, Nagy E, **Urbán E**: Investigation of the MICs of fidaxomicin and other antibiotics against Hungarian *Clostridium difficile* isolates. *Anaerobe* 2015;31:47-49. IF: 2,424
- Fenyvesi VS, **Urbán E**, Bartha N, Ábrók M, Kostrzewa M, Nagy E, Minárovits J, Sóki J: Use of MALDI-TOF/MS for routine detection of *cfiA* gene-positive *Bacteroides fragilis* strains. *Int J Antimicrob Agents* 2014;44:474-475. IF: 4,296
- Freeman J, Vernon J, Morris K, Nicholson S, Todhunter S, Longshaw C, Wilcox MH, *et al.*: (**E. Urbán** Kollaborációs közreműködő) Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:248.e9-248.e16. IF: 4,575
- Gajdács M, Spengler G, **Urbán E**: Identification and antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: Rubik's cube of clinical microbiology? *Antibiotics* 2017;(6)4: E25.
- Körmöndi S, Terhes G, Pintér S, **Urbán E**: Granulomatous *Propionibacterium acnes* infection after trauma surgery. *Anaerobe* 2011;17:259-261. IF: 2,409
- Nagy E, Ábrók M, Bartha NA, Bereczki L, Juhász E, Kardos G, Kristóf K, Miszti C, **Urbán E**: Mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésen alapuló tömegspektrometria speciális alkalmazása a klinikai mikrobiológiai diagnosztika területén. *Orv Hetil* 2014;155:1495-1503.
- Nagy E, Ábrók M, **Urbán E**, Veloo ACM, Winkelhoff AJ, Dekio I, Gharbia ES, Shah HN: Transformation of Anaerobic Microbiology since the Arrival of MALDI-TOF Mass Spectrometry. *In: Haroun, N Shah; Saheer, E Garbia (szerk.) MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology*. New York, Amerikai Egyesült Államok: Wiley, 2017; 123-146.
- Nagy E, Becker S, Kostrzewa M, Barta N, **Urbán E**: The value of MALDI-TOF MS for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in routine laboratories. *J Med Microbiol* 2012;61:1393-1400. IF: 2,297
- Nagy E, Maier T, **Urbán E**, Terhes G, Kostrzewa M: Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:796-802. IF: 4,014
- Nagy E, **Urbán E**, Becker S, Kostrzewa M, Vörös A, Hunyadkúrti J, Nagy I: MALDI-TOF MS fingerprinting facilitates rapid discrimination of phylotypes I, II and III of *Propionibacterium acnes*. *Anaerobe* 2013;20:20-26. IF: 2,364
- Nagy E, **Urbán E**: Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:371-379. IF: 4,54
- Sárvári KP, Sóki J, Kristóf K, Juhász E, Miszti C, Latkóczy K, Melegh Sz, **Urbán E**: A multicentre survey of the antibiotic susceptibility of clinical *Bacteroides* species from Hungary. *Infectious Diseases* 2018;50:372-380. IF: 2,191
- Sárvári KP, Sóki J, Kristóf K, Juhász E, Miszti C, Melegh Sz, Latkóczy K, **Urbán E**: Molecular characterization of multidrug-resistant *Bacteroides* isolates from Hungarian clinical samples. *J Glob Antimicrob Resist* 2018;13:65-69. IF: 2,469

- Sárvári KP, Sóki J, Iván M, Misztó C, Latkóczy K, Melegh Sz, **Urbán E**: Detection of enterotoxin and protease genes among Hungarian clinical *Bacteroides fragilis* isolates. *Anaerobe* 2017;48:98-102. IF: 2,742
- Sárvári KP, Sóki J, Iván M, Misztó C, Latkóczy K, Melegh Sz, **Urbán E**: MALDI-TOF MS versus 16S rRNA sequencing: minor discrepancy between tools in identification of *Bacteroides* isolates. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2018;65:173-181. IF: 1,079
- Sóki J, Eitel Z, Terhes G, Nagy E, **Urbán E**: Occurrence and analysis of rare *cfiA-bft* doubly positive *Bacteroides fragilis* strains. *Anaerobe* 2013;23:70-73. IF: 2,364
- Terhes G, Brazier JS, Sóki J, **Urbán E**, Nagy E: Coincidence of *bft* and *cfiA* genes in a multi-resistant clinical isolate of *Bacteroides fragilis*. *J Med Microbiol* 2007;56:1416-1418. IF: 2,091
- Terhes G, Brazier JS, **Urbán E**, Sóki J, Nagy E: Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in regions of Hungary. *J Med Microbiol* 2006;55:279-282. IF: 2,18
- Terhes G, Maruyama A, Latkóczy K, Szikra L, Konkoly-Thege M, Princz G, Nagy E, **Urbán E**: In vitro antibiotic susceptibility profile of *Clostridium difficile* excluding PCR ribotype 027 outbreak strain in Hungary. *Anaerobe* 2014;30:41-44. IF: 2,479
- Terhes G, **Urbán E**, Konkoly-Thege M, Székely E, Brazier JS, Kuijper EJ, Nagy E: First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 from a patient with severe persistent diarrhoea in Hungary. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:885-886. IF: 4,014
- Terhes G, **Urbán E**, Nagy E: *Clostridium difficile* törzsek izolálása, toxintermelésének vizsgálata és ribotípusának meghatározása. *Infekt Klin Mikrobiol* 2005;(2):37-48.
- Terhes G, **Urbán E**, Nagy E: Új hypervirulens *Clostridium difficile* törzs megjelenése Európában. *Infekt Klin Mikrobiol* 2007;14:13-22.
- Terhes G, **Urbán E**, Sóki J, Szikra L, Konkoly-Thege M, Vollain M, Nagy E: Assessment of changes in the epidemiology of *Clostridium difficile* isolated from diarrheal patients in Hungary. *Anaerobe* 2009;15:237-240. IF: 1,633
- Terhes G, **Urbán E**, Sóki J, Hamid KA, Nagy E: Community-acquired *Clostridium difficile* diarrhea caused by binary toxin, toxin A, and toxin B gene-positive isolates in Hungary. *J Clin Microbiol* 2004;42:4316-4318. IF: 3,439
- Terhes G, **Urbán E**, Sóki J, Nacsá E, Nagy E: Comparison of a rapid molecular method, the BD GeneOhm Cdiff assay, to the most frequently used laboratory tests for detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in diarrheal feces. *J Clin Microbiol* 2009;47:3478-3481. IF: 4,162
- Terhes G, Nagy E, **Urbán E**: Hazai tipizálási adatok 2000 és 2010 között. *Mikrobiológiai Körlevél* 2015;15:47-50.
- Tóth J, **Urbán E**, Osztie H, Bencsik M, Indra A, Nagy E, Allerberger F: Distribution of PCR ribotypes among recent *Clostridium difficile* isolates collected in two districts of Hungary using capillary gel electrophoresis and review of changes in the circulating ribotypes over time. *J Med Microbiol* 2016;65:1158-1163. IF: 2,159
- Urbán E**: A *Clostridium difficile* infekciók mikrobiológiai diagnosztikai lehetőségei. *IME: Interdiszciplináris Magyar Egészségügy/Informatika és Menedzsment az Egészségügyben* 2013;12:24-31.
- Urbán E**, Horváth Z, Sóki J, Lázár Gy: First Hungarian case of an infection caused by multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* strain. *Anaerobe* 2015;31:55-58. IF: 2,424
- Urbán E**, Terhes G, Markotics A, Sóki J, Nagy E: Rare extraintestinal infection caused by toxin-producing *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 2010;16:301-303. IF: 2,448
- Urbán E**: A *Clostridium difficile* infekciók mikrobiológiai diagnosztikai lehetőségei *Mikrobiológiai Körlevél* 2015;15:22-28.
- Urbán E**, Gajdács M, Terhes G: Extraintestinal *Clostridioides difficile* infections: epidemiology in a University Hospital in Hungary and review of the literature. *Antibiotics. (Közlésre beküldve)*

Σ IF: 64,793

9.2. Tudománymetriai összefoglaló táblázat

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összesen
I. Folyóiratcikk ²	165	---	---	---
szakcikk, nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	75	1125	1363
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	9	24	31
szakcikk, magyar nyelvű	---	26	16	19
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	11	329	404
összefoglaló közlemény	---	17	39	53
rövid közlemény	---	27	229	288
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	17	---	---	---
idegen nyelvű	---	2	0	0
magyar nyelvű	---	1	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet	---	14	0	0
IV. Konferenciaközlemény ⁴	2	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	14	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV)	---	170	1762	2158
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	184	---	1762	2158
V. További tudományos művek	36	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is	---	32	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	4	5	8
Oltalmak (szabadalmak)	---	0	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok ⁵	4	---	4	4
Összes hivatkozás ¹	---	---	1771	2170
Hirsch index ⁶	24	---	---	---
g index ⁶	43	---	---	---
Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás		
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	21	126		
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	29	169		
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2002) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	152	2087		
Az utolsó 10 év (2009 - 2019) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	127	1295		
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	255	11,75%		
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	80		
Jelentés, guideline	1	0		
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	1	114		

10. Köszönetnyilvánítás

“Úgy érezzük, hogy amit teszünk, csak egy csepp a tengerben.
Anélkül a csepp nélkül azonban sekélyebb volna a tenger.”
Teréz anya

Ezúton mondok köszönetet mindazoknak, akik tudományos kutatómunkám során támogattak, akik segítségével, bátorítása nélkül pályázatom nem jöhetett volna létre:

Köszönetet mondok Dr. Nagy Erzsébet Professzor Asszonynak, kíváncsiságom az anaerob baktériumok rejtélyes világának megismerésére a Professzor Asszony kezei között formálódott és érett meg arra, hogy ez a disszertáció megszülethessen. Köszönettel tartozom az önzetlen segítségéért, töretlen támogatásáért, a szakmai ismeretek és a könyvekből nem megtanulható szemlélet és gyakorlati fogások átadásáért.

Az értekezésben bemutatott kutatómunkában tanítványaim és kollégáim fontos szerepet tölthettek be. Szorgalmas, odaadó és kitartó munkájukért, megtisztelő támogatásukért külön köszönettel tartozom Pappné Dr. Terhes Gabriellának, Dr. Sóki Józsefnek, Dr. Sárvári Károly Péternek és Dr. Gajdács Máriónak.

Köszönöm Dr. Piukovics Klárának és Dr. Balla Eszter PhD hallgatóimnak, hogy támogathattam kutatómunkájukat. Minden szakdolgozómat, TDK hallgatómat köszönet illeti munkájukért, segítő támogatásukért.

Köszönettel gondolok a Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet asszisztenseire, kiemelten közvetlen munkatársaimra, hogy szorgalmas munkájukkal segítették a kutatómunkámat: Deák Tündére, Marincusné Karasz Erikára, Redetzky Andreára.

A számos együttműködő partner közül külön köszönöm dr. Nagy Istvánnak és munkacsoportjának a rendkívüli szakmai, baráti segítségüket.

Köszönettel tartozom mindazoknak a hazai és külföldi kollégáknak, kutatócsoportoknak, akikkel a kutatások, kollaborációk, mintagyűjtések során összehozott az élet, közvetlen szakmai kapcsolatba kerülhettem velük. Szerencsére olyan sokan vannak, hogy nem tudok mindenkit felsorolni, senkit sem szeretnék kifelejteni, így együtt köszönöm meg mindannyiójuk szakmai-baráti támogatását. Köszönöm külföldi tanulmányútjaim senior kutatóinak a lehetőséget, hogy befogadtak Laboratóriumukba, és a munkáimhoz biztosították a szükséges és igen drága infrastruktúrát.

Köszönöm minden barátomnak, támogatómnak azt, hogy el nem múló szeretettel kísérték az élet folyamán, hogy erőt adtak, szerető támogatásukra mindig, minden körülmény között számíthattam.

Hálás vagyok családomnak az irántam mutatott türelemért, megértésért, és mindazért a semmihez sem mérhető szeretetért, amivel erőt adtak munkámhoz. Köszönöm a lehetőséget és a támogatást, férjemnek Ernőnek és gyermekeimnek, Dr. Zsoldi Gerdának és Zsoldi Ádámnak.

És végül: a Disszertációt ajánlom Édesapám emlékének.....