dc_1706_19

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

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 4
2. Bevezetés 6
2.1. Anaerob baktériumok szerepe a humán mikrobiomban 6
2.2. Az anaerob baktériumok humán patogén szerepe 7
2.3. *Clostridioides (Clostridium) difficile* 8
A *C. difficile* jellemző tulajdonságai 9
C. difficile előfordulása, az infekció kialakulását elősegítő tényezők 9
A *C. difficile* patogenitási tényezői 11
A *C. difficile* törzsek típus meghatározásai 16
2.4. A *Bacteroides/Parabacteroides* (genus) nemzetségek tagjainak fő jellemzői 17
A *B. fragilis* egyik fontos patogenitási tényezője: az enterotoxin 20
Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok és a surveillance fontossága 21
A *Bacteroides/Parabacteroides* fajok fontosabb rezisztencia mechanizmusai 23
2.5. A MALDI-TOF-MS módszer klinikai mikrobiológiai alkalmazása 26
3. Célkitűzések 31
4. Alkalmazott módszerek 33
4.1. Vizsgálatok *C. difficile* törzsekkel 33
A törzsek gyűjtése 33
A törzsek tenyésztése, tárolása 33
Toxin kimutatási vizsgálatok 34
Citotoxicitási vizsgálatok HeLa szövettenyészeten 34
Toxin vizsgálatok kereskedelmi forgalomban elérhető diagnosztikus tesztekkel 34
A főbb toxin gének, a binary toxin gén és a *tcd*C gén PCR vizsgálata 34
BD GeneOhm Cdiff vizsgálat 35
Ribotípusok meghatározása PCR módszerrel 36
A tenyésztési körülmények és a DNS kivonása 36
PCR ribotipizálás 36
A PCR termékek kimutatása 36
PCR ribotípusok meghatározása kapilláris gélelektroforézissel 36
Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok 37
4.2. Vizsgálatok a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek körében 38
A baktériumok gyűjtése és fajok meghatározása 38
Európai törzsek 38
Magyarországi törzsek 38
Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok 38
A rezisztencia gének meghatározása PCR módszerekkel 40
A *gyr*A gén szekvenálása 42
A *bft, bfp1-4* és *fpn* gének meghatározása RT-PCR módszerrel 42
4.3. MALDI-TOF módszer alkalmazása az anaerob baktériumok identifikálására 43
A törzsek tenyésztése, tárolása 43
Mintaelőkészítés és MALDI-TOF MS mérés kivitelezése 43
Klinikai izolátumok species-szintű meghatározása 44
16S rRNS gén szekvenálás az ellentmondásos izolátumok esetén 44
*B. fragilis cfi*A Divízió I.-II.-be tartozó törzsek azonosítása 45
Cutibacterium acnes törzsek tipizálása 45
Multi Locus Szekvencia Tipizálás (MLST) analízis 46
5. Eredmények 47
5.1. Vizsgálatok *C. difficile* törzsekkel 47
A fő toxinok-termeléséért felelős gének és binary toxin-termeléséért felelős 47

gén jelenlétének vizsgálata: 2002.
A fő toxinok-termeléséért felelős gének és binary toxin-termeléséért felelős gén jelenlétének vizsgálata: 2011-2012. 48
A BD GeneOhm Cdiff Assay módszer összehasonlítása a hagyományos toxin kimutatási eljárásokkal a toxin-termelő *C. difficile* kimutatására közvetlenül hasmenéses székletmintákból 49
A *C. difficile* PCR ribotípusok megoszlása Magyarországon 2002-2004. 51
A *C. difficile* 027-es PCR ribotípus első izolálása Magyarországon: 2007. 53
A *C. difficile* PCR ribotípusok előfordulása Magyarországon: 2006-2007. 55
A *C. difficile* PCR ribotípusok előfordulása Magyarországon 2014. 55
A *C. difficile* PCR ribotípusok előfordulása 2018. 56
A *C. difficile* törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálatai 57
Extraintesztinális *C. difficile* infekciók 61
Az extraintesztinális *C. difficile* infekciók előfordulása a SZTE ÁOK klinikáin 2008-2017. 62
5.2. Vizsgálatok a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek körében 65
Európai törzsek antibiotikum érzékenységének meghatározása 65
A β-laktám típusú antibiotikumokkal szembeni rezisztencia adatok 65
Az egyéb antibiotikumokkal szembeni rezisztencia adatok 66
Régiók közötti különbségek a rezisztencia arányok között 71
Magyarországi törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálatai 73
Régiók közötti különbségek a rezisztencia arányok között 74
A fluorokinolon érzékenység és a MATE multidrug efflux pumpa gén (*bex*A) vizsgálata 78
MDR *Bacteroides* törzsek molekuláris vizsgálata 80
A *B. fragilis* törzsek jelentős patogenitási faktorainak: enterotoxin és cisztein proteáz termeléséért felelős génjeinek vizsgálata 83
5.3. A MALDI-TOF MS alkalmazása a humán, klinikai eredetű anaerob baktériumok azonosításában 85
Klinikai izolátumok species-szintű meghatározása 85
Egyes anaerob specieseken belüli típusmeghatározás lehetőségei a MALDI-TOF MS módszerrel 93
A *Bacteroides fragilis* törzsek Divízió I. és Divízió II. elkülönítése 93
A *Cutibacterium acnes* I. II. és III. filotípusok elkülönítése 94
6. Megbeszélés **98**
6.1. Vizsgálatok a *C. difficile* törzsekkel 98
6.2. Vizsgálatok a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek körében 112
Az MDR törzsek előfordulása és az antibiotikum rezisztencia gének vizsgálata 117
A *B. fragilis* törzsek enterotoxin- és proteáz-termeléséért felelős gének vizsgálata 119
6.3. A MALDI-TOF MS alkalmazása a humán, klinikai eredetű anaerob baktériumok identifikációjában 121
7. Az értekezés legfőbb megállapításai, újdonságai **129**
8. Irodalomjegyzék **134**
9. Publikációs adatok 150
9.1. Az értekezés alapját képező „*in extenso*” közlemények 150
9.2 Az értekezés témaköreiben megjelent absztraktok, előadáskivonatok 152
9.3. Az értekezés témakörében megjelent “*in extenso*” közlemények 156
9.4. Tudománymetriai összefoglaló táblázat 160
10. Köszönetnyilvánítás **161**

1. Az értekezésben használt rövidítések jegyzéke

AAD	Antibiotikum asszociált hasmenés
ADP	Adenozin-difoszfát
AmpC	Kromoszomálisan kódolt β-laktamáz, cefalosporináz enzim
AST	Antibiotikum érzékenységi vizsgálat
ATCC	American Type Culture Collection
BEXA	*Bacteroides* Exporter A
BFT	*Bacteroides fragilis* enterotoxin
bp	Bázispár
Caco-2	Heterogén humán epitéliális colorectalis adenokarcinóma sejtvonal
CAT	Chloramphenicol acetiltranszferáz
CCEY	Cefoxitin-cikloszerin egg yolk agar
CCFA	Cikloszerin-cefoxitin fruktóz agar
CDAD	*Clostridioides difficile* asszociált hasmenés
CDIs	*Clostridioides difficile* infekciók
CDT	*C. difficile* binary toxin
*cdt*A	*C. difficile* binary toxin enzimatikus domént kódoló gén
*cdt*B	*C. difficile* binary toxin receptorkötő domént kódoló gén
CdtLoc	*C. difficile* binary toxin géneket hordozó lókusz
CE	Kapilláris elektroforézis
CFB phylum	*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*-phylum
CFU	Telepképző egység
CLSI	Clinical Laboratory Standard Institute
CM bouillon	Húsleves táptalaj
CodY	Transzkripciós regulátor
CSPG4	Chondroitin szulfát proteoglikán 4
CT	Konjugatív transzpozon
Da-kDa	Dalton-kiloDalton
DMSO	Dimetil-szulfoxid
DNS	Dezoxi-ribonukleinsav
DOT-MGA	Mikrodoplet növekedési vizsgálat
DSM	Német Mikrobiológiai és Sejtkultúra Gyűjtemény
ECDC	Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ
ECOFF	Epidemiológiai “cut-off” érték
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EIA	Enzim-immuno-assay
ELFA	Enzimhez kötött immunfluoreszcencia vizsgálat
eMLST	Kiterjesztett Multilókusz Szekvencia Tipizálás
ENRIA	Európai hálózat az anaerob baktériumok gyors azonosítására
ESBL	Kiterjesztett spektrumú β-laktamáz
ESCMID	Európai Klinikai Mikrobiológiai és Infektológiai Társaság
ESGAI	ESCMID Anaerob fertőzések vizsgálati csoportja
ETBF	Enterotoxikus *Bacteroides fragilis*
EUCAST	Európai Antimikrobiális Érzékenységvizsgálati Bizottság
FAA	Fastidious Anaerobe Agar
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAM	Karboxi-fluoreszcein
GDH	Glutamát dehidrogenáz
GLC	Gáz-folyadék kromatográfia
GTP	Guanozin-trifoszfát
HCCA	α-ciano-4-hidroxi fahéjsav
HT-29	Emberi vastagbélrák sejtvonal
IC	Immun-kromatográfia

ICE	Integratív és konjugatív elem
IgA	Immunglobulin A
IS	Inszerciós szekvencia
ISR	Kódoló gének által közrefogott szakaszok
IVD	In vitro diagnosztikai minősítésű
LPS	Lipopoliszacharid
MALDI-TOF-MS	Mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria
MATE	Multidrog és Toxikus Compound Extrusion
MDR	Multidrog rezisztens
meso-DAP	meso-Diamino-pimelinsav
MetaHIT	Metagenomics of the Human Intestinal Tract
MIC	Minimális gátló koncentráció
MLS_B	Makrolid-linkózamid-streptogramin B típusú rezisztencia
MLST	Multilókusz Szekvencia Tipizálás
MLVA	Multilókusz variábilis számú tandem ismétlődés analízis
MRSA	Methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus*
MS	Tömegspektrometria
MSP	Fő tömegspekrum
NAP1	North American pulsed-field gel electrophoresis type 1
NFB	Nem-fragilis *Bacteroides* sp.
NNSR	Nemzeti Nozokómiális Surveillance Rendszer
NPV	Negatív Prediktív Érték
PaLoc	Patogenitási sziget
PBP	Penicillin-kötő fehérje
PBS	Foszfáttal pufferelt fiziológiás NaCl oldat
PCR	Polimeráz láncreakció
PFGE	Pulzáltatott mezejű gélelektroforézis
PID	Kismedencei gyulladásos betegség
PPI	Proton pumpa inhibitor
PPV	Pozitív Preditív Érték
PVRL3	Poliovírus receptor-like protein 3
PYG	Pepton-gomba kivonat glükózos leves
QRDR	Kinolon-rezisztenciát meghatározó régió
RAC1	Ras-al összefüggő C3 botulinum toxin szubsztrát 1: aktin regulált GTPáz
REA	Restrikciós endonukleáz analízis
RFLP	Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
RND	Rezisztencia-nodulációs divízió
rRNS	Riboszómális ribonukleinsav
RT	Ribotípus
SDS	Nátrium-dodecil szulfát
ST	Szekvencia típus
SZTE ÁOK KMDI	Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet
*tcd*A	*C. difficile* A toxint kódoló gén
TcdA	*Clostridioides difficile* A toxin
*tcd*B	*Clostridioides difficile* B toxint kódoló gén
TcdB	*Clostridioides difficile* B toxin
TES	Tris-hidroklorid puffer
TAE	Tris-acetát-EDTA puffer
UV	Ultraibolya sugárzás
VPI	Virginia Polytechnic Institute
WGS	Teljes genom szekvenálás
WHO	Egészségügyi Világszervezet

2. Bevezetés

2.1. Anaerob baktériumok szerepe a humán mikrobiomban

A humán mikrobiológiában régóta ismeretes az úgynevezett „normál flóra” fogalma: normál flórának neveztük a testfelszínen és a testüregekben állandóan, vagy átmenetileg jelenlevő és az egészséges emberben betegséget nem okozó baktériumok összességét (McFarland LV. 2000). Ma már, köszönhetően a modern molekuláris mikrobiológiai diagnosztikai kutatásoknak a szakirodalom a normál flóra elnevezés helyett a mikrobiom kifejezést használja. A kifejezést Joshua Lederberg amerikai kutató alkotta meg, aki az emberi testben élő mikroorganizmusok humán életműködésekre és a különböző betegségekre gyakorolt hatásának fontosságát vizsgálta (Lederberg J. 2001). A mikrobiom használatát, a „genom” analógiájára alkotta meg, a következő tartalommal: „a kommenzális, szimbiotikus és patogén mikroorganizmusok ökológiai közössége, amely szó szerint osztozik testünk területén…” („The ecological community of commensal, symbiotic, and pathogenic microorganisms that literally share our body space…”). A mikrobiom mikroorganizmusok (baktériumok, vírusok, gombák) összessége, amelyek velünk, bennünk, rajtunk élnek, táplálnak, védenek, használnak, kihasználnak bennünket. Egyes tudományos közleményekben megkülönböztetik a „mikrobiomot” és a „mikrobiótát” attól függően, hogy az egy környezeti niche-ben elhelyezkedő mikroorganizmusok kollektív genomjaira vagy magukra a mikroorganizmusokra kívánnak utalni. Az egészséges emberi szervezetben a mikrobák elenyésző kisebbsége kórokozó (patogén), többségük semleges vagy szimbiotikus kapcsolatban él velünk. A mikrobiomot alkotó fajok sokasága (diverzitás) és épsége/funkciója döntő szerepet játszik a gazdaszervezet egészséges homeosztázisának fenntartásában. A humán mikrobiom szerepéről egyre intenzívebben folynak a kutatások, mindezidáig sok tanulmány született a szervezetünk részét képző baktériumflóra egészségünkre, életfolyamatainkra, illetve különböző betegségekre gyakorolt hatásáról. Az eddigi kutatások eredményeiből most kezdjük megismerni a mikrobiom variabilitását, stabilitását, fejlődését, összetételének megváltozását és a gazdaszervezetre gyakorolt pozitív és negatív élettani hatásait.

Sokáig tartotta magát az a vélemény, hogy az emberi sejtek számához (10^{13}) képest a mikrobák száma egy nagyságrenddel nagyobb a humán szervezetben (10^{14}) és százszor több a mikrobiális gén, mint az emberi. Ezek az adatok egy 1972-es becslésen alapultak (Luckey TD. 1972), amelyet 2016-ban felülvizsgáltak (Sender R. *et al.* 2016). Az újabb kutatások alapján a humán és mikrobiom sejtek aránya sokkal inkább 1:1, a korábban vélt 10:1-hez képest. A különböző testrészeken a mikrobák száma és fajgazdagsága eltérő, a legváltozatosabb és leggazdagabb az emésztőrendszerben, a bél mikrobiom összetétele mindenkinél olyan egyedi, akár az ujjlenyomat. Az összetétel és a mennyiség változik az emésztőrendszeren belül is, a gyomorban a legkevesebb számú és legszegényesebb összetételű, míg a vastagbélben a legtöbb és leggazdagabb baktériumflóra található (Clarke G. 2014). Az egész humán mikrobiom döntő hányada a bélrendszerben található, ez az összes baktériumsejt mintegy 90%-át jelenti. Manapság a legtöbb információnk az itt kialakult bél-mikrobiomról van, mely mennyiségét, összetettségét és hatásait tekintve is kiemelkedik a többi, emberi testen kialakuló mikrobaközösség közül. Vizsgálatára külön projekt szerveződött, több európai kutatóintézet bevonásával: a MetaHIT (Metagenomics of the Human Intestinal Tract) program (http://www.metahit.eu/) –a teljes bélflórát vizsgálva– a bélbaktériumok és az egészséges,

valamint a kóros állapotok közötti kapcsolatok feltárására jött létre, különös tekintettel az idegrendszerre gyakorolt hatásokra és a krónikus bél gyulladásra, valamint az elhízásra, amelyek nemcsak Európában jelentenek egyre nagyobb problémát.

Természetesen az egyéni életünk során a bél mikrobiom mind sokféleségében (diverzitás), mind arányaiban változik. A normál bélflóra stabil, az adott egyénre jellemző, alacsony diverzitású a nagyobb filogenetikai egységekben, de faji szinten már nagy a diverzitás. A székletben a baktériumszám 10^{11}-10^{13}/gramm, mely egy kiterjesztett genomot, multigenomikus szimbiózist jelent, amely kifejeződik a gazdaszervezet proteomikus és metabolomikus szintjén is. 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**.

A béltraktus mikroflórája a születés után lassan, fokozatosan alakul ki, szoros ko-evolúció feltételezhető a szervezet és a mikrobiom között. A születés utáni első hetekben kisszámú species mutatható ki és a mikrobiológiai közösség még meglehetősen instabil, majd az élet első hónapjai során gyakran jelentős változások történnek. Az első hat hónapban a csecsemők mikrobiomja között is vannak eltérések, attól függően, miként következik be a kolonizáció, amely tulajdonképpen már a szülési folyamat során megkezdődik. Hüvelyi úton történő szülésnél egyes vizsgálatok szerint az újszülöttnél *Lactobacillus, Prevotella* és *Sneathia* speciesek dominálnak, az anya vaginális flórájától függően. A császármetszéssel világra jötteknél a bőr karakterisztikus mikrobái találhatók: *Staphylococcus, Corynebacterium, Cutibacterium* (Dave M. *et al.* 2012). Egyéves korban már a *Firmicutes* és a *Bacteroides* taxonok dominálnak. A legújabb kutatási eredmények szerint a felnőttek bélrendszerében több, mint 1000 féle mikroorganizmus él, a leggyakoribb csoportok: *Firmicutes, Bacteroidetes, Archaebacteria (Methanobrevibacter*), kevésbé gyakoriak: *Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia*. A vékonybél (duodenum, jejunum) mikroflórájához tartoznak: streptococcusok, lactobacillusok, az ileumban és főként a kolonban: az *Enterobacteriales, Enterococcus, Bifidobacterium, Peptococcus, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Clostridiales, Lactobacillus* (Bik EM. *et al.* 2009) fajok dominálnak.

Az anaerob baktériumok humán patogén szerepe

Napjainkban jelentősen megváltozott a szemlélet az anaerob baktériumok humán patogenitásban játszott szerepét illetően. 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 epitéliális barrier kialakításában az epitéliális sejtek proliferációjára és differenciálódására való hatással (Börningen 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. Ezen infekciók néhány klasszikus infekciótól -mint pld. a clostridiumok által kiváltott, főként toxin-mediálta kórképektől- eltekintve, vegyes, komplex fertőzések, ahol anaerob, aerob és fakultatív anaerob baktériumok együttes előfordulásával kell számolni. Az esetek döntő többségében a szervezet saját anaerob baktériumai kerülnek a szokványos előfordulási helyükről a számukra kedvező, alacsony redoxpotenciállal rendelkező, alacsony oxigenizáltságú szövetek közé. Az anaerob baktériumok igen sokféle, gyakorlatilag bármely testtájat érintő infekciót okozhatnak, melyek fő jellemzői a tályogképződés, a szöveti nekrózis. Hasi, nőgyógyászati, szájsebészeti műtéteket követően kialakuló fertőzések, aspirációs pneumónia, osteomyelitis, krónikus sinusitis, hám- és/vagy lágyrész infekciók során a vegyes aerob, anaerob flóra olyan komplex, hogy meglehetősen hosszú időbe telik, míg a laboratórium az egyes törzseket színtenyészetben izolálni, majd species szinten identifikálni tudja, illetve meg tudja határozni az egyes izolátumok antibiotikumokkal szembeni érzékenységét. Az anaerob baktériumok hosszabb generációs ideje miatti lassú szaporodása és az a tény, hogy szigorú oxigénmentes körülményeket kell biztosítani számukra a tenyésztésük során, még inkább megnehezíti a laboratórium feladatát a minél előbbi antibiotikum érzékenységi adatok közlése szempontjából. A klinikus így legtöbb esetben empirikus terápiát indít, úgy, hogy a mikrobiológussal szoros együttműködésben ismerniük kell az infekció helyét, az adott anatómiai lokalizációban lehetséges patogén anaerob baktériumokat, azok természetes és szerzett rezisztenciáját, a helyi-országos-nemzetközi rezisztencia adatokat és az infekció súlyosságát.

Az anaerob baktériumok által okozott kórképek laboratóriumi diagnosztikai lehetőségei jelentős változáson mentek keresztül az utóbbi évtizedekben. Ezek a változások köszönhetőek a korszerűbb, modern inkubálási lehetőségeknek (automatizált anaerob kamrák), a diagnosztikai eljárások fejlődésének és a szemléletváltozásnak, mind a klinikusok, mind az anaerob diagnosztika területén dolgozó mikrobiológusok részéről. Az 1960-as évekig anaerob fertőzés alatt csak egy szűk spektrumú, többnyire clostridiumok okozta exogén infekciókat értették, mára ez a szemlélet jelentősen megváltozott. Az azóta szélesebb körben megismert, illetve újonnan felfedezett nem spórás anaerob baktériumok jelentős szerepet játszhatnak számos, endogén eredetű fertőzésben, ma már egyre több olyan kórkép, fertőzés esetében derül ki anaerob baktériumok kóroki szerepe, melyek korábban nem tartoztak az anaerob baktériumok által okozott infekciók körébe.

2.3. *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. Magát a pseudomembranosus colitis-kórképet 1893-ban Finney írta le először egy nőbeteg műtét utáni hasmenése kapcsán post mortem, azonban a kórképért felelős kórokozót még nem ismerte (Finney JMT. 1893). Először 1935-ben Hall és O'Toole izolálta és fedezte fel akkor még *Bacillus difficile*-nek nevezett *C. difficile*-t (Hall IC, O'Toole 1935). A *C. difficile* nevét a nehéz azonosítása és hagyományos táptalajokon történő nehéz tenyésztése miatt kapta, a latin „difficilis" nehéz, makacs szóból eredeztetve. 1974-ben Tedesco írta le a clindamycin kezelést követően kialakuló hasmenést,

vagyis az antibiotikum kezelés következtében kialakuló hasmenéses eseteket (Antibiotic-Associated Diarrhea: AAD) (Tedesco FJ. *et al.* 1974). 1974-ben Hafiz környezeti mintákból izolálta a *C. difficile*-t, megfigyelte majd PhD téziseiben részletesen leírta a baktérium legfontosabb biokémiai jellemzőit, köztük a specifikus glutamát dehidrogenáz (GDH), mint közös antigén jelenlétét mind a toxint termelő, mind a toxint nem termelő törzsekben (Hafiz S. 1976). Bartlett igazolta a toxin-termelő *C. difficile* törzsek enterális patogén szerepét 1977-ben, majd 1980-tól egyre nagyobb figyelmet kapott a *C. difficile* nozokómiális környezetben való terjedése (Bartlett JG. 1978).

2016-ban a speciest a 16S rRNS gén szekvencia analízise alapján reklasszifikálták, a legközelebbi rokonságot a *Clostridium mangenotii*-val találtak (94,7% egyezés), mindkét faj filogenetikusan inkább a *Peptostreptococcaceae* genushoz áll közelebb, mint a *Clostridium "sensu stricto"* speciesekhez (Lawson PA. *et al.* 2016). Mind a *C. difficile* mind a *C. mangenotii* nagymennyiségű H_2 gázt termel a PYG (Peptone Yeast Extract Glucose Medium) levesben történő szaporodás során és a fő végtermékük a palmitinsav (C16:0) mellett számos rövid szénláncú telített és telítetlen zsírsavat is. A sejtfal peptidoglikán meso-DAP-ot (diamino-pimelinsav) tartalmaz, mely fontos diagnosztikus diamino-sav. A fenotípusos, kemotaxonómiai 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

A *C. difficile* obligát anaerob spóraképző, Gram-pozitívan festődő, egyenes láncba rendeződött nagy pálca, mérete változó: hossza 3 µm-tól 16 µm-ig is terjedhet, szélessége elérheti a 1,9 µm-t. A *C. difficile* törzsek székletből történő szelektív tenyésztését leggyakrabban CCFA (Cikloszerin-Cefoxitin Fruktóz Agar) táptalajon végzik, 24-48 óra anaerob körülmények között történő inkubálás után. Ez a táptalaj a *C. difficile* szelektív differenciáló táptalaja, amelynek a szelektivitását a cikloszerin és a cefoxitin antibiotikumok biztosítják. A szelektív táptalajon való tenyésztés során a *C. difficile* telepek nagysága és morfológiája igen eltérő lehet, jellegzetes szagot mutatnak, mely fenotípusos vonás abból adódik, hogy a baktérium képes a tirozint *p*-krezollá fermentálni, mely egy fenolos vegyület, emellett a baktérium elkülönítését segíti a fluoreszkáló képessége: UV fényben (λ=366 nm) sárgás-zöld fluoreszcenciát mutat (Curry SR. 2010). A baktériumok anyagcseréjének végtermékei vagy az anyagcsere folyamatokban részt vevő enzimek meglétének vizsgálata elősegíti a baktériumok azonosítását. A tenyészetek végtermékén végzett gáz-folyadék kromatográfiás (Gas Liquid Chromatography: GLC) vizsgálatok kimutatták, hogy palmitinsavat, ecetsavat, vajsavat, propionsavat, izovajsavat, valeriánsavat, izovaleriánsavat és kapronsavat termelnek (Delmée M. 2001).

***C. difficile* előfordulása, az infekció kialakulását elősegítő tényezők**

A *C. difficile* spórái kimutathatóak a talajban, a felszíni- és szennyvizekben, a porban, igen gyakori a környezetben; talajmintákból 21%-ban, háziállatok fekáliáiból 7%-ban, kórházi környezeti mintákból 20%-ban, folyóvízből 87%-ban, tavakból 47%-ban, úszómedencékből 50%-ban, nyers zöldségekből 2,4%-ban izolálták (Al Shaif N., Brazier JS. 1996). A különböző kutatások változó arányban találtak felnőtt egészséges hordozókat nem epidémiás időszakban:

irodalmi adatok alapján Japánban 4,2-15%-ban (Kato H. *et al*. 2001), míg Svédországban csak 1,9%-ban (Aronson B. *et al.* 1985). Újszülöttekben a hordozási arány a szülőhelyek függvényében elérheti a 60%-ot is. Az újszülöttek és az 1-8 hónapos csecsemők toxin-termelő törzseket hordoznak, de tünetmentesek, csak hipotézis, hogy a toxin-receptorok a kolonban még nem alakultak ki, vagy a receptorok maszkírozva vannak, a hordozás gyakorisága 2-3 éves korban már csak néhány százalék (Lees EA. *et al.* 2016). 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 (PPI) szedése, kemoterápia, stb. A károsodást csaknem minden antibiotikum kiválthatja, de leggyakrabban az ampicillin, clindamycin és a cefalosporinok alkalmazásakor alakul ki, a kialakulás független a szer adagolási módjától és mennyiségétől. 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. Az utóbbit vizes hasmenés, láz (az esetek 80%-ában), leukocitózis (80%), és az endoszkópia során látható pseudomembranosus nyálkahártyakép jellemzi, súlyos, esetleg letális kimenetelű szövődményei a toxikus megakolon, a perforáció és a sokk.

A toxin-termelő *C. difficile* patogén szerepének 1978-as tisztázása óta ezt tekintik a legfontosabb enteropatogén kórokozónak az antibiotikumok okozta hasmenésben: felelős az antibiotikumok okozta hasmenések 10–25%-áért és gyakorlatilag szinte valamennyi pseudomembranosus colitis kialakulásáért. A CDI, a jelentős megbetegedési és halálozási következmények miatt, napjainkban prioritásként kezelt népegészségügyi probléma, az European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) kiemelt népegészségügyi területe. A CDI növekvő problémát jelent a kórházak, idősotthonok és más, hosszabb egészségügyi ellátásra szakosodott intézmények esetében, úgy a diagnosztika, mint a terápia vonatkozásában. Saját, hazai vizsgálataink alapján is igen jelentős többlet terheket jelent az intézmények számára az ápolás tekintetében és anyagi vonatkozásban egyaránt (Gulácsi L. *et al.* 2013). Két megyei kórházban illetve a SZTE klinikán végzett felméréseink alapján 1999-2000 között a fekvőbeteg osztályokon már előfordultak CDI esetek, azonban a klinikusok még meglehetősen ritkán gondoltak a *C. difficile* patogén szerepére nozokómiális enterális infekciókban (Tusnádi A. *et al*. 2000; Urbán E. *et al.* 2000; Urbán E. *et al.* 2002). A SZTE I. Számú Belgyógyászati Klinika Infektológiai Osztályán a *C. difficile* fertőzések növekvő jelentőségét tapasztaltuk: míg 2005-ben és 2006-ban a leggyakoribb akut gastroenteritist okozó kórokozók a *Salmonella* törzsek és a *Campylobacter* speciesek voltak, 2009-re a *C. difficile* vezető patogénné lépett elő. Vizsgálataink alapján az utóbbi években a fertőzések súlyosbodtak és haláloki tényezőként jelentek meg, a prognózist a gyulladásos laboratóriumi paraméterek és az életkorral növekvő gyakoriságú társbetegségek befolyásolták (Fodor D. *et al*. 2012).

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 idősek otthonában a leromlott fizikai állapotú, valamilyen alapbetegségben szenvedő, idős, vagy károsodott immunrendszerű beteg a kórházban perzisztáló, székletszórás útján terjedő exogén *C. difficile* törzsekkel fertőződik (Lamont JT. *et al.* 2018). A *C. difficile* okozta hasmenés jelentkezése

esetén a higiénés intézkedéseket (egyágyas kórtermek, kesztyűhasználat és gyakori szappanos kézmosás) következetesen kell alkalmazni a kezelés során, annak érdekében, hogy megelőzzük a kórokozó átvitelét.

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* okozta hasmenésben szenvedő betegek 20%-a esetében kiújulnak a panaszok. Többségük reagál az újabb metronidazol- vagy vancomycin kezelésre, de a betegek 5%-a számos relapszust szenved el, azaz az ő kezelésük kérdéses. Mivel az antibiotikumok okozta hasmenést többnyire a természetes bélflóra egyensúlyának megbomlása okozza, a kutatás a bél mikrobiom élő mikroorganizmusokkal (probiotikumok, bioterápiás hatóanyagok, széklettranszplantáció) való helyreállítására irányul.

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:

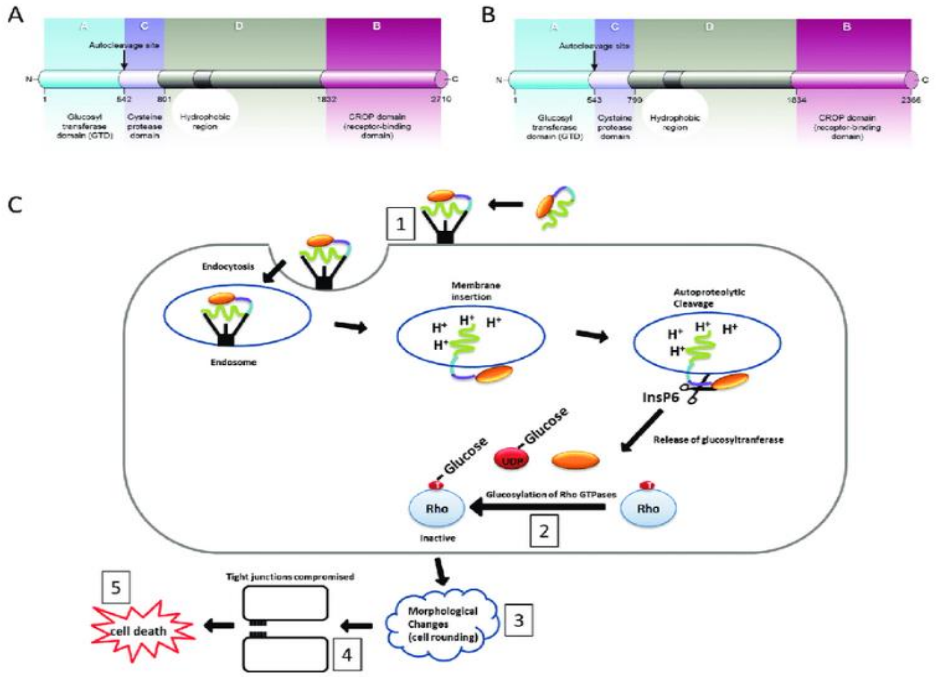
- A toxin (TcdA)
- B toxin (TcdB)
- Aktin-specifikus adenozin-difoszfát (ADP) riboziltranszferáz („binary toxin”) (CDT)

A *C. difficile* A és B toxin-termelésért felelős genomjának felépítése analóg a botulinus- és tetanustoxin-génekével és a *C. perfringens* UV-indukált P1 promoterével. A két toxin feltűnően nagy, egyetlen láncot alkotó molekula, hasonlóan a *C. novy* a-citotoxinjához (250 kDa) és a *C. sordelli* hemorrágiás toxinjához (300 kDa). Mindkét toxin N-terminális vége az enzimatikus (glükozil-transzferáz) domén, mely közeli rokonságban van a *C. sordelli* hemorrágiás toxinjának analóg doménjával. Mindkét toxinnak van egy centrális hidrofób szekvenciája membránkötő sajátsággal és egy C-terminálisa, mely a receptorkötő domén (**1. ábra**). A két toxingén egymás szomszédságában helyezkedik el a *C. difficile* kromoszómáján, s e toxinkazettát patogenitási szigetnek (Pathogenecity Locus: PaLoc) nevezik és eredetét horizontális transzfernek tételezik fel. Az A és B toxinok biológiai aktivitások széles spektrumával rendelkeznek, amelyek hozzájárulhatnak a CDI tüneteihez. Az A és B toxin ugyanazon mechanizmus alapján fejti 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 A, mivel több a toxin-specifikus receptor sűrűsége a sejten. A szakirodalom 2 fehérje receptorról számol be TcdB esetében, melyek a polivírus receptor-like protein 3 (PVRL 3, vagy más néven nectin 3) és a chondroitin szulfát proteoglikán 4 (CSPG4). A PVRL 3 nagymértékben expresszálódik a humán vastagbél epitélsejteken, és feltehetően nélkülözhetetlen a TcdB-mediálta toxicitásban, míg a CSPG4 a humán bél szubepitéliális myofibroblasztjaiban expresszálódik és hozzájárul az epitélsejtek pusztulásához (Smits WK. *et al.* 2016; Abt CM. *et al.* 2016). Bár a TcdB jóval hatékonyabb, mint a TcdA, mindkettő citotoxikus a legtöbb tenyésztett sejtre, ahol a kaszpáz-függő apoptózist kiváltja. A citoszkeleton toxinok által kiváltott megszakítása citopátiás hatásokat eredményez a tenyésztett

sejtekben a toxinhatás után és ezt a hatást a Rac1 (Ras-al összefüggő C3 botulinum toxin szubsztrát 1: aktin regulált GTPáz) inaktiváció közvetíti. A citopátiás hatás az aktin filamentumok dezintegrálódásában nyilvánul meg, a támadáspont nem közvetlenül az aktin, hanem a mindkét toxin N-terminálisán lokalizálódó monoglükozil-transzferáz tulajdonsága lévén kovalensen módosítja a Rho proteineket, melyeknek funkciója a citoszkeleton organizációja. A toxinok a Rho faktor 37-es pozíciójú treoninját glükolizálják, mely a proteinaktivitás elvesztéséhez és az F-aktin G-aktinná alakulásához vezet, ezek együttesen eredményezik a humán szövetkultúra sejtek lekerekedését, majd nekrózisát. A TcdA és a TcdB hatásos proinflammatorikus aktivitással is rendelkezik, képesek az intesztinális epitéliális sejtek és immunsejtek stimulálására, citokinek, kemokinek előállítására (Sun X. *et al.* 2010).

A toxin (TcdA): 308 kDa molekulatömegű fehérje, melynek az elsődleges klinikai tünetek kiváltásában van szerepe. Potens enterotoxin, de citotoxikus hatása is bizonyított, hatáserőssége a koleratoxin szintjét éri el (eltérő mechanizmussal) és extenzív epitéliális károsodást okoz a kolonban. Először a mikrovillusok csúcsai, majd a kefeszegély epitéliuma károsodik neutrofil infiltráció mellett, majd károsodnak a szoros (tight) junctiók is. Az A toxin hatására infiltráció jön létre az ileumban, megváltozik a membrán permeabilitása és gyulladás alakul ki. Kísérleti állatoknál az ileum és a kolon A-toxin érzékenysége eltér, a toxin hatására az ileumban a villusok nagymértékben károsodnak, kiterjedt hemorrágiás nekrózis alakul ki, véres, proteinben gazdag luminális folyadék képződik. A kolon területén az A-toxin hatása csak a felszíni epitéliumra terjed ki, intersticiális hemorrágiával, kevés proteint tartalmazó luminális folyadék képződésével. Kimutathatóan emelkedik az A-toxin által stimulált makrofágok citokin termelése (tumor nekrózis faktor, leukotrién, interleukin), az ileumban neutrofil leukocitás infiltráció jön létre és gyulladás alakul ki. **B toxin** (TcdB): 269 kDa molekulatömegű fehérje, amely a citotoxikus hatásért felelős. 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.

1. ábra: *C. difficile* toxin A és B sematikus szerkezete (A, B) és hatásmechanizmusa (C) (Cox MA. *et al.* 2017)



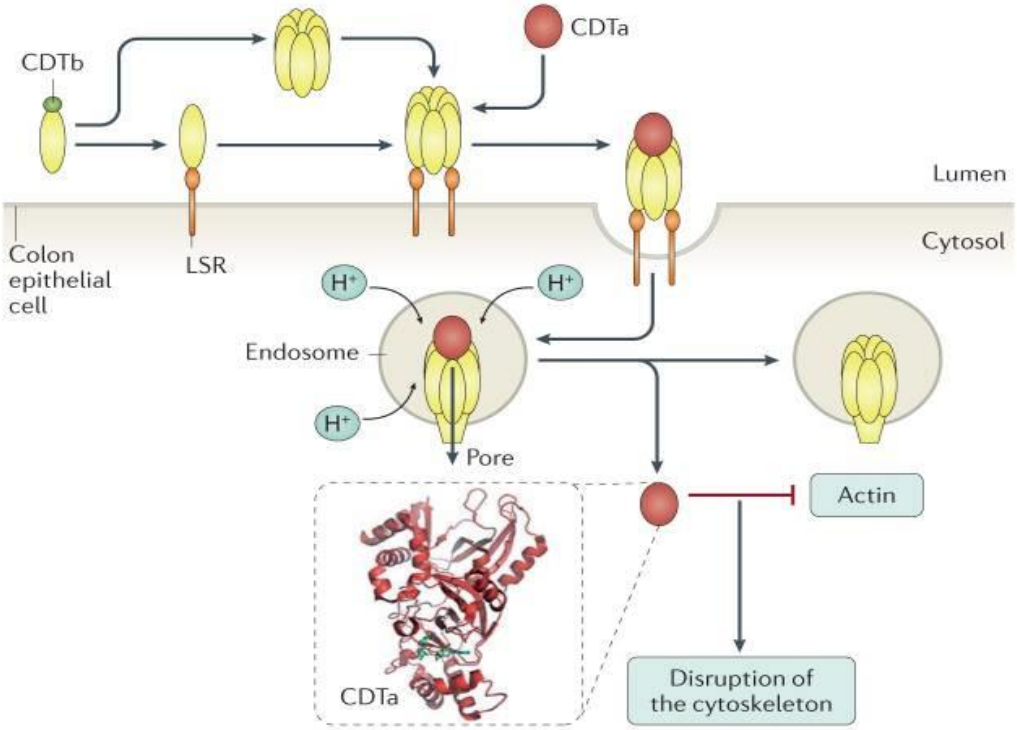
Aktin-specifikus ADP riboziltranszferáz (binary toxin: CDT): A célsejt aktin citoszkeletont károsítva a sejt pusztulását okozza. Ismert, hogy számos *Clostridium* faj képes binary toxint termelni; ezek a törzsek általában gyomor-bélrendszeri betegséget okoznak. A *C. spiroforme*-t nyúl bélgyulladásból és humán hasmenésből izolálták, és az állati enterotoxémiát társították az E típusú *C. perfringens*-hez (Braun M. *et al.* 2000).

A binary toxin az ún. A-B toxintípusba sorolható szerkezet és funkció alapján, két részből áll: egy 48 kDa molekulatömegű enzimatikus régióból (cdtA) és egy 94 kDa molekulatömegű kötő ún. binding régióból (cdtB). A kötő régió a célsejten a receptor felismerését, majd a receptorhoz kötődését végzi, míg az enzimatikus komponens a célsejtbe való bejutást biztosítja. A binary toxin citotoxikus aktivitása *in vitro* bizonyított: a CDT által módosított aktin károsítja az aktin citoszkelont, és citopátiás hatást eredményez sejtvonalon (Sundryial A. *et al*. 2010). Eukarióta sejtekben a cdtA ribozilálja az aktint, ami megakadályozza a további polimerizációt, valamint indukálja az F-aktin depolimerizációját és ezzel a sejt apoptózisát. A cdtB felelős a target sejten a receptorhoz való kapcsolódásért, továbbá az endoszómákon pórusokat képezve elősegíti cdtA átjutását a citoszolba (**2. ábra**), a baktériumtörzs megnövekedett adherenciája a target sejtekhez mikrotubulus protrúzionok formációja révén történik. A két alegységet két külön gén kódolja: *cdt*A és *cdt*B. (Gülke I. *et al*. 2001; Perelle S. *et al.* 1997). A TcdA és TcdB-vel ellentétben, a binary toxint kódoló *cdt*A és *cdt*B gének nem a PaLoc-ban lokalizálódnak, hanem az ún. binary toxin lókuszon (CdtLoc).

Számos törzs nem képes a binary toxin szekréciójára, így ezek a CdtLoc-ban egy ~2 kb nagyságú deléciót hordoznak. A binary toxinokat termelő törzsek három fő csoportra oszthatók: mind a toxin A, mind a B toxin-pozitív, mind a toxin A, mind a B toxin-negatív, valamint a toxin A negatív és a toxin B pozitív (Rupnik M. 2001/a), ezek alapján ma mintegy 34 úgynevezett toxin-típust (0, I től XXXIV) különítenek el (Rupnik M. 2010; 2016). E toxin szerepe (különösen, ha az izolátum mind toxin A, mind toxin B pozitív) a gyomor-bélrendszeri fertőzésekben egyelőre még nem világos, de a sejtvonalra gyakorolt citopátiás hatás és a hasonlóság más clostridium binary toxinokkal azt sugallja, hogy a *C. difficile* binary toxinja további fontos virulencia faktor. Irodalmi adatok, felmérések alapján nem járványos előfordulás alatt a *C. difficile* törzsek 5-8%-ában mutathatók ki a binary toxin-termeléséért felelős gének jelenléte.

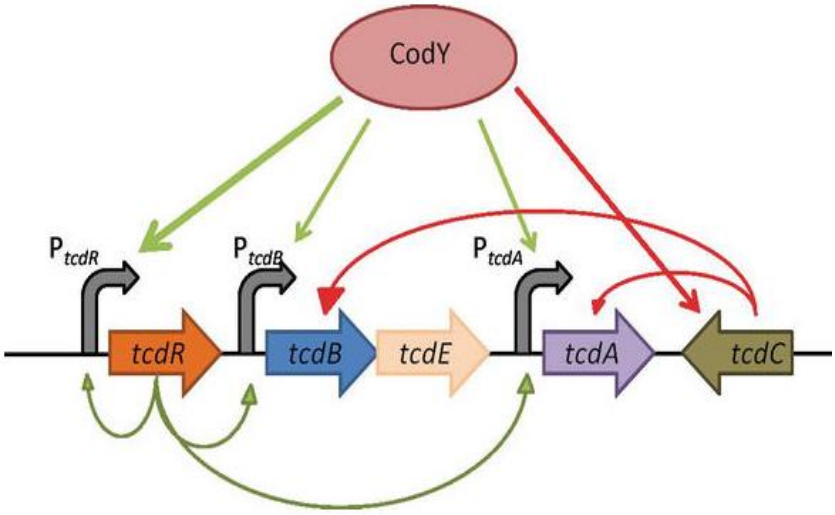
A toxin variáns törzseket pl.: TcdA negatív, TcdB pozitív korábban már többen is leírták; ezen törzsek közül az A toxin- negatív és B toxin-pozitív törzsek a legismertebbek, amelyek nem rendelkeznek a *tcd*A gén 3' régiójában lokalizálódó ismétlődő szekvenciával. Ezek a törzsek fals negatív eredményt adnak olyan kereskedelmi enzim immunoassay-ekkel, amelyek csak az A toxin jelenlétét mutatják ki. Az ilyen törzsek ugyan termelnek A toxint, de a karboxi-terminálison lokalizálódó receptorkötő domaint a kiterjedt deléció miatt elveszítik és minthogy ez az immunodomináns régió, az A toxin-specifikus tesztekben használt antitestek nem ismerik fel ezt a megváltozott szerkezetű fehérjét. Ezzel szemben a citotoxicitási vizsgálatok pozitívak, mivel a B toxin, amely egy igen hatékony citotoxin, intakt, jelen van.

2. ábra: A *C. difficile* binary toxin hatásmechanizmusa (Smits WK. *et al.* 2016).



Az A és B toxinokat kódoló gének egy 19,6 kb nagyságú patogenitási szigeten, az ún. PaLoc régióban helyezkednek el (**3. ábra**), a legtöbb törzsben a PaLoc a kromoszóma azonos régióján lokalizálódik. A PaLoc öt gént tartalmaz; közülük kettő két nagy fehérjetoxint kódol (*tcd*A az A toxint és *tcd*B a B toxint), három további gén vesz részt a szekréciójuk szabályozásában (*tcd*R és *tcd*C) és feltételezett módon a toxin transzportjában (*tcd*E). A *tcd*R egy alternatív szigma faktor, mely nélkülözhetetlen a TcdA és TcdB termelődéséhez, míg a *tcd*C funkcionális szerepe még nem teljesen tisztázott (Smits WK. *et al.* 2016). A *tcd*D pozitív regulátora az A és B toxin gén expressziónak, míg a *tcd*C negatív regulátora ezeknek a géneknek, a *tcd*E pontos szerepe még nem ismert. Az A és B toxint nem termelő törzseknél a PaLoc régió nincs jelen.

3. ábra: Az A és B toxinok szabályozása a *C. difficile* a PaLoc régióban
(Fernández-Garcia L. *et al.* 2017)



Úgy vélik, hogy a PaLoc által kódolt transzkripció két szabályozója a *tcd*R és a *tcd*C irányítja a *tcd*A és a *tcd*B promoterek expresszióját. A *tcd*R gén egy pozitív hatású szigma faktort kódol, amely a toxin promoterek és a saját promotere transzkripcióját szabályozza (Mani N. *et al.* 2001; Mani N. *et al.* 2002), ezzel szemben a *tcd*C a toxin szintézis negatív szabályozójának kódolására alkalmas (Carter GP. *et al.* 2011; Hundsberger T. *et al.* 1997; Matamouros S. *et al.* 2007). A *tcd*C-aktivitását alátámasztó bizonyítékok közé tartozik a járványtörzsek megjelenése: a *delta* vagy frame-*shift* mutációkkal a *tcd*C-ben, vagy a *tcd*C gén 117-es pozíciójában történő deléció, ami rendkívül magas toxin szintet eredményez (McDonald LC. *et al.* 2005; Warny M. *et al.* 2005).

Ezen tanulmányok szerint az epidémiás 027-es PCR ribotípus (lásd következő fejezet) egy „nonsense" mutációt hordoz a *tcd*C génen belül, ami hipervirulenssé teszi a törzset azáltal, hogy a *tcd*C gén inaktiválódik és ezzel a toxin-gének felszabadulnak a represszió alól. A bakteriofágok holin fehérjéjével homológiát mutató *tcd*E funkciója szintén nem teljesen tisztázott, de a szakirodalmak többsége arról számol be, hogy elősegíti a fő toxinok (A és B) szekrécióját. Az A és B toxinok szekréciója negatívan is befolyásolható: a glükóz jelenléte a baktérium közvetlen környezetében szignifikánsan csökkenti a toxintermelést, továbbá szintén a baktérium közvetlen környezetében található bizonyos aminosavak – mint például a cisztein és prolin – a CodY nevű transzkripciós regulátor hatása révén represszálják a toxintermelést (Smits WK. *et al.* 2016; Abt CM. *et al.* 2016). Ugyanakkor sem a teljes *tcd*C gén törlése, sem *tcd*C frame *shift* mutációk helyreállítása nem változtatja meg a toxin szintézist (Bakker D. *et al.* 2012; Cartman ST. *et al.* 2012), ami arra utal, hogy a *C. difficile* toxin szabályozás mechanizmusa más kulcsfontosságú szabályozó elemeket is tartalmazhat. Egyes kutatások szerint ez a szabályozó molekula elsősorban egy új tiolakton-kvórum-szenzing peptid lehet és ez a szabályozás független a *tcd*C-közvetített szabályozástól (Darkoh C. *et al.* 2015).

A *C. difficile* legfőbb patogenitási faktorai a toxinok, de ezek mellett számos egyéb tényező, így tok, kemotaxis, adhézió, illetve a különböző hidrolitikus enzimek (hialuronidáz, zselatináz, kollagenáz, heparináz) is jelentős szerepet játszhatnak a baktérium patogenitásában:

Tok: A baktérium által termelt poliszacharid tok a gazdaszervezetben a fagocitózissal szembeni védelmet biztosítja. **Kemotaxis**: Borriello megfigyelései szerint a bél mukózája kemoattraktánsként szolgálhat a baktérium számára, mely elősegíti a lumenből az epitél sejtek felé történő mozgást és a sejt felszíni receptorokhoz való kapcsolódást. A *C. difficile* motilitását flagellumok biztosítják, a különböző törzsek tisztított flagellinje 39 kDa molekulatömegű fehérje, a flagellint kódoló gén 60%-os homológiát mutat a *Bacillus subtilis hag* flagellin génjével (Borriello SP. 1998). **Adhézió**: A patogén mikroorganizmusok számára, így a *C. difficile* esetében is alapvető fontosságú a gazdaszöveten való adhézió, amely legkifejezettebb az ileum és a coecum területén. Az erősen virulens törzsek általában jobban adherálódnak, mint a kevésbé virulensek, amely bizonyítja hogy a patogenezisben a folyamat jelentős szerepet játszik. *In vitro* humán bélsejteken (pld. Caco-2, HT-29, Vero) történő adhézióban virulencia faktorként két hő-stimuált proteint azonosítottak, de ezek mellett részt vesz a baktérium fizikokémiai sajátsága is, míg a fimbriák, flagellumok szerepe egyenlőre még nem bizonyított (Janoir C. 2016). **Hidrolitikus enzimek:** A hidrolitikus enzimek a bél szöveti integritását megbontva elősegítik a baktériumok terjedését és hozzájárulnak a későbbi folyadék akkumulációhoz. A fokozottan virulens törzsek enzim produkció szempontjából sokkal aktívabbak, mint a kevésbé virulens törzsek. Így pl.: a kollagenáz termelés a legtöbb törzsnél mérsékelt, míg az erősen virulens törzseknél ez kiemelkedően magas.

A *C. difficile* törzsek típus meghatározásai

A 2000-es évek elejétől kezdve az először Észak-Amerikában, majd Nyugat-Európában és később egész Európában elterjedő, kiemelt epidemiológiai jelentőséggel bíró, hipervirulensnek tartott *C. difficile* törzsekre (pl. 027- vagy 078 PCR-ribotípus) jellemző, hogy súlyosabb lefolyású megbetegedést okozhatnak és magasabb a halálozási arány, mint más típusok esetében (Kuijper EJ. *et al.* 2006). Ezekben a törzsekben az A és B toxinok expressziójának negatív szabályozása csökkent, vagy hiányzik, ami az A és B toxinok hiperprodukciójához vezet, ezáltal a törzsek fokozott toxintermelésre képesek. *In vitro* vizsgálatban a 027-es PCR-ribotípus 16-szor több toxin A-t és 23-szor több toxin B-t termelt, mint más ribotípusú *C. difficile* törzsek. Gyors elterjedéséhez feltételezhetően hozzájárult, hogy spóratermelő képessége is fokozott. A 027 PCR-ribotípusú törzsek szelektálódása elsősorban a fluorokinolonok széles körű alkalmazásával hozható összefüggésbe, körükben a fluorokinolon-rezisztencia előfordulása nagyobb arányú. A hazai, Nemzeti Nosocomiális Surveillance Rendszer (NNSR) járványmoduljában 2011-től a kötelezően bejelentett kórházi járványok, illetve *C. difficile* okozta fertőzések moduljában bejelentett egyedi esetek elemzése alapján is megfigyelhető a CDI esetek számának hazai emelkedése. A sporadikus esetek bejelentése 2012 óta kötelező, ennek során 2012-ben 84 kórház 4 506 CDI esetet jelentett 22,3%-os halálozással. A kórházi környezetben terjedő CDI esetek mellett ma már a nemzetközi szakirodalomban egyre több közlemény számol be a kórházon kívüli hasmenéses esetek hátterében is a toxintermelő *C. difficile* kóroki szerepéről.

A restrikciós endonukleáz analízis (Restriction Endonuclease Analysis: REA) alapján BI típusú, a pulzáltatott mezejű gél elektroforézis (Pulsed-field Gel Electrophoresis: PFGE) NAP1 (Nort-American pulsed-field gel electrophoresis type 1) típusú és a polimeráz láncreakció (PCR) 027-es ribotípusú (ribotípus: 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. A tipizálási módszerek segítségével nyomon követhetjük a *C. difficile* által okozott infekciókat, elkülöníthetjük a sporadikus eseteket, esethalmozódásokat és a járványokat, reinfekciókat, rekurrens infekciókat, adatokat kaphatunk az egyes törzsek regionális vagy globális terjedéséről, követhető egy-egy virulensebb törzs cirkulációja.

Köszönhetően a hipervirulens törzs elterjedésének az elmúlt mintegy 20 évben számos molekuláris tipizálási módszer terjedt el a törzsek típusának meghatározására. Minden esetben az alkalmazott módszert úgy kell megválasztani, hogy a törzsek nagy része tipizálható, az alkalmazott módszer megfelelően diszkriminatív, reprodukálható és könnyen kivitelezhető legyen. A módszerek alapvetően két nagy csoportba sorolhatók: az 1980-as években a fenotipizálási, majd későbbiekben a genotipizálási módszerek terjedtek el. A fenotipizálási módszereket elsősorban alacsony reprodukálhatóságuk, alacsony diszkriminatív tulajdonságuk miatt kiszorították a genotipizálási módszerek, amelyek alapvetően két nagy csoportba sorolhatók: a “band”-alapú módszerek, melyek az 1990-es években és a szekvencia alapú módszerek, melyek a 2000-es évektől terjedtek el szélesebb körben. A “band”-alapú módszerek közül a legismertebb a hagyományos vagy kapilláris PCR ribotipizálás, a REA, PFGE, toxin-tipizálás, MLVA (Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis). A szekvenálás alapú módszerek közül az MLST (Multilocus Sequence Typing) és a felszíni (surface layer) proteinA szekvencia tipizálása a legismertebb, míg a teljes genom szekvenálás (Whole Genome

Sequencing: WGS), ugyan ígéretesnek mutatkozik, de a jelenlegi költségei miatt, egyenlőre még korlátozott az elérhetősége a diagnosztikai laboratóriumok számára (Kilgore G. *et al.* 2008).

A *C. difficile* törzsek tipizálására számos, molekuláris technikán alapuló módszer elérhető, azonban kereskedelmi forgalomban kapható *in vitro* orvosdiagnosztikai (IVD) minősítésű, tipizálásra alkalmas teszt jelenleg nincs forgalomban, ezért a nemzetközi tapasztalatok alapján választja ki az adott laboratórium a számára legmegfelelőbb módszert. Európában a PCR ribotipizálás terjedt el, főként egyszerűsége, a többi módszerhez képest alacsonyabb költsége és gyors kivitelezhetősége miatt. A módszer alapjait Gütler és munkatársai rakták le (Gütler V. 1993), majd Stubbs és munkacsoportja módosították *C. difficile*-re (Stubbs SL. *et al.* 1999): a PCR 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 pedig lehetőséget biztosít a törzsek epidemiológiai célból történő vizsgálatára.

A PCR ribotizálási módszer alkalmazása esetén cél az egyes, főként a domináns PCR ribotípusok földrajzi elterjedésének vizsgálata, azonban ez számos nehézségbe ütközött, mivel univerzális, mindenki számára elérhető és fejleszthető könyvtárra van szükség. Több év tapasztalata során világossá vált, hogy ennek a könyvtárnak a létrejötte nehézkes, ugyanis a laboratóriumok jelentős része a kidolgozott módszert saját laboratóriumára adaptálva finomításokat végzett, amely az egyes ribotípusok mintázatában változásokat eredményezett. Miután az irodalmi adatok alapján nyilvánvaló, hogy az egyes ribotípusok földrajzi megoszlása eltér, sőt egy-egy régión belül időszakonként, járó-és fekvőbeteg csoport szerint is eltér a ribotípusok előfordulása, a PCR-ribotipizálást helyi esethalmozódás vagy járvány esetén javasolt alkalmazni. Ilyen esetben a tipizálást végző laboratórium, az általa adaptált PCR-ribotipizálási módszerrel a saját adatbázisában végez összehasonlításokat annak a megállapítására, hogy az adott időszakban és adott helyen cirkuláló törzsek azonosnak tekinthetők-e.

A PCR termékek detektálására korábban speciális agaróz gél futtatást alkalmaztak, azonban Indra és munkatársai kifejlesztettek egy nagyfelbontású kapilláris gélalapú elektroforézis (Capillary Electrophoresis: CE) PCR ribotipizálási-módszert, azért hogy összehasonlíthatóbb adatokat nyújtson, így kiküszöbölje a klasszikus agaróz gél alapú módszerrel végzett törzstípusok eredményeinek laboratóriumi összehasonlításával kapcsolatos problémákat (Indra A. *et al.* 2008). Az európai referencia laboratóriumokban az agarózgél-alapú és CE-ribotípusok széles körben elterjedt alkalmazásával most már európai szintű megfigyelési tanulmányokat lehet végezni a főbb ribotípusok, kiemelten a 027-es PCR-ribotípus terjedésének értékelésére a különböző európai országokban (Barbut F. *et al.* 2007; Freeman J. *et al.* 2010, 2015; 2019; Bauer MP. *et al.* 2011).

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

A bevezetőben részletesen tárgyalt humán bél mikrobiom több ezer különböző baktériumfajból áll, amelynek kb. 99,9%-a obligát anaerob baktérium (Xu J., Gordon JI. 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 (Wexler HM. 2007; Könnönen E. *et al.* 2011). A *Bacteroides* törzsek az anyától származnak hüvelyi szülés során és ezáltal az élet legkorábbi (születés után kb. 10 nappal) szakaszában válnak a mikrobiom részévé (Reid G. 2004). 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. A szaccharolítikus metabolizmusuk végtermékei: ecetsav, borostyánkősav és izo-valeriánsav. Szfingolipidben-gazdag membránjuk menakinonokat: főként MK-10 és MK-11-et, a peptidoglikánjuk mezo-diaminopimelin savat tartalmaz. 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) (**1. táblázat**).

1. táblázat: A *Bacteroides-Parabacteroides* nemzetségek tagjai (Wexler HM. 2007 és http://www.bacterio.net/bacteroides.html)

***Bacteroides* sp.**				***Parabacteroides* sp.**
B. acidifaciens	*B. eggerthii*	*B. luti*	*B. salanitronis*	*P. chartae*
B. barnesiae	*B. gracilis*	*B. massiliensis*	*B. salyersiae*	*P. chinchillae*
B. caccae	*B. faecis*	*B. nordii*	*B. sartorii*	*P. distasonis*
B. caecicola	*B. finegoldii*	*B. oleiciplenus*	*B. sedimenti*	*P. faecis*
B. caecigallinarium	*B. fluxus*	*B. ovatus*	*B. stercoris*	*P. goldsteinii*
B. cellulosilyticus	*B. fragilis*	*B. paurosaccharolyticus*	*B. suis*	*P. gordonii*
B. cellulosolvens	*B. galacturonicus*	*B. plebeius*	*B. tectus*	*P. johnsonii*
B. clarus	*B. gallinaceum*	*B. propionifaciens*	*B. thetaiotaomicron*	*P. merdae*
B. coagulans	*B. gallinarium*	*B. putredinis*	*B. uniformis*	*P. goldsteinii*
B. coprocola	*B. graminisolvens*	*B. pyogenes*	*B. vulgatus*	
B. coprophilus	*B. helcogenes*	*B. rodentium*	*B. xylanisolvens*	
B. coprosius	*B. intestinalis*	*B. reticulotermitis*	*B. xylanolyticus*	
B. dorei	*B. heparinolyticus*	*B. rodentium*	*B. zoogleoformans*	

A *Bacteroides/Parabacteroides* nemzetségekbe tartozó fajok fontos tagjai a humán mikrobiomnak, egészséges körülmények között 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 opportunista patogének képesek a bélből kijutva (transzlokáció, ruptura, sérülések, műtétek, stb.) súlyos fertőzéseket is okozni, az általuk okozott infekciók általában polimikrobiálisak, melyekben fakultatív- és obligát anaerob baktériumok együttesen mutathatók ki. A *Bacteroides/Parabacteroides* nemzetség törzsei által okozott legsúlyosabb fertőzések: hasűri tályogok, appendicitis gangrenosa, nőgyógyászati, bőr- és lágyszöveti infekciók, agytályog, szepszis (Könnönen E. *et al.* 2011). *Bacteroides* izolátumok gyakran kitenyészthetők ovárium, petevezeték és Bartholin mirigy tályogokból, a *B. thetaiotaomicron* a kismedencei gyulladásos betegségben (Pelvic Inflammatory Disease: PID) tölt be patogenetikai szerepet (Heinonen PK., Leinonen M. 2003).

A bacteroidesek csak ritkán okoznak központi idegrendszer infekciókat (agytályog, szubdurális vagy epidurális empiéma és meningitis), endocarditist és pericarditist (Brook I. 2002/a; 2202/b). A bacteroidesek okozta szeptikus artritis és osteomyelitis gyakran hematogén úton alakul ki, protézis, reumatoid artritis, trauma hajlamosítanak ezekre a kórképekre (Senneville E. *et al.* 2006).

A nemzetségen belül a leggyakrabban izolálható fajok a régebbi nomenklatúra szerint az ún. „*B. fragilis* csoport"-ot alkotják, a bél mikrobiomban nagyszámban jelenlévő *Bacteroides/Parabacteroides* fajok okozzák a mikrobiológiai diagnózissal bizonyított, anerob baktériumok által okozott humán infekciók 50-60%-át. A *B. fragilis* az úgynevezett "típus-organizmusa" az anaerob baktériumoknak és egy a törzsfejlődés során korán elvált bakteriális törzsnek, a *Bacteroidetes* phylumnak (korábban *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides*–CFB-phylum). A *B. fragilis* a legpatogénebb fajuk, a leggyakrabban vizsgált és legtöbb potens virulencia faktorral rendelkező anaerob Gram-negatív pálca, melyet a bacteroidesek által okozott humán fertőzések csaknem 60-80%-ából izolálják, azonban ezzel ellentétben a bélflórában csak 0,5% körüli az aránya.

A *Bacteroides/Parabacteroides* fajoknak anaerob anyagcseréjük mellett több, sajátos biológiai vonásuk is van: egy külön törzsét (*Bacteroidetes* phylum) alkotják más egyéb rokon fajokkal (*Porphyromonas, Prevotella, Flavobacterium, Cytophaga*) az eubacteriumoknak, ezáltal genetikájuk is sajátos. Promotereik eltérőek a többi eubacterialis fajéitól, inszerciós szekvencia (Insertion Sequence: IS) elemeiknek fontos szerep jut az antibiotikum rezisztenciáért felelős gének kifejeződésében (Sóki J. 2013/a). Kisebb-nagyobb számban hordozhatnak kis molekulatömegű plazmidokat, amelyeknek a bacteroidesek életében betöltött szerepe még nem egészen tisztázott, így ezeket úgynevezett „rejtett", vagy „cryptic" plazmidoknak is nevezik.

A bél mikrobiomban mint antibiotikum rezisztencia faktor rezervoárok szerepelhetnek, gyakran számos antibiotikum rezisztenciát kódoló speciális, transzferábilis genetikai elemek (kis és nagy plazmidok, mobilizálható és konjugatív transzpozonok) hordozásával. A nagyszámú génnel rendelkező baktérium fajok, mint a bacteroidesek néhány gén expressziójával (pld. anyagcserét befolyásoló, toxikus anyagokat kipumpáló efflux pumpák, sejtfelszíni epitopok) kommenzális baktériumból veszélyes patogénné válhatnak (Gilmore MS. *et al.* 2003). A különféle rezisztencia-noduláció-divízió (Resistance-Nodulation-Division: RND) efflux pumpák expressziójának mértéke erősen függ az izolálásuk helyétől, ami további bizonyíték arra vonatkozóan, hogy a *B. fragilis* képes befolyásolni efflux rendszereit a külső környezettől függően (Pumbwe LC. *et al.* 2007).

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* fimbriái és agglutininjei adhezinként funkcionálnak, mely lehetővé teszi számukra, hogy a gazdaszövetekbe bekerüljenek. A lipopoliszacharid kapszula: LPS, és a termelt enzimek sokasága megvédi a baktérium törzseket a gazdaszervezet immunválaszától, a *B. fragilis* tok anyaga felelős a tályogképzésért. A hisztolítikus enzimek (hialuronidáz, kollagenáz, foszfolipáz A, fibrinolizin, heparináz, peroxidáz, kétkomponensű hemolizin: HlyA és HlyB, neuramináz) a szöveti destrukciókért felelősek.

A *B. fragilis* egyik fontos patogenitási tényezője: az enterotoxin

A *B. fragilis* enterotoxin (fragilizin: BFT) egy cink metalloproteáz (Kling JJ. *et al.* 1997; Moncrief JS. *et al.* 1995), mely az intesztinális epitéliumban a zonula adherensek szoros illeszkedéseit (tight junction) károsítja az E-cadherin hasításával (Wu S. *et al.* 1998), mely az epitéliális sejtek aktin-citoszkeleton átrendeződését és a „tight junction”-ok károsodását eredményezi. Ezen a barrieren rés keletkezik, így vastagbélgyulladás, hasmenés alakul ki a betegnél. Az enterotoxin-termelő *B. fragilis* izolátumok metalloproteáz aktivitása a HT29/C1 sejtvonalon ezen törzsek potenciális invazivitását feltételezi különböző infekciókban, azonban nem ismert, hogy ezek a törzsek tartalmaznak-e olyan egyedi genetikai tényezőket, amelyek virulenciát biztosítanak az extraintestinalis kórképben. A jelenlegi kutatások rámutattak arra, hogy ez a mechanizmus akkor alakul ki, amikor a BFT egy, az E-cadherintől különböző specifikus receptorhoz kötődik (Wu S. *et al.* 2006). 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 szegmensen helyezkednek el. Ez a genom szegmens kizárólag az ETBF törzsekben található meg és *B. fragilis* patogenitási szigetnek („pathogenicity island”) nevezik (Franco AA. *et al.*, 1999; Sears CL. 2001). Ma már egyre több bizonyíték van arra, hogy az enterotoxin termeléséért felelős gén patogenitási szigete egy új konjugatív transzpozonban található, ez a patogenitási sziget mobilizáló fehérjéket kódoló génekkel szomszédos és így átvihetők a nem-toxigén törzsekbe (Franco AA. 2004).

A *B. fragilis* törzsek enterotoxin-termelésének kimutatása munkaigényes folyamat: lehetséges módszer a toxin-termeléséért felelős gének (*bft*1-3) kimutatása molekuláris diagnosztikai módszerekkel: PCR-el (Shetab R. *et al.* 1998), vagy a BFT protein biológiai hatásának kimutatása sejt tenyészeten (erre a célra csak olyan sejtek használhatók, amelyek képesek polarizálódni in vitro körülmények között, pl. HT-29, Caco-2, HCT-8). Német és kaliforniai kutatók vizsgálatai alátámasztották, hogy a hemokultúra-izolátumok sokkal gyakrabban hordozzák az enterotoxin gént, mint az egyéb klinikai izolátumok (Claros MC. *et al.* 2000). Egy 2006-ban készült tanulmány szerint a hemokultúrából származó törzsek 57%-a tartalmazta a BFT termeléséért felelős patogenitási szigetet és/vagy a szomszédos génszegmenseket (19%-uk mindkettőt, 38% csak a szomszédos génszegmenseket), míg az egyéb klinikai mintákból származó törzsek esetén csak a törzsek 10%-a tartalmazta a patogenitási szigetet és a szomszédos génszegmenseket együttesen, 43%-ukban csak a szomszédos génszegmensek voltak jelen, 47%-ban pedig egyik genetikai elem sem. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a patogenitási sziget és a szomszédos génszegmensei a *B. fragilis* törzsek fontos általános virulencia faktorai lehetnek (Claros MC. *et al.* 2006). A BFT a ciklooxigenáz-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/a; Chung L. *et al.* 2018; Bao Y. *et al.* 2019.

A cisztein-proteázok olyan fehérje-bontó enzimek, melyek katalitikus centrumában két cisztein alkot egy könnyen felhasadni képes tiol-kötést. Eddig 72 cisztein proteáz családot írtak le, ezek közül 43 családot soroltak 9 szupercsaládba (klánba): a CA, CD, CE, CF, CH, CL, CM, CN és CO klánokba (Cambra I. *et al*. 2010). Ezen enzimek széles körben elterjedtek a növények, állatok, emberek, baktériumok és paraziták körében is. A C10 cisztein proteáz család 4 tagja tartozik a CA szupercsaládba, amelyet *B. fragilis* törzsekben fedeztek fel, ezek valószínűleg szerepet játszanak a gyulladásos bélbetegségek és az irritábilis bél szindróma patogenezisében

(Choi VM. *et al.* 2016). Nemrégiben azonosítottak egy olyan ortológ génből álló panelt, amely C10 proteázokat kódol a *Bacteroidetes* törzsekben, ideértve a *B. fragilis*-ben négy paralogén génkészletet (*bfp*1-4 néven) (Thornton RF. *et al.* 2010). A C10 proteázok papainszerű cisztein proteázok, és magukban foglalják a *Streptococcus pyogenes* pirogén exotoxin B-jét (SpeB) és a *Prevotella intermedia* Interpain A-ját. Mindkét enzim szerepet játszik a virulenciában: a SpeB hasítja a citokineket, aktiválja az MMP-9 gazda mátrix metalloproteázját és felszabadítja a kinint a kininogénből, íly módon a SpeB hozzájárul a szövetkárosodáshoz és a *S. pyogenes* inváziójához a gazdaszervezetben. Az Interpain A hozzájárul a *P. intermedia* fertőzések patogeneziséhez azáltal, hogy inaktiválja a komplement kaszkádot a C3 komplement faktor lebomlásán keresztül.

Ezen ortológok nyilvánvaló párhuzamos funkciói ellenére a *Bacteroides*-proteázok aktivitását és a virulenciához való hozzájárulásuk potenciálját még meg kell határozni. Utóbbi időben írták le a *B. fragilis* törzsekben azt a különleges, fragipainnak (Fpn) nevezett proteázt, amely a C11 család és a CD szupercsalád tagja. A fragipain szükséges a fragilizin aktiválásához, és Choi és munkatársai feltételezik a fragipainnak a szepszis patogenezisében betöltött lehetséges szerepét (Choi VM. *et al.* 2016). A BFT hozzájárul a szepszishez, azonosították a *B. fragilis* proteázt a fragipaint (Fpn), amely szükséges a BFT endogén aktiválásához az auto-inhibitor prodomain eltávolítása révén. Az Fpn szerkezeti elemzése egy His-Cys katalitikus diádot mutat, amely jellemző a C11 család cisztein proteázaira, amelyek konzerváltak számos patogén *Bacteroides* spp-*ben* és *Clostridium* spp-ben. Az enterotoxigén *B. fragilis* törzsekben az Fpn-hiánya csökkenti a törzs szepszist kiváltó képességét, azonban az Fpn nélkülözhetetlen a *B. fragilis* kolitiszben, ahol a gazda proteázok közvetítik a BFT aktivációját. Az *fpn* gén expressziója toxinogén és nem toxinogén törzsekben egyaránt azt sugallja, hogy ez a proteáz hozzájárulhat az anaerob szepszishez a toxin aktiválásában betöltött szerepén túl, potenciálisan célpontjaként szolgál a betegség módosulására. Ezen újonnan leírt patogenitási faktorok szerepe még nem kellően tisztázott, előfordulásukról a *B. fragilis* törzsekben még nagyon kevés adat áll rendelkezésünkre.

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok és a surveillance fontossága

A *Bacteroides/Parabacteroides* fajok rendelkeznek a legmagasabb rezisztencia-szintekkel és az irodalmi adatok alapján 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 mára már egyre több közlemény számol be az anaerob baktériumok fokozódó rezisztenciájáról a különböző anti-anaerob szerekkel szemben: fokozódik a rezisztencia a β-laktám antibiotikumokkal, a tetracyclinnel, a clindamycinnel szemben.

A *Bacteroides/Parabacteroides* 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.

Az elmúlt 20 évben csak néhány európai és országos vagy kórházi szinten végzett tanulmány (Wybo I. *et al*. 2007; Piérard D, *et al*. 1989; 1996; Betriu C. *et al*. 2008; Behra-Miellet J. *et al*. 2003; Boyanova L. *et al.* 2015) jelent meg és két nagyobb vizsgálat eredményeit közölték az USA-ból (Snydman DR. *et al.* 1999; 2007), melyek a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek antibiotikum érzékenységének epidemiológiáját vizsgálták. Emellett néhány tanulmány jelent meg egyéb földrészekről: Argentína: Fernández-Canigia L. *et al.* 2012; Costa-Rica: Cordero-Laurent E. *et al.* 2012; Taiwan: Wang FD. *et al.* 2014; Kuwait: Jamal W. *et al.* 2015; Japán: Takesue Y. *et al.* 2017.

A *Bacteroides/Parabacteroides* izolátumok antibiotikum-érzékenységére vonatkozó első jelentős több centrumos európai szintű vizsgálat 1988-1989-ben történt (Philips I. *et al.* 1992), a második vizsgálat 1999-2001-ben (Hedberg M., Nord CE. 2003). Már ezekben a közleményekben számos hagyományos anti-anaerob antimikrobiális szerrel és néhány újabb β-laktám antibiotikummal szembeni regionális eltérésekről és egyre növekvő rezisztenciáról számoltak be. A különböző *Bacteroides* fajok esetében és a különböző klinikai forrásokból származó izolátumok között egyes antibiotikumokkal szembeni rezisztencia-különbségeket észlelték.

Az elmúlt évtizedben csak néhány kazuisztikaként közölt **multi drug rezisztens** (MDR) *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek által okozott esetet publikáltak az Egyesült Államokból (Sherwood JE. *et al.* 2011; Husain F. *et al.* 2013; CDC Report 2013, Merchan C. *et al.* 2016), az Egyesült Királyságból (Wareham DW. *et al.* 2005), Görögországból (Katsandri A. *et al.* 2006), Japánból (Nakamura I. *et al.* 2017) és Dániából (Sydenham TV. *et al.* 2015). Egy összefoglaló dán tanulmányban 5 olyan, hemokultúrából izolált MDR *B. fragilis* izolátumot vizsgáltak, amelyek a *cfi*A, *nim*A, *nim*D, *nim*E, *nim*J, *tet*Q, *erm*B, *erm*F, *lin*A2 (clindamycin rezisztencia gén), *cep*A, *cfx*A, *bex*B géneket hordozták (Hartmayer GN. *et al.* 2012).

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.

A klinikai mikrobiológiai laboratóriumokban elvárás, hogy a klinikai mintákból az anaerob baktériumokat színtenyészetben tudják izolálni, és az identifikálás a genus szinten túl lehetőség szerint a species szinten is megtörténjen. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat egyes esetekben, nemzetközi ajánlások (Wadsworth Manual: Jousimies-Somer HR. *et al.* 2002) alapján kötelezően el kell végezni: olyan genus vagy species izolálása esetén, melyek között ismert a szokásos anaerob baktérium ellenes antibiotikumokkal szemben rezisztens egyedek gyakori előfordulása (pl. *B. fragilis* csoport tagjai), ha a szokásosan alkalmazott terápia nem sikeres, amikor az antibiotikum terápiának döntő szerepe van a fertőzés kimenetelében, ha súlyos, életet veszélyeztető infekcióról van szó, amikor várhatóan hosszan tartó antibiotikum terápiára lesz szükség az anaerob infekció leküzdésére, ha az anaerob kórokozót immundeficiens betegből izoláltuk, ha az anaerob baktériumot normálisan steril testfolyadékból, testüregekből, agytályogból, endocarditisből, osteomyelitisből, izületi infekcióból, szív- vagy érsebészeti beavatkozást követő infekcióból izoláltuk.

A *Bacteroides/Parabacteroides* fajok fontosabb rezisztencia mechanizmusai

A **β-laktámokkal** szembeni rezisztencia leggyakoribb mechanizmusa egy kromoszómán kódolt 2e osztályú cefalosporináz (a *cep*A gén terméke) β-laktamáz enzim termelése, amely szinte minden *Bacteroides* fajban megtalálható (Rogers MBA. *et al.* 1993). Néhány *B. fragilis* törzsben leírtak a kromoszómálisan determinált class A típusú enzim mellett más β-laktamázokat is, ezeket részben plazmidokon, részben kromoszómán elhelyezkedő gének kódolják. Az egyik ilyen különleges enzim csoport a cink-dependens class B típusú, karbapenemekre és cefamycinre is ható, a gátlószerekkel szemben rezisztens β-laktamáz. A gén jelenléte igazolható az izolált törzsek kb. 2%-ában, de csak jóval kevesebb törzs termeli az enzimet, azonban terápia során történő szelekciójuk súlyos gondot jelenthet a vegyes aerob/anaerob infekciók kezelése során.

Nemzetközi felmérésekből származó publikációk beszámolnak ezekről a megjelenő új rezisztencia génekről, a karbapenem-rezisztenciáért felelős *cfi*A és *ccr*A (mindkettő B osztályú metallo-β-laktamázokat kódol, Livermore DM, Woodford N. 2000) géneket hordozó klinikai izolátumok egyre növekvő számáról, illetve metronidazol rezisztens törzsekről. E két rezisztencia mechanizmus főként inaktiváló enzimek termelésén alapul, amelyek fenotípusos expressziójához inszerciós szekvencia (Insertion Sequence: IS) elemek a rezisztencia gének (*cfi*A: karbapenemek, *nim*: nitro-imidazolok) upstream régiójába történő megfelelő orientációjú integrációja szükséges. Ezen integráció szerepe, hogy felvett, vagy igazolt *Bacteroides*-specifikus promótereket szolgáltassanak a rezisztencia géneknek. A *cfi*A gének kromoszómális lokalizációjúak, *B. fragilis* specifikusak, transzferüket eddig nem tudták kimutatni, de a *cfi*A hordozó *B. fragilis* törzsek egy külön genetikai altípusát jelentik a fajuknak. Ez molekuláris tipizálási módszerekkel és a törzsek kromoszómális DNS-ének hibridizációs vizsgálatával derült ki. Megfigyelték a β-laktamáz gének (*cep*A normál cefalosporináz és a *cfi*A) és az enterotoxin gén (*bft*) különböző megoszlását is a két altípusban (Gutacker M. *et al*, 2000; 2002; Sóki J. *et al.* 2013/b). Penicillin-kötő fehérjék (Penicillin-Binding-Protein: PBP) módosulásán alapuló rezisztencia is kialakulhat, vannak olyan törzsek is, amelyek β-laktamázt nem termelnek, de a β-laktám antibiotikumokkal szemben rezisztensek: itt a megváltozott sejtfalpermeabilitás felelős a rezisztenciáért.

A valódi anaerob baktériumok kevés kivétellel érzékenyek a **nitro-imidazol** származékok iránt, melyek passzív diffúzióval jutnak be a sejtbe, ahol redukálódnak és egy citotoxikus metabolitjuk károsítja a bakteriális DNS-t. Bár a metronidazolt igen széles körben alkalmazzák mind a profilaxisban, mind a terápiában, ha anaerob baktériumok jelenlétével kell számolni, mégis aránylag elvétve kerül közlésre metronidazol rezisztens *Bacteroides* törzs izolálása klinikai anyagból. Az első metronidazol rezisztens *B. fragilis* törzsről 1978-ban számoltak be egy olyan betegnél, aki hosszú távú metronidazol terápiában részesült Chron betegsége miatt (Ingham HR. *et al.* 1978). A rezisztencia esetén a metronidazol sejten belüli redukciójának mechanizmusában és sebességében történik változás, ami a szer csökkent felvételéhez vezet. Feltehetően a folyamatért felelős kromoszómális gén pontmutációjának következménye a rezisztencia. Az elmúlt években bizonyították, hogy alacsony szintű metronidazol rezisztenciát okozhatnak nagy plazmidok, vagy a kromoszómán elhelyezkedő *nim* gén. A *nim* génekből jelenleg 11 altípust (A-K) ismerünk, amelyek kb. 75% homológiát mutatnak egymás között (Alauzet C. *et al.* 2018). Az eddig legjobban jellemzett A-D gének közül a B kromoszómálisan, az A, C, D plazmidon elhelyezkedőnek bizonyult és mind a négy

génnek a mobilitása bizonyított. A gén kis frekvenciával átvihető konjugáció-szerű folyamattal érzékeny recipiensbe. A rezisztenciát valószínű, hogy a nitro-reduktáz enzim aktivitás csökkenése és/vagy a lelassult antibiotikum penetráció okozza.

A **chloramphenicol** kötődik a bakteriális riboszómális peptidil-transzferázhoz, és így megakadályozza a fehérje bioszintézisét; a chloramphenicol-acetil-transzferáz enzim acetil-csoportot szállít az acetil-koenzim A-ból a chloramphenicol C-6 primer hidroxilcsoportjába, megakadályozva a módosított antibiotikumnak a riboszómához való kötődését és hatását a *Bacteroides* törzsek esetében (Britz ML, Wilkinson RG. 1978). A chloramphenicol rezisztencia leggyakoribb oka a szer enzimatikus hatástalanítása, a chloramphenicol acetiltranszferáz (Chloramphenicole-Acetyl-Transferase: CAT) enzim által acetilált vegyület nem képes kötődni a riboszómához. Számos, különféle CAT enzim ismeretes, amelyek a kromoszómán helyezkednek el, vagy plazmidok kódolnak.

Bár a **makrolidok, linkózamidok** és a **streptograminok** kémiailag különböző antibiotikum csoportok, a baktériumok rezisztencia mechanizmusainak hasonlósága miatt együtt tárgyalandók. A Gram-negatív baktériumok jelentős része természetes rezisztenciával rendelkezik a makrolidokkal szemben, mivel sejtfaluk a hidrofób molekulák számára inpermeábilis. A rezisztencia a *B. fragilis* törzsek között 5-20%, viszont az egyéb bacteroidesek esetében <5% a nemzetközi irodalmi adatok szerint. A szerzett rezisztencia háromféle mechanizmussal érvényesülhet: leggyakoribb a célmolekula változása, ritkább az antibiotikum molekula inaktiválása és az aktív efflux mechanizmus. Az MLS_B típusú rezisztencia (makrolidok, linkózamidok és a streptograminok: Macrolides-Lincosamides-Streptogramine B: MLS_B) esetében az 50S riboszómális alegységben a 23S riboszómális RNS adeninjének, mint célmolekulának metilációja eredményezi az antibiotikum csökkent kötődését **(**Roberts MC. 2003). Plazmid, vagy kromoszómális gén (*erm*A, *erm*B, *erm*C, stb.) kódolhatja ezt a mechanizmust, és transzpozon közvetíti, terjeszti akár speciesek között is. Ez a rezisztencia típus lehet indukálható, vagy konstitutív, az induktor lehet maga az erythromycin, vagy egyéb 14, ill. 15 tagú makrolid. E mechanizmus konstitutív típusa a makrolidok, linkózamidok és a streptogramin B között teljes keresztrezisztenciát eredményez a Gram-pozitív coccusokban, azonban ez a mechanizmus a streptogramin A-t nem érinti. A rezisztencia másik mechanizmusa az enzimatikus bontás, amelyet plazmid kódol és nem jár a makrolidok közötti keresztrezisztenciával. A tapasztalatok szerint a makrolidok alkalmazásának gyakorisága és a rezisztencia előfordulása között összefüggés van. A *Bacteroides-Parabacteroides* törzsek esetében a makrolid-linkózamid rezisztencia előfordulása földrajzi régiónként, ill. országonként is jelentősen változhat.

A **tetracyclin** rezisztencia a legelterjedtebb antibiotikum rezisztencia a természetben, a leggyakrabban extra-kromoszómális DNS elemek kódolják azokat a proteineket, amelyek szerepet játszanak a tetracyclin aktív effluxában, vagy a célmolekula, a riboszóma védelmében. Ritkább a kromoszómán bekövetkező mutáció, amely a külső membrán permeabilitásának megváltozását eredményezi. A *Bacteroides* törzseknél a rezisztencia kromoszómális gén által determinált. A gén megváltoztatja a célmolekulát, azaz a baktérium riboszómáját, így a tetracyclin nem tudja a hatását kifejteni. A kétkomponensű jelátviteli rendszerek lehetővé teszik a szervezetek számára, hogy érzékeljék és reagáljanak a változásokra különböző környezeti körülmények között. A prototípus szerkezete jól konzervált, és tartalmaz egy hisztidin protein kinázt, amelyet a környezeti ingerek szabályoznak. Az ingerre adott válaszként ez a fehérje egy hisztidin-maradékon autofoszforilál és nagy energiájú foszforilcsoportot hoz létre. A foszforilcsoportot ezután a válasz-szabályozó fehérje aszpartát-csoportjába viszi át; ez

konformációs változást indukál a szabályozó doménben, ami egy társult lefelé irányuló domén aktiválását eredményezi és a reakciót okozza (Stock AM. *et al.* 2000). A válasz-szabályozók többsége a DNS-kötő effektor doménekkel rendelkező transzkripciós faktor, bár némelyiküknek enzimként működő C-terminális doménje van.

Az egyik *Bacteroides* kétkomponensű szabályozási rendszer amelyet alaposan tanulmányoztak, az RteA-RteB kétkomponensű rendszer. Az anaerob baktériumok a rezisztencia génjeiket horizontális géntranszfer útján cserélik ki. A konjugatív transzpozonok (Conjugative Transposon: CTn) és/vagy plazmidok egy vagy több rezisztencia gént tartalmaznak, amelyek például alacsony antibiotikum-koncentrációjú körülmények között átvihetők. Az anaerob baktériumokban leggyakrabban vizsgált CTn a CTnDOT, melynek mérete 65 kb, rezisztenciát kódol a tetracyclin és az erythromycin ellen, számos *Bacteroides* fajnál megtalálható.

A *Bacteroides* CTn-ek az első felfedezett fontos konjugatív transzpozonok közé tartoztak és azóta kimutatták, hogy központi szerepet játszanak az antibiotikum rezisztencia gének e nemzetségben és a rokon családokban történő terjesztésében. Ez a CTn egy tetracyclin rezisztencia gént tartalmaz: a *tet*Q-t (riboszóma védő mechanizmus), amely rendszerint a clindamycinnel szembeni rezisztenciáért felelős *erm*F génnel együtt fordul elő. A CTnDOT konjugatív transzfere komplex eseménysorozat, amelyet a tetracyclin alacsony koncentrációjának a baktériumsejtre gyakorolt hatásával vált ki. A *tet*Q tetracyclin rezisztencia gén az *rte*A-*rte*B-*tet*Q operon része, amely egy mobilis integratív és konjugatív elemen (Integrative and Conjugative Element: ICE) a CTnDOT-on található, számos *Bacteroides* törzsben. Az RteA az érzékelő komponens és az RteB a transzkripciós szabályozó, amely szabályozza egy harmadik downstream gén, az *rte*C expresszióját. Az RteC termék viszont egy géncsoportot (*orf2*C) szabályoz, ami fontos a CTnDot elem kivágásához (és ezért átadásához). A tetracyclinnek serkentő hatása van az RteA-RteB rendszer expressziójára, ezáltal mind a tetracyclin rezisztencia expressziójára, mind a transzlációra, az *rte*A gén azonban nem érzékeli közvetlenül a tetracyclineket, és pontosan, mit érzékel, még nem tisztázott (Moon K. *et al.* 2005). A másik rezisztencia géncsoport a *tet*X, illetve *tet*X1 gének melyek a FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid)-dependens mono-oxigenázokat kódolják, melyek a roncsolják a tetracyclin molekulát.

A **kinolonok** gátolják a két specifikus enzimet, a DNS girázt és a DNS topoizomerázt, amelyek elősegítik a bakteriális DNS replikációját, és ezeknek az enzimeknek a mutációi a kinolon rezisztencia leggyakoribb okai. A topoizomeráz a DNS kettős szál egyikét hasítja időlegesen majd kapcsolja újra össze, a giráz a DNS mindkét szálát hasítja, majd idővel újból összekapcsolja. A giráz egy tetramer enzim, amely két A és két B alegységből áll, amelyeket a *gyr*A és a *gyr*B gének kódolnak, a topoizomeráz IV, a *par*C és *par*E gének által kódolt heterodimer is részt vesz a kromoszóma-felosztásban. Ezen enzimek működése a DNS-replikáció és a DNS-transzkripció során válik fontossá, hiszen ezen folyamatok során szükségeltetik a két polinukleotid DNS-szál lokális szétválása. Nevük onnan ered, hogy ezen enzimek a DNS topológiai állapotát befolyásolják, vagyis a kapcsolási számot, a „linking number”-t csökkentik, viszont nincsenek hatással a DNS-kovalens struktúrájára. A szerkezeti topoizomeráz-változásokat, amelyek csökkentik ennek az enzimnek a fluorokinolonokhoz való affinitását, a *gyr*A és *par*C gének kinolon-rezisztenciát meghatározó régióiban (Quinolone Resistance-Determining Regions: QRDR) mutációi okozzák. Azok a mutációk a *gyr*A-ban melyek a fluorokinolon rezisztenciát okozzák a *B. fragilis*-ban a 82-es és 86-as „hot-spot”

pozíciókban lettek azonosítva (ekvivalensek a 83 és 87 pozíciókkal *Escerichia coli*-ban) (Ricci V. *et al.* 2004; Oh H. *et al.* 2001). A *gyr*B-ben, a *par*C-ben és a *par*E-ben lévő szubsztitúciók rendkívül ritkán fordulnak elő és eddig még nem igazán jellemezték a *B. fragilis* törzsekben.

A baktériumok rezisztenssé válhatnak a kinolonok sejtből történő megnövekedett kiáramlása, aktív effluxa miatt is, Miyamae a norfloxacin aktív kiáramlását írta le egyes *B. fragilis* törzsekben és úgy találta, hogy az effluxot egy olyan efflux pumpa katalizálja, amely hasonló a NorA/Bmr-hez (Miyamae S. *et al.* 1998). A *B. thetaiotaomicron* egy MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion) családba tartozó multidrug efflux exportőrrel (*Bacteroides* exporter A: BexA) rendelkezik, amely a fluorokinolonokat kipumpálja a baktériumsejtből (Miyamae S. *et al.* 2001; Ghotaslou R. *et al.* 2018).

2.5. 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 kitenyésztett baktériumok faj-szintű azonosítása (identifikálás). Ez kétféle megközelítéssel lehetséges: fenotípusos és genotípusos jellemzők alapján. 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 gének megnyilvánulását (expresszióját), működését azonban jelentősen befolyásolják a környezeti hatások, ezért a vizsgálati körülményeket minden laboratóriumban szigorúan standardizálni kell. A másik módszer a genotípus meghatározásán alapuló módszerek összessége, a baktérium genotípusát egyértelműen meghatározza a genomot felépítő nukleinsavak szekvenciája, amely stabil, a környezettől független állandó jellemző. Azonban a genomalkotó nukleinsavak nem azonos információ-értékű szakaszokat tartalmaznak, ugyanis vannak nem kódoló részei is, és a kódoló szakaszok között is találhatók konzervatív (hasonló vagy azonos szekvenciájú) és változékony szekvenciájú gének.

A rutin klinikai mikrobiológiai diagnosztikai laboratóriumokban az 1970-80-as évekig a baktériumok fenotípusos jellemzése volt a fő identifikálási módszer, a mikroorganizmusok anyagcsere-folyamataiban szerepet játszó extra- és intracelluláris enzimek, a biokémiai reakciók köztes-, illetve végtermékei jellemzőek az adott mikroorganizmusra, ezért vizsgálatuk diagnosztikai szempontból igen fontos, azonban ehhez munka- és időigényes biokémiai tesztek elvégzése szükséges. A diagnosztikában ebben az időben már megjelentek a különböző kemotaxonómiai vizsgálatok, mint például a peptidoglikánok és lipidek (légzési kinonok, poláros lipidek és hosszú szénláncú celluláris zsírsavak) GLC analízise. Ezeket a vizsgálatokat gyakran különböző biokémiai eljárásokkal (mint például a multilokusz enzim elektroforézis, vagy a nátrium dodecyl szulfát poliakrilamid gél elektroforézis: SDS polipeptid analízis) egészítették ki.

1974-ben Anhalt és Fenselau elsőként publikálták, hogy a tömegspektrometria által detektált biomarkerek alkalmazhatóak a baktériumok meghatározására (Anhalt JP., Fenselau C. 1974). A kezdeti kutatások a poláros zsírsavak analízisén alapultak, melyek a baktérium szárazanyag tartalmának mintegy 5%-8%-át alkotják, a modernebb kutatások a fontosabb

proteinek vizsgálatára fókuszálnak, főként a 2000-20 000 Da (60%-70%-a a baktérium szárazanyag tartalmának) molekulasúly tartományban. 1994-ben Cain és munkacsoportja azt közölték, hogy a MALDI-TOF MS módszer jól használható meghatározott baktériumok elkülönítésére a roncsolt sejtek protein-profil analízise alapján (Cain TC. *et al.* 1994). Két évvel később három különböző munkacsoport: Claydon MA. *et al,* Holland RD. *et al.* és Krishnamurthy T. *et al.* (1996) a módszer alkalmasságát bizonyította be intakt baktérium sejtek esetében is.

A tömegspektrometria (Mass Spectrometry: MS) olyan kémiai/biokémiai analítikai 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. Az elv alkalmazásának több módszere létezik, ezek az ionizáció mechanizmusában és az alkalmazott tömeganalizátor természetében, mechanizmusában különböznek egymástól. A módszer hagyományosan kémiai, gyógyszerészeti vizsgálatokra való alkalmazhatóságát a kíméletesebb ionizációs eljárások megjelenése kibővítette, így már a nagyobb molekula tömeggel rendelkező biomolekulák kimutatására is alkalmasnak bizonyult. Az élő szervezetek komponenseinek vizsgálatára plazma deszorpciót, gyors atombombázást, lézer deszorpciót és elektrospray ionizálást alkalmaztak, a MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation) eljárás kidolgozásával pedig lehetőség nyílt a biomolekulák gyakorlatilag felső tömeghatár nélküli vizsgálatára. Az eljárás lényege: a biológiai mintát összekeverik egy mátrix oldattal (például alfa-ciano-4-hidroxi-fahéjsav vagy dihidroxi-benzoesav), mely képes elnyelni az ionizációhoz használt lézer energiáját. Az analit a mátrix kis molekuláiba ágyazódik, amelyek a lézer energiáját átadják az analit makromolekuláinak. A folyamat közben a makromolekula-mátrix komplexek a vizsgálati mintából felszabadulnak (deszorpció), majd a keletkező molekulaionokat nagyvákuumban egy gyorsítófeszültség juttatja az analizátorba. Az ionok tömeg és töltés szerinti elválasztása, majd detektálása TOF (Time of Flight) analizátorban történik. A vizsgálat eredménye egy tömegspektrum-profil (main spectrum profile: MSP) lesz, amely a minta ionjainak molekula tömegét reprezentálja. A kapott tömegspektrum csúcsai tehát a vizsgált minta egyes fehérjéinek felelnek meg.

A mikrobák jellegzetes, a taxonra jellemző fehérjeprofillal 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 transzkripciós) proteinjeinek analízisén alapulnak, kihasználva azt a tényt, hogy ezek a fehérjék nagy mennyiségben találhatóak meg a sejtekben. A mért fehérjeprofil, 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. Mivel ez a technika igen érzékeny, így igen kis anyagmennyiség (10^4–10^5 CFU baktériumszám) elegendő a vizsgálat elvégzéséhez. Számos vizsgálat bizonyítja, hogy a MALDI-TOF-MS a baktérium sejtekben található biológiai komponensek gyors vizsgálatára is alkalmas, az eljárás segítségével egyszerűen tanulmányozhatók intakt baktérium sejtek, ezáltal jelentősen lerövidítve a minta-előkészítés időszükségletét.

A MALDI-TOF-MS módszerrel kapott tömegspektrumok reprodukálhatóságát több tényező befolyásolhatja egy-egy taxon esetében, így például a minta előkészítés, a szaporodási fázis, a tenyésztési körülmények, az ionok tömeg-tartománya és a műszerek közötti reprodukálhatóság (Nagy E. *et al*. 2014). Irodalmi adatok alapján a MALDI-TOF MS-módszerrel az aerob izolátumok 84–97%-a pontosan azonosítható fajszinten a hagyományos fenotípusos identifikáló módszerekhez hasonlítva az eredményeket (Bizzini A. *et al*. 2010; Wieser A. *et al.* 2012; Seng P. *et al.* 2013; Wattal C. *et al.* 2017).

Az **anaerob baktériumok** species szinten történő identifikálásában számos előnnyel jár ez a módszer (Nagy E. *et al*. 2017; Nagy E., Schuetz A. 2018). Az általában polimikróbás, kevert aerob-anaerob infekciókban szerepet játszó anaerob baktériumok generációs ideje jóval hosszabb, mint az aerob-, fakultatív anaerob baktériumoké, így tenyésztésük során hosszabb inkubációs időt igényelnek, majd a színtenyészet nyerése érdekében végzett további szubkultúra készítését követően lehet csak elvégezni az identifikálásukat. 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, ezért ilyen esetekben a mikrobiológiai laboratóriumok eltekintenek a pontos species meghatározástól és csak „Vegyes anaerob flóra tenyészett" leletet adnak ki a klinikusnak. A MALDI-TOF MS-módszer előnye ebben az esetben, hogy a vegyes tenyészetben jelenlévő, de izolált telepek is alkalmasak lehetnek akár a tenyészetből közvetlenül történő ("direkt") species identifikálásra. A MALDI-TOF MS használatának egyik fő előnye a megtakarított idő, mivel az adott baktériumtörzs azonosítása kevesebb, mint egy óra alatt végezhető el, szemben a 24–72 órával, ez az idő kritikus a súlyos alapbetegségekben szenvedő betegeknél, immunhiányos betegeknél, sebészeti, intenzív osztályokon fekvő, lélegeztetett szeptikus betegeknél.

Ma már számos újonnan leírt, vagy eddig ritkán izolált, "félreidentifikált" anaerob baktérium identifikálásának lehetősége nyílt meg a módszer segítségével a rutin diagnosztikai laboratóriumok számára is. Intenzív adatbázis-fejlesztés eredményeként jelenleg több mint 3000 különböző Gram-pozitív és Gram negatív anaerob species/subspecies található a MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Bréma, Gr.) adatbázisában, azonban ez egy állandóan és dinamikusan fejlődő adatbázis, mely újabb és újabb speciesekkel bővülhet. A módszer egyre kiterjedtebb használatával egyre több, ritkán izolált, eddig apatogénnek tartott, vagy új, eddig még nem ismert anaerob species klinikai jelentőségére derül fény. A species szintű identifikálás mellett a MADI-TOF MS-módszer egyes esetekben lehetővé teszi a hagyományos módszerekkel nem, vagy nehezen elkülöníthető speciesek-subspeciesek pontos identifikálását is. Jó példa erre a hagyományos biokémiai módszerekkel nem elkülöníthető *Prevotella (P.) nigrescens* és *P. intermedia,* illetve a *Clostridium (C.) chauvoei* és a *C. septicum* fajok elkülönítése, amely ugyanolyan megbízható MALDI-TOF MS-módszert alkalmazva, mint 16S rRNS gén szekvenálással vizsgálva (Grosse-Herrenthey A. *et al.* 2008; Wybo I. *et al.* 2012). A módszer alkalmas a speciesen belüli, ún. szubspeciesek (alfajok) meghatározására, mint például a *Fusobacterium (F.) nucleatum* esetében, ahol az ismert öt *F. nucleatum* alfajból (*F. animalis, F. fusiforme, F. nucleatum, F. polymorphum* és *F. vincentii*) a MALDI-TOF MS módszerrel nagy biztonsággal négy különböző klasztert tudtak meghatározni (Nie S. *et al.* 2015).

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. Saját vizsgálataink is

igazolták azt a szakirodalomban már publikált megfigyelést, hogy a módszer alkalmas a *Streptococcus agalactiae* magas virulenciájú ST17 és ST1 klónjainak elkülönítésére a törzsek rutin identifikálását követően (Lartigue MF. *et al*. 2011; Rothen J. *et al*. 2019). A tömegspektrumok alapján készített dendogramok a vizsgált törzsek közötti hasonlóságról adnak felvilágosítást néhány perccel az azonosítást követően. Kutatások bizonyítják, hogy a módszer valódi, járványügyi szempontból fontos tipizálási vizsgálatokra is alkalmas lehet: például az igen komoly járványügyi jelentőséggel bíró, gyakoribb előfordulású *C. difficile* PCR ribotípusba tartozó törzsek (001, 027 és 126/078) elkülönítésének lehetősége egy saját fejlesztésű adatbázis használatával a SARAMIS (Simadzu) szoftver segítségével (Rizzardi K., Akkerlund T. 2015).

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. A baktérium kommenzális, a normál bőr mikrobiom tagja, a legtöbb esetben kontamináns egyes (főként hemokultúra) klinikai mintákban. Brüggemann és munkacsoportja 2004-ben a teljes *C. acnes* genomot megszekvenálták (Brügemann H. *et al*. 2004) így azóta ismert, hogy a különböző infekciókból (acne vulgaris, szemészeti-, bőr-lágyrész fertőzések, sebészeti-, eszközzel összefüggő fertőzések és véráram fertőzések) izolált *C. acnes* törzseket a *tly* (feltehetően hemolysin/citotoxin) és a *rec*A (nem-riboszómális housekeeping gén: a DNS-t javítja és karbantartja) gének nukleotid szekvencia analízise alapján a *C. acnes*-t négy különálló evolúciós vonalba sorolták be: IA, IB, II és III típusok, amelyek különbséget mutatnak a gyulladáskeltő tulajdonságokban, a virulencia determinánsok termelésében és a különböző körülményekhez való adaptációban (McDowell A. *et al*. 2005; 2012; Nagy I. *et al*. 2006). Számos tipizálási módszert használtak (szerotipizálás, immunofluoreszcens mikroszkóp, különböző molekuláris genetikai módszerek: a *recA, tly* és 16S rRNS gének szekvenálása, MLST és eMLST: extended Multi-Locus Sequence Typing), az elmúlt évek során annak eldöntésére, hogy a humán klinikai mintákból izolált *C. acnes* törzsek valós patogének az adott kórfolyamatban, vagy a nomál flóra részeként kontaminálják a mintát. Az irodalmi adatok alapján a *C. acnes* törzseknek bizonyítottan szerepük lehet súlyos infekciókban: acne, protézis beültetést követő kései izületi infekciók, endocarditis, endophtalmitis, prostata tumor vagy idegsebészeti beavatkozást követő infekciók (Aubin GG. *et al*. 2014; Acherman Y. *et al*. 2014; Boisrenoult P. 2018).

Az I. típus általában bőr kolonizációval jár (McDowell A. *et al.* 2005), az IA típus játszik szerepet az acne kialakulásában, az IB típus és a II típusú törzsek különböző lágyrész- és mély szöveti infekciókkal, és a szepszissel vannak összefüggésben. A II-es típusú törzseket gyakran izolálják prosztata kancerozus szövetekből, míg a A III-as típusú törzsek szerepéről a bőr progresszív makuláris hypomelanozisában manapság egyre több közlemény számol be. A II. és a III. típusok gyakran az implantált protézisek fertőzéseihez kapcsolódnak (McDowell A. *et al.* 2013; Sampedro MF. *et al.* 2009), ami az implantátum fertőzések patogenezisében lehetséges szerepükre utal, az újabb kutatások alapján, mint opportunista kórokozó társulhat a fogászati gyökérkezelés utáni apikális periodontitishez (másodlagos endodontikus fertőzés) (Niazi SA. *et al.* 2016).

Közlemények azt bizonyítják, hogy az IA, IB és II típusú *C. acnes* törzseket a bőrflóráról izolálják mind Európában mind Japánban (Dekio I. *et al.* 2012), de ez a vizsgálat a III-as típusú *C. acnes* törzsek globális elterjedését is igazolta atópiás dermatitisben szenvedő betegek és egészségeses emberek bőrén. Egy másik, 2009-ben közölt vizsgálatban, mely a *rec*A gén

szekvencia polimorfizmus vizsgálatán alapult, a mély szöveti infekciókból származó és az egészséges homlokbőrről származó *C. acnes* típus megoszlását vizsgálta, nem talált szignifikáns különbséget az IA, IB és II típusú törzsek prevalenciája között (Holmberg A. *et al.* 2009). A legújabb kutatások, melyek az eMLST tipizálást használták, azt találták, hogy az acne kialakulása főként az IA_1 típusú klonális komplexhez kötött, a szemészeti infekciókban az IA_1 és az IA_2 típusú törzsek játszanak szerepet, míg a IB- és a II típusokat sokkal gyakrabban izolálták bőr- és lágyszöveti és orvosi eszköz-eredetű infekciókból (McDowell A. *et al*. 2005).

A humán klinikai fertőzéses kórfolyamatokban a tünetekért felelős kórokozó pontos identifikálása után az antibiotikum érzékenységi teszt (Antibiotic Sensitivity Test: AST) elvégzése az egyik legfontosabb információ, amely befolyásolja a klinikai kezelést. Célszerű egy gyors és megbízható módszer kidolgozása a gyógyszer-érzékenység kimutatására MALDI-TOF MS alkalmazásával. Számos AST-detektálási elvet fejlesztenek ki és tesztelnek: pld: (1) a gyógyszer-rezisztens törzs biomarkerek kimutatására; (2) az antibiotikum lebomlásának tömegspektrometriás kimutatása (ez a megközelítés elsősorban a β-laktám antibiotikum rezisztenciát határozza meg); és (3) stabil (nem radioaktív) izotóppal jelölt aminosavak stb. kimutatása (ez elvileg az antibiotikum-rezisztencia bármely mechanizmusának kimutatására használható). Több, főbb rezisztencia-mintázat pontos meghatározására alkalmas módszer kifejlesztésén is dolgoznak a kutatók, ilyen például egy széles spektrumú β-laktamázokat (Extended-spectrum Beta-Lactamases: ESBL) és AmpC típusú rezisztenciát szűrő panel, amely a MALDI-TOF MS-alapú, közvetlenül célzott mikrodroplet növekedési vizsgálatot (DOT-MGA) alkalmazza (Correa-Martinez CA. *et al.* 2019).

A *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek karbapenem rezisztenciájának kimutatását kétféleképpen végezhetjük a módszer alkalmazásával. Az egyikben azt használjuk ki, hogy 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 *cep*A gént, míg a Divízió II a karbapenemázt kódoló *cfi*A gént hordozza kizárólagosan. A genetikai különbség megmutatkozik a MALDI-TOF-MS-profilokban is, és így MALDI-TOF-tipizálással a karbapenemázt termelő Divízió II-es törzseket is felismerhetjük (Nagy E. *et al*. 2011). A másik módszer esetén a karbapenem molekulák tömegspektrumát vizsgáljuk a karbapenemmel elegyített adott *Bacteroides* törzs szuszpenziójában és ha az intakt karbapenem tömegspekrometriás csúcsának eltűnésével egy vízmolekulányival magasabb csúcs is megjelenik a karbapenem hidrolízisére, inaktivációjára következtethetünk (Johansson Á. *et al*. 2014).

3. Célkitűzések

Az értekezésben szereplő kísérletes klinikai-epidemiológiai vizsgálatok közös vonása az, hogy a legfontosabb, a klinikai mikrobiológiai diagnosztikai laboratóriumokban leggyakrabban izolált humán patogén anaerob baktériumok 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 vizsgálatai; a *Bacteroides/Parabacteroides* csoportba tartozó törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálatai, 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 *cdt*A, *cdt*B, *tcd*A és *tcd*B 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 szövettenyészet citotoxicitási vizsgálatának és a kereskedelemben 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 összevetettük 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 az azonos időszakban gyűjtött, Magyarország különböző területeiről származó klinikailag releváns *Bacteroides/Parabacteroides* csoportba tartozó izolátumok 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 (*bex*A) jelenlétét.
- meghatározzuk a *B. fragilis* törzsek enterotoxin gén (*bft*) hordozásának arányát, jellemezzük ezek izotípusait, valamint a C10 és C11 cisztein proteáz géneket (*bfp*1-4, *fpn*), keressük a *cfi*A génnel való együttes előfordulásukat, adatainkat összehasonlítjuk az előzőleg publikált 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 species-, vagy genus-szinten a MALDI-TOF MS-módszerrel, a 16S rRNS gén szekvenálással meg lehet-e erősíteni a biokémiai módszerekkel 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 hozzunk létre a humán klinikai mintákból 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 *cfi*A gént azoktól a törzsektől amelyek nem (a Divízió I és II).
- értékeljük az MS-alapú tipizálási módszer eredményességét összehasonlítva az MLST módszerrel a humán kórfolyamatokból izolált és a kontamináns *Cutibacterium (C.) acnes* törzsek esetén.

4. Alkalmazott módszerek

4.1. Vizsgálatok *C. difficile* törzsekkel

A törzsek gyűjtése

A disszertációban feldolgozott időszakban (1998-2018) a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézetbe (SZTE ÁOK KMDI) beérkezett hasmenéses székletmintákból izolált, valamint a vizsgálatok ideje 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. Minden esetben a hasmenéses székletmintát a küldő laboratóriumok megvizsgálták más, gyakori enterális kórokozók: enteropatogén *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp, *Yersinia enterocolytica*, *Campylobacter* sp., adenovírus, rotavírus és Norwalk-like vírus jelenlétére, mindezek a szűrővizsgálatok negatívak voltak. Az epidemiológiai vizsgálatokat elsőként Magyarországon, már 1998-ban elkezdtük, akkor 3 hónap alatt konzekvensen gyűjtött hasmenéses székletmintákból és kisebb részben egyéb klinikai mintákból izolált törzsek ribotipizálása történt meg. A hasmenést okozó ribotípusok magyarországi elterjedésének-ribotípus váltásának epidemiológiai vizsgálatait saját munkacsoportunk 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 pán-európai vizsgálathoz.

A törzsek tenyésztése, tárolása

A laboratóriumunkba beérkezett 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% N_2, 10% CO_2, 5% H_2; 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. A kitenyésztett, identifikált törzseket -70°C on tároltuk Cryobank fagyasztócsövekben (Mast Diagnostics, Bootle, UK) a további vizsgálatokig. A vizsgálatok során a törzseket 1 mg K_1 vitaminnal kiegészített anaerob véres agarlemezeken tenyésztettük a fentebb leírt anaerob körülmények között 24 órán át. A VPI (Virginia Polytechnic Institute) 10463 referencia törzset ("0" toxin-típusú) az American Type Culture Collection (ATCC Rockville, Maryland, USA) cégtől szereztük be. A binary toxint termelő kontroll törzseket és a különböző ribotípusú kontroll törzseket (R5989: 023 ribotípus, R8637: 019, R10456: 058, 027 kontroll törzs) Dr. Jon Brazier (Anaerobe Reference Unit, Cardiff, UK) és Prof. Ed Kuijper (35 különböző, ismert ribotípusú kontroll törzs, Leiden University, Medical Microbiology, Nl) bocsátotta rendelkezésünkre nemzetközi tudományos együttműködési kooperációnk keretében. Az adott vizsgálat során a pontos törzsadatokat (szám, származási hely, betegstátusz, stb.) minden vizsgálat esetén az eredmények fejezetben részletezem.

Toxin kimutatási vizsgálatok
Citotoxicitási vizsgálatok HeLa szövettenyészeten

A hasmenéses mintákból izolált törzsek esetében a szövettenyészet citotoxicitás vizsgálatát HeLa sejtvonal alkalmazásával végeztük. A vizsgálathoz az izolált telepekből (3-5 telephez kaccsal hozzáérve) húsos bouillonban (chopped meat: CM bouillon, saját gyártmány) készült szubkultúrát (24 órán át inkubált) használtunk. A folyékony tenyészetekből 1 ml-t 15,300 *g* fordulatszámon 5 percig centrifugáltunk, a felülúszókat 0,22 µm-es pórusméretű membránon (MILLEX-GV, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) szűrtük. A HeLa-sejteket 37°C-on tenyésztettük egy steril 96 lyukú mikrotiter lemezen, Dulbecco módosított Eagle MEM médiumban (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), amelyet 10%-os, hővel inaktivált magzati borjú szérummal kiegészítettük. A citotoxicitási vizsgálat előtt, a sejttenyészetről a tápfolyadékot eltávolítottuk, és a sejtekre friss tápközeget vittünk szérum nélkül. 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% CO_2-on 24 órán át) a citotoxikus hatást vizsgáltuk. A *C. difficile* toxin-neutralizációs vizsgálathoz kecske antitoxin szérumot használtunk; ez az antitoxin szérum semlegesíti az A és B toxint. Toxin-pozitív kontrollként használtuk az American Type Culture Collection-ból (ATCC Rockville, Maryland, USA) származó VPI 10463 referencia törzset (ATCC 43255, 0 toxin-típus).

Toxin vizsgálatok kereskedelmi forgalomban elérhető diagnosztikus tesztekkel

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 GDH egyidejű kimutatására alkalmas immunkromatográfiás módszerrel végeztük el a gyártók előírásának megfelelően.

A főbb toxin gének, a binary toxin gén és a *tcd*C 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. A PCR-reakcióhoz szakirodalmi adatok alapján alkalmazott primerek szekvenciáját a **2. táblázat**ban mutatom be. 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; ezeket a primereket arra használtuk, hogy detektáljuk az A toxin gén 3' végét érintő deléciókat. A reakcióelegy (20 ul) tartalmazott 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 2,5 mM $MgCl_2$ 0,1 µg/ml zselatint, 0,2 mM dezoxinukleozid-trifoszfát, 0,3 U *Taq* DNS-polimeráz 10 µl Ready Mix-ben (Sigma Aldrich, St. Louis, Miss., USA) és 0,15 µM cdtApos, cdtArev, cdtBpos és cdtBrev (*cdtA* és *cdtB* PCR) vagy 45 ng NK2, NK3, NK9, NK11, NK104 és NK105 primereket. A reakcióelegyeket 30 (*cdt*A és *cdt*B PCR) vagy 35 (*tcd*A és *tcd*B PCR) ciklusban inkubáltuk PCR készülékben (GeneAmp, PCR System 9600; Perkin-Elmer, Norwalk, Conn., USA). A PCR reakciókörülmények a következők: denaturálás 94°C-on 45 másodperc (*cdt*A és *cdt*B) vagy

95°C-on 20 másodperc (*tcd*A és *tcd*B), 52°C-on 60 másodperc (*cdt*A és *cdt*B), vagy 62°C-on 120 másodperc (*tcd*A és *tcd*B), és 72 ° C-on 120 másodperc (*cdt*A és *cdt*B) (Kato H. *et al.* 1991; Kato H. *et al.* 1998; Stubbs SL. *et al.* 2000). A PCR-termékeket 0,8-1,5% agarózgélben (etídium-bromid 0,5 µg/ml, 5 V/cm, Tris-borát EDTA-puffer (45 mM Tris-borát, 1 mM EDTA)) vizualizáltuk. A géleket UV fényben Kodak digitális fényképezőgéppel fényképeztük, és a Kodak 1D 3.5 szoftverrel elemeztük. A *tcd*C gén szegmensét C1 és C2 primerek segítségével amplifikáltuk (Spigaglia P., Mastrantonio P. 2002).

2. táblázat: A vizsgálatban használt oligonukleotid primerek szekvenciái

Gén	Primer	Sorozat (5 ′ → 3 ′)	Pozíció	A termék mérete (bp)
cdt	cdtApos	TGA ACC TGG AAA AGG TGA TG	507-526	375
	cdtArev	AGG ATT ATT TAC TGG ACC ATT TG	882-860	
*cdt*B	cdtBpos	CTT AAT GCA AGT AAA TAC TGA G	368-389	510
	cdtBrev	AAC GGA TCT CTT GCT TCA GTC	878-858	
*tcd*A	NK2	CCC AAT AGA AGT TTC AAT ATT AAG CTT	2479-2505	251
	NK3	GGA AGA AAA GAA CTT CTG GCT CAC TCA	2254-2283	
*tcd*A rep	NK9	CCA CCA GCT GCA GCC ATA	8043-8060	1265
	NK11	TGA TGC TAA TAA TGA ATC TAA AAT GGT	6795-6824	
*tcd*B	NK104	GTG TAG CAA TGA AAG TCC AAG TTT ACG C	2945-2972	203
	NK105	CAC TTA GCT CTT TGA TTG CTG CAC CT	3123-3148	

Kato N. *et al.* 1991; Kato H. *et al.* 1998; Stubbs S. *et al.* 2000. rep: ismétlődő régió

BD GeneOhm Cdiff vizsgálat

A BD GeneOhm Cdiff (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) módszer gyors, gyári molekuláris diagnosztikai eljárás a *C. difficile* B toxin gén (*tcdB*) kvalitatív kimutatására hasmenéses székletmintákból olyan betegeknél, akiknél feltételezhető a toxintermelő *C. difficile* kóroki szerepe. 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, Cal., USA) automatikusan végzi.

A BD GeneOhm Cdiff vizsgálatot a gyártó utasításai szerint végeztük. Röviden: a hasmenéses székletmintát nagy sebességgel vortexeltük, és a steril tampon segítségével a gyártó által biztosított mintapufferbe helyeztük. A tampont tartalmazó szorosan lezárt csövet nagy sebességgel 1 percig vortexeltük. 40 µl mintát vittünk át a líziscsőbe, majd a líziscsövet nagy sebességgel 5 percig vortexeltük, majd körülbelül 5 másodpercig centrifugáltuk, hogy a tartalmat összegyűjtsük a cső alján. A líziscsövet 95°C-on 5 percig inkubáltuk, és azonnal jégre helyeztük. A Master Mix csőbe (gyártó által szállított) 225 µl hígítót adtunk, nyolc reakcióhoz elegendő reakciókeverék előállítására, beleértve egy negatív és egy pozitív kontrollt. A pozitív és negatív kontrollokat a mellékelt pufferben oldottuk. 25 µl Master Mix-et vittünk minden egyes SmartCycler csőbe, amelyet hűtőblokkba helyeztünk és 3 µl lizált mintát, pozitív és negatív kontrollokat adtunk a SmartCycler csövekhez. A csöveket 10 másodpercig centrifugáltuk, és a SmartCycler készülék I-Core-ba helyeztük.

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 telepek morfológiájának, UV-fényben történő fluoreszcenciájának és a tenyészetek tisztaságának ellenőrzése után 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 felülúszót DN-áz mentes csőbe vittük át, az izolált nukleinsavat az izolálást követően azonnal felhasználtuk vagy -20°C-on felhasználásig tároltuk.

PCR ribotipizálás

A PCR reakciókat 100 µl térfogatban állítottuk össze, amely mindegyik primerből 50 pmolt tartalmazott (16S rRNS gén primer p3 5'-CTG GGG TGA AGT CGT AAC AAG G-3', 1445–1466 pozíció és 23S rRNS gén primer p5 5'-GCG CCC TTT GTA GCT TGA CC-3', 1-20 pozíció), 200 uM dNTP (Amersham-Pharmacia-Biotech, Pl Little Chalfont Buckinghamshire, UK), 10 mM Tris/HCl (pH 8,8), 50 mM kálium-klorid, 1,5 mM $MgCI_2$, 1 U *Taq* polimeráz (Amersham-Pharmacia-Biotech, UK) és 10 µl templát DNS-t. A PCR-t egy Eppendorf thermal cycler készülékben végeztük, a kezdetei denaturálás egy 120 másodperces ciklusban 95°C-on, a denaturálás 30 cikluson keresztül 92°C-on 60 másodpercig történt, az annealing 55°C-on 60 másodpercig, az extenzió 72°C-on 90 másodpercig. Az utolsó denaturálási lépés után az annealing 55°C-on 45 másodpercig történt, majd a végső extenzió 5 percen keresztül 72°C-on folytatódott (Stubbs SL. *et al*. 1999).

A PCR termékek kimutatása

A PCR termékeket 25-30 µl végső térfogatra koncentráltuk 75°C-on kb. 1,5 órán át hőblokkban. A PCR-termékeket agaróz gélelektroforézissel szeparáltuk, 3%-os (w/v) Metaphor agaróz gélben (BMA-BioWhittaker Molecular Applications, Rockland Maine, USA) (3 óra, 200 V, 60 mA, TAE-puffer [40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA (pH 8,0)]). A DNS mintázat vizualizálására UV-fényt használtunk, miután a géleket 20 percig etídium-bromidban festettük (0,5 µg/ml). Minden esetben a géleken minden hatodik minta esetében molekulasúly markert (Superladder-Low; ABgene, Portsmouth, New Hampshire, USA) használtunk normalizáció céljából. 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). Röviden: a 16S és 23S rRNS-t 16S (5'-GTGCGGCTGGATCACCTCCT-3') és 23S (5'-CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC-3') célzó primereket (VBC-Biotech, Wienna, Au) használtunk Bidet P. *et al.* (1999) leírása alapján azzal a módosítással, hogy a 16S rRNS-primert az 5'-végén karboxi-fluoreszceinnel (FAM) jelöltük. A DNS izoláláshoz MagNA Pure Compact (Roche, Basel, Sw.) gyári kitet használtunk a gyártó utasításai szerint. Az amplifikációs reakciók tartalmaztak: 25 µl HotStar Taq Master Mix-et (Qiagen, Hilden, Gr), 1

µl-t (10 pmol/µl) minden primerből, 18 µl-t nukleázmentes vízből és 5 µl DNS-ből. A mintákat PCR termocyclerben amplifikáltuk a következők szerint: kezdeti denaturáció 15 perc 95°C; 35 ciklus 1 perc 95°C denaturáció, 1 perc 57°C annealing és 1 perc 72°C extenzió; 5 perc 72°C végső extenzió. A reakciótermékeket kapilláris gélelektroforézissel szeparáltuk 1,5% agaróz gélen (Bio-Rad, Hercules, Cal., USA) 4 órán át 100 V-on. Minden 10. sávban 100-1000 bp méretű létrát (Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA) használtunk. A PCR-fragmensek analízisét ABI 3130-as genetikai elemzővel végeztük 41 cm-es kapilláris POP7-géllel és a GeneScan 1200 LIZ standarddal (ThermoFisher, Waltham, Mass., USA). A minta-befecskendezés 5 kV-on 5 másodperc, a teljes futási idő 30 perc 15 kV feszültség mellett. Minden mintához belső markerként 50–625 bp méretű molekulasúly markert használtunk.

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). A kapilláris gélelektroforézissel generált ribotípus mintákat az „sr" előtaggal jelölték, megkülönböztetve a típust ezzel a hagyományos Metaphor gélelektroforézis szeparálás során kapott eredménytől. A reprodukálhatósági vizsgálatokhoz egy második polimerázt és puffert (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems, Foster City, Cal. USA) használtunk.

Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok során egyes antibiotikumok: erythromycin, clindamycin, metronidazol, moxifloxacin, vancomycin és rifampicin vizsgálata történt meg E-teszt-el (AB BIODISK, Solna, Sv) a gyártó előírásainak megfelelően. A MIC meghatározásokat 1 mg/l K_1 vitaminnal és 0,3 g/l ciszteinnel kiegészített Brucella véres agaron (Oxoid, Basingstoke, UK) végeztük el, amelyeket anaerob körülmények között: 85% N_2, 10% CO_2, 5% H_2, Concept 400, anaerob kamrában (Ruskinn Technology Limited, Bridgend, UK) 24-48 órán át 37°C-on inkubáltunk. 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 minőségellenőrzésre a *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 és *C. difficile* CD 630 kontroll törzset használtuk. A MIC_{50} és MIC_{90} értékeket Microsoft EXCEL segítségével számoltuk ki. A fidaxomicin MIC értéket agar-hígításos módszerrel határoztuk meg. A fidaxomicin port (Astellas Pharma Ltd. Tokio, Jp) 4ºC-on, fénytől védve tároltuk a felhasználásig. Az agar-hígításos módszert 5% defibirinált lizált birkavérrel, heminnel (1 mg/l) és K_1 vitaminnal (5 mg/l) kiegészített Brucella agaron végeztük el (Oxoid, Basingstoke, UK). A fidaxomicin port dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk és hígítottuk, majd az alap agarhoz adtuk, a hígítási sorozat: 0,008-2 mg/l között volt. A MIC értékek meghatározása a CLSI (M11-A7, 2006) alapján történt.

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. A jelen tanulmányban minden ország 3-103 egymást követő, nem duplikált *Bacteroides-Parabacteroides* nemzetségbe tartozó, 2008. január és 2009. március között izolált **824 releváns klinikai izolátumot** küldött laboratóriumunkba. A kísérleteket megelőzően a törzseket -70°C-on tároltuk Cryobank (Mast Diagnostics, Bootle, UK) fagyasztócsövekben. A SZTE ÁOK KMDI-ben a törzsek species-szintű identifikációja API20 ANA illetve ATB ID 32A (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Fr) automata biokémiai módszerrel és hagyományos identifikációs módszerekkel történt a Wadsworth Manual diagnosztikai algoritmusai alapján (Jousimies-Somer HR. *et al.,* 2002). Abban az esetben, ha a beküldő laboratórium és a vizsgáló laboratórium identifikálása nem egyezett (277 izolátum), MALDI-TOF MS módszert is használtunk 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 Laboratórimumi Részleg, Budapest; **2:** SYNLAB Ltd., Budapest; **3:** Debreceni Orvostudományi Egyetem Mikrobiológiai Laboratóriumi Részleg; **4:** Szegedi Tudományegyetem Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet. A törzsek tárolása, fenntartása, átoltása az előzőekben ismertetett módon történt. A törzsek species-szintű identifikálása először mindegyik laboratóriumban a saját MALDI-TOF MS készülékükkel (mindegyik laboratórium Bruker Daltonik, Bréma, Gr) történt meg a Biotyper Version 3.0 software-t használva, majd a SZTE KMDI-ben ismételten identifikáltuk a törzseket MALDI-TOF módszerrel, ATB ID 32A (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Fr) módszerrel, illetve amennyiben eltérő eredményt kaptunk, szekvenálással.

Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok

Az európai törzsek esetében kilenc antimikrobiális szer MIC-értékét a CLSI irányelvei alapján “gold standard”-ként javasolt agar hígítási módszerrel határoztuk meg (CLSI M11-A7, 2006). 10^5 CFU inokulumot tartalmazó “foltokat” helyeztünk egy módosított Steers replikátor segítségével az általunk frissen készített, a megfelelő antibiotikum kettes léptékű hígítási sorát tartalmazó 5% lizált birkavérrel kiegészített Brucella agar alapú (Oxoid, Basingstoke, UK), anaerob véres agar felszínére. A lemezeket 48 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk anaerob kamrában, anaerob körülmények között (Bactron; Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, Or., USA). A MIC-eket úgy határoztuk meg, mint az antimikrobiális szer azon legalacsonyabb koncentrációját, ami a kontroll lemezhez képest teljesen gátolja a vizsgált törzs szaporodását. 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.

Minden vizsgálatot három párhuzamos méréssel végeztünk el. Az eredmények értékelése során ahol rendelkezésre állt, a vizsgálat elvégzésekor aktuális EUCAST határértékeket, ahol európai határértékek nem voltak meghatározva, a CLSI által javasolt határértékeket használtuk. Az ampicillin, piperacillin/tazobaktám és metronidazol esetében ezek a határértékek különböztek; amoxicillin/klavulánsav, imipenem és clindamycin esetében a rezisztencia határértékek azonosak voltak a két rendszerben; a cefoxitin, a moxifloxacin és a tigecyclin esetében nem állt rendelkezésre EUCAST határérték (**3. táblázat**). Az érzékenységi vizsgálatok során minden esetben a *B. fragilis* ATCC 25285, *B. fragilis* DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Gr) 2151 és *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 kontroll törzsek vizsgálatát is elvégeztük párhuzamosan a klinikai törzsekkel.

A magyarországi törzsek esetében a MIC értékeket tíz antibiotikummal szemben vizsgáltuk meg, mind a vizsgálati módszerek, mind a vizsgálati körülmények, mind a kivitelezés megegyezett a fentebb ismertetett agar dilúciós módszerrel. A vizsgált antibiotikumok: ampicillin, cefoxitin, tetracyclin, tigecyclin, chloramphenicol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Selzee, Gr), amoxicillin/klavulánsav (GlaxoSmithKline, Budapest, Mo), meropenem, moxifloxacin (Fresenius Kabi, Bad Homburg von der Höhe, Gr), clindamycin (Pfizer, Budapest, Mo), metronidazol (TEVA, Debrecen, Mo). Az alkalmazott határértékek az aktuális EUCAST határértékek voltak a cefoxitin, moxifloxacin és tigecyclin esetében, mivel nem voltak EUCAST határértékek, a CLSI határértékeit alkalmaztuk (**3. táblázat**).

Statisztikai kiértékelés

Az adatok statisztikai kiértékelése Fischer's Exact és Spearman korrelációs tesztekkel történt a SigmaPlot 12 programban, annak érdekében, hogy a statisztikailag releváns különbségeket megtaláljuk, a szignifikancia szintet 0,05 (i.e. $p<0,05$)-ben határoztuk meg. Az antibiotikum rezisztencia adatait a chi-négyzet teszt (χ^2-test) segítségével elemeztük, a SigmaPlot 12 programban.

3. táblázat: A vizsgálataink során alkalmazott antibiotikum érzékenységi-rezisztencia határértékek az aktuális EUCAST/CLSI szerint (mg/l)

Antibiotikum	EUCAST		CLSI M11-A7	
	Érzékeny	Rezisztens	Érzékeny	Rezisztens
Ampicillin	≤0,5	>2	<0,5	≥2
Amoxi/klavulánsav	≤4	>8	<4	≥16
Piperacillin/tazobaktám	≤8	>16	<32	≥128
Cefoxitin	IE*		<16	≥64
Imipenem	≤2	>8 (>4**)	<4	≥16
Meropenem	≤2	>8	<4	≥16
Clindamycin	≤4	>4	<2	≥8
Metronidazol	≤4	>4	<8	≥32
Moxifloxacin	IE*		<2	≥8
Tigecyclin	-	-	<4	≥16
Tetracyclin	-	-	<4	≥16
Chloramphenicol	≤8	>8	<8	≥32

IE*: Insufficient Evidence, nincs elegendő bizonyíték a szer hatásosságára; **Határérték változás a vizsgálatok időszakában.

A rezisztencia gének meghatározása PCR módszerekkel

A kísérleteket megelőzően a törzseket -70°C-on tároltuk Cryobank (Mast Diagnostics, Bootle, UK) fagyasztócsövekben. Minden egyes törzsből egy telepet használtunk fel (0,5 McFarland sűrűség) a molekuláris biológiai vizsgálatokhoz, amelyet 100 µl steril desztillált vízben szuszpendáltunk. A DNS templátokat "colony boiling lysis" módszerrel állítottuk elő: a szuszpenziót 100°C-on inkubáltuk 10 percig, majd 2 percig 14,000 rpm-en centrifugáltuk. A felhasznált primerek és a polimeráz láncreakció beállított körülményei a **4. táblázatban** láthatóak. A primereket a Primer3 szoftverrel terveztük (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/).

A hazai MDR törzsek molekuláris vizsgálatait a következő, leggyakrabban előforduló antibiotikum rezisztencia gének kimutatására végeztük el: *cep*A, *cfx*A, *cfi*A, *nim*, *erm*B, *erm*F, *erm*G, *tet*Q, *tet*X, *tet*X1, *bex*A, az IS*4351* jelenléte a *cfi*A és *cfx*A gének upstream régióiban. Az MDR törzsek között a *gyr*A, *gyr*B, *par*C és *par*E gének esetében vizsgáltuk az aminosav szubsztitúciókat is. Valós idejű (Real-Time: RT-PCR) PCR módszert végeztünk a *cep*A, *cfx*A, *cfi*A, *erm*F, *erm*B, *erm*G, *tet*Q, *tet*X, *tet*X1, *bex*A, *gyr*A gének és az IS*4351* elem kimutatására, végpont (End-Point) PCR módszert használtunk a *cfi*A, *cfx*A gének upstream régióinak és az IS*4351* 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. Mindegyik reakció keverék tartalmazott 5 µl 2x PCR mastermix-et (iQ, Bio-Rad, Hercules, Cal., USA, vagy

Brilliant II, Stratagene), 0,7 µl-t (35 pmol) mindegyik primerből, 1 µl templát DNS-t, 0,5 µl EvaGreen (Biotium) DNS-kötő fluorescens festéket (iQ "mastermix"), steril desztillált vizet legfeljebb 10 µl végtérfogatban a műanyag PCR lemezekben. Az amplifikációt és a melting görbét a SYBR Green és az EVA Green festékekhez szükséges 415 nm hullámhosszon figyeltük meg. Az amplifikációs ciklusok kezdeti denaturációja 10 min (iQ) vagy 5 min (Brilliant II) volt.

4. táblázat: A rezisztencia gének meghatározása során a PCR-hez alkalmazott primerek és paraméterek

Gén	**Primerek (5' → 3')**	**PCR ciklusok**
***cfi*A**	AATCGAAGGATGGGGTATGG	95°C 15s, 59°C 30s, 72°C 30s, 35x
	CGGTCAGTGAATCGGTGAAT	
***cfx*A**	TGACTGGCCCTGAATAATCT	95°C 15s, 55°C 30s, 72°C 30s, 35x
	ACAAAAGATAGCGCAAATCC	
***cep*A**	TTTCTGCTATGTCCTGCCT	95°C 15s, 56°C 30s, 72°C 1 min, 35x
	ATCTTTCACGAAGACGGC	
nim	ATGTTCAGAGAAATGCGGCGTAAGTG	94°C 15s, 62°C 30s, 72°C 30s, 35x
	GCTTCCTCGCCTGTCACGTGCTC	
***erm*F**	TAGATATTGGGGCAGGCAAG	95°C 15s, 58°C 1 min, 72°C 30s, 35x
	GGAAATTGCGGAACTGCAAA	
***erm*B**	GCGGAATGCTTTCATCCTAA	95°C 15s, 59°C 30s, 72°C 30s, 35x
	GCGTGTTTCATTGCTTGATG	
***erm*G**	ATAGGTGCAGGGAAAGGTCA	95°C 15s, 59°C 30 s, 72°C 30s, 35x
	TGGATTGTGGCTAGGAAATGT	
***tet*Q**	ATCGGTATCAATGAGTTGTT	95°C 15s, 50°C 1 min, 72°C 30s, 35x
	GACTGATTCTGGAGGAAGTA	
***tet*X**	TTAGCCTTACCAATGGGTGT	95°C 15s, 55°C 30 s, 72°C 30s, 35x
	CAAATCTGCTGTTTCATTCG	
***tet*X1**	TCAGGACAAGAAGCAATGAA	95°C 15s, 50°C 1 min, 72°C 30s, 32x
	TATTTCGGGGTTGTCAAACT	
***bex*A**	TAGTGGTTGCTGCGATTCTG	95°C 15s, 60°C 30 s, 72°C 30s, 35x
	TCAGCGTCTTGGTCTGTGTC	
***IS*4351**	CAGGGTCTGGATACGCAAGT	95°C 15s, 59°C 30s, 72°C 30s, 35x
	CTGATAAGCCCGTTGGTGTT	
***gyr*A**	CTACGGAATGATGGAACTGG	95°C 15s, 53°C 30s, 72°C 30s, 35x
	TGTTCAGACGTGCTTCAGTG	

s: másodperc, min: perc; x: ciklusok száma

A molekuláris vizsgálatok során minden alkalommal használtunk negatív és pozitív **kontroll törzseket**, melyek a következők:

B. fragilis TAL3636 (*cfi*A); *B. fragilis* 638R (pIP417) (*nim*A); *B. fragilis* BF-8 (*nim*B, *erm*F) *B. fragilis* 638R (pIP419) (*nim*C); *B. thetaiotaomicron* BT13 (*nim*C); *B. fragilis* 638R (pIP421) *B. fragilis* 388 (*nim*E); *B. fragilis* 638R (*cep*A); *B. vulgatus* CLA341 (*cfx*A, *tet*Q); *B. thetaiotaomicron* 4001 [pGERM] (*erm*G); *B. fragilis* BM13 (*tet*X1); *B. fragilis* pBRT21 (*bexA*); *C. difficile* 630 (*erm*B).

Statisztikai kiértékelés

A statisztikai elemzéseket (Pearson-féle rangkorrelációs számítások) az SPSS szoftvercsomaggal végeztük (Chicago, IL, USA). Az eredményeket $p<0,05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

A *gyr*A 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., Tw) 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.* 2000). Az RFLP során kontroll törzseket használtunk: *B. fragilis* R19811 (*bft-1*), *B. fragilis* ATCC 43858 *(bft-2), B. fragilis* GAI 96462 (*bft-3*). A restrikciós fragmensek várt méretei: 839 és 310 bp a *bft-1*, 575, 453 és 111 bp a *bft-2* és 839, 189 és111 bp a *bft-3* esetén (Thornton RF. *et al.* 2010).

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, Cal., USA) használtuk a *bft*-1 és *bft*-2 hordozó izolátumok esetén, hogy igazoljuk az RT-PCR melting-point analizis 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, kontroll törzsként a *B. fragilis* 638R (*bfp1-4)* és a *B. fragilis* ATCC 43859 (*fpn*) törzseket használva. Az RT-PCR módszereket StepOne RT-PCR készüléken (Applied Biosystems, Foster City, Cal., USA) végeztük, az alkalmazott primereket és a PCR körülményei a **5. táblázatban** láthatóak.

Statisztikai kiértékelés

Az adatokat a Fischer's Exact teszt segítségével elemeztük a SigmaPlot 12 programot használva, a szignifikancia szint 0,05 volt.

5. táblázat: A *bft, bfp1-4* és *fpn* gének kimutatásához használt primerek és PCR paraméterek

Gének	Primer	Primer szekvenciák (5' → 3')	PCR körülmények
bft	bftF	CGAACTCGGTTTATGCAGTT	95°C 5 min; 95°C 15s 35x; 56°C 1 min; 72°C 30 s; melting 72-95 C°
(RT-PCR)	bftR	GGATACATCAGCTGGGTTGT	
bft	BTT1	CATGTTCTAATGAAGCTGATTC	95°C 5 min; 95°C 15s 35x; 56°C 1 min; 72°C 30 s; melting 72-95 C°
(RFLP)	BTT2	ATCGCCATCTGCTGTTTCCC	
fpn	C11_proteáz_F	ATTCGGCCGATGCAAATGTG	94°C 5 min; 94°C 1 min 30x; 54°C 1 min; 72°C 1min
	C11_proteáz_R	CGGAATCTCGGTAGGGAAC	
bfp1	C10_proteáz_F1	GCGGTGAACAAAGAACGACA	95°C 10 min; 95°C 15s 35x; 59 °C 30s; 72 °C 75s; melting 72-95 C°
	C10_proteáz_R1	CGCCTGAGCAACTGCAATA	
bfp2	C10_proteáz_F2	CGTACCAATTGCAATTGCGC	
	C10_proteáz_R2	AGCTCCCGTGGCTTTATCTT	
bfp3	C10_proteáz_F3	TTTGGAGTAGCAGCAGCAGA	
	C10_proteáz_R3	TTTCTGGTTTCGGGTGTTTC	
bfp4	C10_proteáz_F4	TACAACGGTGTTGGTGCAAG	
	C10_proteáz_R4	ACACAAATGCGCCACTTCAT	

s: másodperc, min: perc; x: ciklusok száma

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 5 mg/l K_1 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 *et al.,* 2002) és a Rapid ID 32A (ATB) módszer (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, Fr). A törzsek tárolására Cryobank fiolákat használtunk (Mast Diagnostics, Bootle, UK). A biokémiai tesztekben *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 és *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29742 kontroll törzseket használtunk.

Mintaelőkészítés és MALDI-TOF MS mérés kivitelezése

Minden baktérium törzs egy önálló, izolált telepéből 24 órán keresztül szubkultúrát készítettünk, majd a friss tenyészetből kaccsal 2-3 telephez hozzáérve 10 µl-es kacsnyi mennyiséget Eppendorf fiolába helyeztük át és 300 µl bidesztillált vízzel szuszpendáltuk. Etanolt (900 µl) adtunk a szuszpenzióhoz és jól elegyítettük. A mintákat centrifugáltuk (13 000g, 2 perc), a felülúszót eltávolítottuk és a pelleteket szobahőmérsékleten teljesen megszárítottuk. A baktérium tartalmú pelletet 20–50 µl 70%-os vizes hangyasavban és ugyanannyi mennyiségű acetonitrilben reszuszpendáltuk, a pellet méretétől függően. A centrifugálás után 1 µl felülúszót helyeztünk a MALDI TOF 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 MALDI-TOF tömegspektrométerbe helyeztük automatikus mérésre és adatértékelésre. Minden mintát duplikátumban, 3-szor mértünk le a Microflex LT MALDI-TOF tömegspektrométert alkalmazva (Bruker Daltonik, Bréma, Gr). Minden mérést a Microflex LT MALDI-TOF tömegspektrométeren végeztünk el lineáris pozitív ion módban, 60 Hz-es lézerfrekvenciával. A tömegtartomány 2000–20000 Da volt. Minden egyes minta esetén 240 single spektrum összesített spektrumát kaptuk meg, egy adott helyen 6 különböző pozícióból 40 single spektrumos egységekben. Minden egyes minta esetén legalább 20 különböző összesített spektrumot gyűjtöttünk. A paraméter beállítások a Microflex LT-re a következők voltak: IS1 20 kV, IS2 18,5 kV, lencsék 8,5 kV, PIE 250 ns, nincs szűrés.

Klinikai izolátumok species-szintű meghatározása

A MALDI-TOF profil tömegspektrumokat a MALDI Biotyper 3.0 szoftverbe importáltuk és automatikusan feldolgoztuk a mérés után. A szoftver csúcslistákat generált és összehasonlította azokat minden egyes MALDI Biotyper adatbázis bejegyzéssel, amely azidőben 3 995 referencia főspektrumot (main spectrum profiles: MSP) tartalmazott, amelyek egy egyedi törzs többszöri méréséből lettek elkészítve és az adatbázishoz hozzáadva. A mintaegyezés algoritmus standard paramétereit használtuk. A MALDI Biotyper mintaegyezésre egy ismeretlen mikroorganizmusból származó újonnan szerzett spektrumot illesztettünk a MALDI Biotyper adatbázis minden egyes adatbázis bejegyzésével (MSP-k) szemben. Az MSP-k az adatbázisban a megfelelő fajokat képviselő kiválasztott törzsekből származtak és információt tartalmaztak a tömegpozícióról, az intenzitásról és a legszignifikánsabb csúcsok relatív előfordulásáról. A mintaegyezésben kiszámoltuk az ismeretlen törzsből származó egyező csúcsok kombinált score-ját az MSP-vel szemben, a csúcsok egyezését az MSP-től az ismeretlen csúcsok listájáig és az intenzitások korrelációját az új spektrumban és az MSP-ben. Ennek a score-nak a logaritmusát [log(score)] jelenítjük meg egyező eredményként. A MALDI Biotyper teljesítmény egy 0 és 3,0 közötti log(score), amit az adatbázisban a referencia MSP-vel egy ismeretlen izolátum csúcslista összehasonlításából számolunk. A log(score)≥1,7 a genus szinten közeli kapcsolatot jelöl, míg log(score)≥2,0 a fajok szintjén jelzett megfelelően pontos identifikálást. Azok az izolátumok, ahol a log(score)≥2,0 helyes identifikációként lettek elfogadva; azonban ha a fenotípusos identifikáció eltérő volt, szekvenálást végeztünk az adott törzsből. Minden 1,7 és 2,0 log(score)-ú izolátumot szekvenáltunk, hogy megerősítsük a faji identifikációt, kivéve azokat, ahol a fenotípusos módszer ugyanazt a faj-szintű identifikációt adta.

16S rRNS gén szekvenálás az ellentmondásos izolátumok esetén

A szekvenálás minden esetben ugyanabból az eredeti etanol extraktumból (600 µl) történt. A 16S rRNS gén fragmentum amplifikációjához egyedi univerzális primereket használtunk: 16S_F (5'-aaactcctacgggaggcagcag-3'), and 16S_R (5'-tctcacgacacgagctgacgac-3'). A primerek tervezéséhez az Oligo_6.37 szoftvert használtuk (Molecular Biology Insights). A PCR-t a következőket tartalmazó reakciós elegyben végeztük: egy 66 mM Tris/HCl (pH 9,0), 16,6 mM $(NH_4)2SO_4$, 2,5 mM $MgCl_2$, 250 mM minden egyes dNTP-ből, 1 U Taq DNS polimeráz (Promega, Madison, Wisc., USA) és 10 pmol minden egyes primerből 10 ml végső

mennyiségben DNA Engine Tetrad 2 thermocycler-t használva (MJ Research, St. Bruno, Kan). Az amplifikációs termékeket 2%-os agaróz gélben analizáltuk. Utána 10 ml, a következőeket tartalmazó reakcióelegyet adtunk minden egyes PCR termékhez: 66 mM Tris/HCl (pH 9,0), 16,6 mM $(NH_4)2SO_4$, 2,5 mM $MgCl_2$, 0,5 U garnéla alkalikus foszfatáz (SAP; Promega, Madison, Wisc., USA) és 5 U exonukleáz I (Fermentas, Waltham, Mass., USA) majd 37°C-on 30 percig inkubáltuk az 5'-vég deoxinukleozid-trifoszfát foszfát csoportjának defoszforilációja és a primer elimináció miatt. Végül az enzimeket deaktiváltuk 85°C-on, 10 percig való hevítéssel.

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, 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 cfi*A 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 (3.1.1.0. verzió, 3740 bejegyzés; Bruker Daltonik, Bréma, Gr) azonosítottuk. Az identifikációt a gyártó által javasolt standard mintázati illesztéssel végeztük el ≥2,0 log(score)-t alkalmazva a fajok azonosítására. Ezután a *cfi*A-pozitív és *cfi*A-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. Minden esetben meghatároztuk a törzsek karbapenem MIC értékét E-teszt módszerrel, illetve minden esetben a törzs *cfi*A-pozitivitását ellenőriztük a fentebb ismertetett PCR módszerrel.

Cutibacterium acnes törzsek tipizálása

A vizsgálatba bevont baktériumtörzsek *C. acnes*-nek (kivéve más néhány *Cutibacterium-Propionibacterium* izolátumot, amiket kizártunk a további vizsgálatból) bizonyultak a MALDI Biotyper 3.0 szoftver és adatbázis használatával (3.2.1.1. verzió, 4110 bejegyzés; Bruker Daltonik, Bréma, Gr). Az identifikációt a gyártó által javasolt standard mintázati illesztéssel végeztük, ≥2,0 log(score)-t alkalmazva a fajok azonosítására, míg >1,7 log(score) közeli kapcsolatot jelentett genus szinten. A Bruker adatbázis a vizsgálatok idején 13 akkor még *Propionibacterium* spp. (ma *Cutibacterium* spp.) fő spektrumait tartalmazta. A *C. acnes* törzsek egy része esetében összehasonlítottuk az anaerob környezetben 24- és a 48 óra inkubációs idő után kapott log(score) értékeket. 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. A spektrumokat simítottuk és a szoftver adott funkcióit felhasználva újrakalibráltuk. Ezt követően a csoportra jellemző csúcsokat kerestünk a spektrumok gondos vizuális átnézésével. Továbbá a három csoport közötti csúcseltéréseket a FlexAnalysis 3.3 szoftver (Bruker Daltonik, Bréma, Gr) alkalmazásával kerestük.

Multi Locus Szekvencia Tipizálás (MLST) analízis

A genomikai DNS-t a következőképp készítettük elő: 5 mg lizozimet (Sigma, St. Louis, Miss., USA) adtunk az adott baktériumtörzset tartalmazó 2 ml BHI leveshez és 37°C-on inkubáltuk 30 percig. A szuszpenziót centrifugáltuk (13 000 *g*, 10 perc, szobahőmérsékleten), a pelletet reszuszpendáltuk 200 µl AquaGenomic Kit-tel (Aquaplasmid™, MultiTarget Pharmaceuticals, LLC., Colorado Springs, Co., USA) és 90°C-on 30 percig inkubáltuk. A szuszpenziót centrifugáltuk, a felülúszóhoz egyenlő mennyiségű izopropanolt adtunk. A vortexelés és centrifugálás után a pelletet 70% (v/v) etanollal mostuk, 40°C-on 15 percig szárítottuk, 30 µl PCR-tisztaságú vízben reszuszpendáltuk és egy éjszakán át hagytuk rehidrálni 4°C-on. A DNS koncentráció meghatározása Qubit 4 Fluorométerrel (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Mass., USA) történt. A háztartási gén-lókuszok részleges szekvenciái: *aro*E (424 bp), *atp*D (453 bp), *gm*k (400 bp), *gua*A (493 bp), *lep*A (452 bp), *sod*A (450 bp) és a feltételezett virulencia determinánsok: *tly* (777 bp) és *camp*2 (804 bp) primer párok alkalmazásával amplifikáltuk a korábban leírt amplifikációs körülményekkel (McDowel *et al*., 2012/a). A PCR termékeket PCR fragment extrakciós kittel tisztítottuk (Geneaid, New Taipei City, Taiwan) majd a 3500 Series Genetic Analyser (Life Technologies, Carlsbad, Cal., 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

5.1. Vizsgálatok *C. difficile* törzsekkel

A fő toxinok-termeléséért felelős gének és binary toxin-termeléséért felelős gén jelenlétének vizsgálata: 2002.

Magyarországon a **binary toxin-termelő** *C. difficile* törzsek jelenlétét eddig a tanulmányig még nem vizsgálták, jelen tanulmányban irodalmi adatok alapján összeállított, saját „home-made" PCR módszerekkel az A és B toxin termeléséért felelős géneket (*tcd*A és *tcd*B), valamint a binary toxin termeléséért felelős géneket (*cdt*A és *cdt*B) detektáltuk, PCR módszert használtuk a *tcd*A-gén 3'-végén lévő deléció meghatározására. A molekuláris vizsgálatok eredményeit összehasonlítottuk a „gold standard"-ként használt HeLa sejtvonalra gyakorolt citopátiás hatás eredményeivel.

Tanulmányoztuk a különböző magyarországi régiókból származó *C. difficile* izolátumok toxintermelését, ezért járó- és fekvőbetegek hasmenéses székletmintájából random gyűjtött törzseket vizsgáltunk, melyeket magyarországi laboratóriumokban izoláltak és azonosították (a budapesti régióban, Észak-Dunántúlon, Szolnokon [Közép-Magyarország] és Szegeden [Dél-Magyarország]) 2002-ben.

Összesen **száztizenkét** *C. difficile* izolátumot vizsgáltunk: negyvenegy törzset izoláltunk a fekvőbetegekből, 38 izolátumot járóbetegekből, 33 esetben nem ismertük ezeket az adatokat. A vizsgált száztizenkét *C. difficile* törzsből az A toxin és a B toxin gének együttes jelenlétét 79 törzsben igazoltuk, továbbá citotoxikus morfológiai változásokat mutattunk ki a HeLa sejtvonalon. PCR módszerrel harminchárom izolátum volt negatív mind az A toxin, mind a B toxin gének esetében; a 33 izolátum közül egyik sem okozott morfológiai károsodást, citotoxikus effektust a HeLa sejteken. Nyolc törzs citotoxicitási titere 10^{-1}, a 36 törzs citotoxicitási titere 10^{-2}, a 25 törzs citotoxicitási titere 10^{-3}, és 10 törzs citotoxicitási titere $\geq 10^{-3}$ volt. 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 (*cdt*A) és 510 bp (*cdt*B) DNS-fragmenseket detektáltuk a binary toxin-specifikus primer párokkal. Deléció a *tcd*A-gén 3'-végén az NK9 és NK11 primer párokkal PCR-el vizsgálva nem volt kimutatható, a sejtvonalon kifejezett (citotoxicitási titer $\geq 10^{-3}$) citotoxikus hatást figyeltünk meg, a *tcd*A és a *tcd*B gének jelenléte PCR-el igazolható volt mindkét törzs esetében. A PCR ribotipizálási vizsgálataink eredményei azt mutatták, hogy a törzsek a 023 és 075 ribotípusokhoz tartoztak, elvégeztük a két törzs PaLoc régiójának részletes szekvenálási elemzéseit, melyek azt mutatták, hogy a törzsek a III-as és IV-es toxin-típusokba tartoztak. Ebben az időszakban a molekuláris diagnosztikai módszerekkel végzett vizsgálatban 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.

A *C. difficile* binary toxin szerkezete jól ismert volt már a vizsgálati időszakban, de kevés adat állt még rendelkezésre a toxin szerepéről az emberi gasztrointesztinális megbetegedések patogenezisében; így adatokat gyűjtöttünk azokról a betegekről, akiknél a binary toxin-termelő törzseket találtuk. Az **első binary toxin-termelő törzset** egy 8 éves fiú hasmenéses székletéből izoláltuk: follikuláris mandula gyulladása volt, ezért *per os* amoxicillin-

klavulánsavat kapott otthonában. A kezelés alatt súlyos hasmenés alakult ki. A családorvos ezután az antibiotikum terápiát amoxicillinre változtatta, de a súlyos hasmenés nem mérséklődött. A beteg a budapesti Heim Pál Gyermekkórház gasztroenterológiai osztályára került. A kórházi ápolás első napján a laboratóriumba küldött hasmenéses székletből *C. difficile* tenyészett, melyet a RapID 32A teszttel (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Fr) identifikáltak, az A toxint C.difA teszt (Oxoid, Basingstoke, UK) segítségével detektálták. A beteg ezután *per os* metronidazolt kapott, az alternatív kezelés orális *Lactobacillus* terápia volt. A kezelés után nem figyeltek meg relapszusokat. A beteg jelen kórházi felvétele előtt nem volt kórházi kezelése, nem tartózkodott egészségügyi intézményben.

A **másik binary toxin-termelő törzs** egy 42 éves nőbeteg székletéből származó izolátum volt, aki hasonlóképpen profúz hasmenésben szenvedett; a feltételezett diagnózis fertőző enteritisz volt. A hasmenés megjelenése előtt *per os* szulfametoxazol-trimetoprimot kapott felső légúti fertőzés terápiájaként. A székletből *C. difficile*-t tenyésztettek, de ekkor nem történt toxinvizsgálat a helyi laboratóriumban. Ezt az izolátumot a referencia laboratóriumunkba küldték a toxinok jelenlétének kimutatására, ahol a *tcd*A, *tcd*B, *cdt*A és *cdt*B jelenlétét PCR-rel detektáltuk és vizsgáltuk a citotoxikus hatást is a HeLa sejtvonalon. Az antibiotikum kezelés befejezése után a beteg állapota a *C. difficile* ellenes specifikus terápia nélkül javult, és nem észlelték a relapszust. Ebben az esetben a beteg kórelőzményében szintén nem szerepelt kórházi kezelés.

A fő toxinok-termeléséért felelős gének és binary toxin-termeléséért felelős gén jelenlétének vizsgálata: 2011-2012.

Az előző vizsgálatainkat mintegy 10 év múlva nagyszámú mintán ugyanezekkel a módszerekkel folytattuk: a SzTE KMDI-ben működő Humán Patogén Anaerob Baktériumok Nemzeti Referencia Laboratóriuma 2010. május és 2011. december (20 hónapos időtartam) között számos hazai laboratóriumból kapott egyéb enterális patogén kórokozóra negatív hasmenéses székletmintákat/vagy izolált *C. difficile* törzseket a toxintermelés megerősítésére, illetve ribotípus-meghatározásra. Ebben az időszakban összesen 1 726 izolátumot és/vagy hasmenéses székletmintát küldtek ribotípus/toxintermelés kimutatás vizsgálatára a laboratóriumok. A beküldött minták 20,7%-a nem bizonyult megfelelőnek a vizsgálatra (nem *C. difficile*-nek bizonyult a törzs, a székletminta állaga nem volt megfelelő, nem tenyészett ki a mintából *C. difficile,* stb…). Vizsgáltuk a *cdt*A, *cdt*B, *tcd*A és *tcd*B gének jelenlétét és az A toxin gén 3' régiót érintő deléciót a fentebb ismertetett módszerekkel.

Az összesen vizsgált **1 371 törzs** 5%-a (69 törzs) volt a PCR módszerrel A/B toxin-negatív. Az összes 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 deléció volt kimutatható az A toxint kódoló gén 3' régiójában, mindkét toxin A^-/B^+ törzs a VIII-as toxin-típushoz és a 017-es PCR ribotípushoz tartozott és nem hordozta a binary toxin termeléséért felelős *cdt*B gént. Ebben az időszakban már összes beküldött 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 ribotípusúnak bizonyult, a maradék 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 hasmenéses székletmintákból

Jelen vizsgálatban a célunk az volt, hogy nagyszámú hasmenéses székletmintán összehasonlítsuk a BD GeneOhm Cdiff vizsgálat eredményeit a toxin-termelő *C. difficile* törzsek kimutatására a gold standard-ként használatos citotoxicitási vizsgálat eredményeivel és a kereskedelemi forgalomban elérhető a *C. difficile* A/B toxinok közvetlen kimutatására alkalmas ELFA alapú módszerrel (Vidas *C. difficile* toxin A/B; bioMérieux, Marcy-lEtoile, Fr) kapott eredményekkel.

Összesen **600 hasmenéses székletmintát** gyűjtöttünk a SZTE klinikáin kezelt fekvőbetegektől és a járóbetegektől 3 hónapos mintagyűjtési időszakot alkalmazva 2008-ban. Kezdetben négy minta inhibitoros volta miatt gátolta a PCR-t, ám a fagyasztott lizátumok mintáinak ismételt tesztelésekor 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 BD GeneOhm Cdiff assay-el és a szövetkultúra citotoxicitási vizsgálattal (4. táblázat). A két módszerrel kapott ellentmondásos eredmények esetében a székletből célzottan *C. difficile* tenyésztést végeztünk és a kitenyésztett törzs toxin státuszát ismételten megvizsgáltuk. Tizenhét minta volt pozitív a BD GeneOhm Cdiff vizsgálattal, de negatív a citotoxicitási vizsgálattal közvetlenül a székletből történő vizsgálatnál, azonban a mintákból kitenyésztett törzsek minden esetben toxin-termelőnek bizonyultak a további vizsgálat során. Öt esetben a BD GeneOhm Cdiff 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 BD GeneOhm Cdiff assay-vel; 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 (**5. táblázat**).

A 600 mintából 39 a Vidas *C. difficile* A/B vizsgálattal „equivocal" (kétes, határérték) eredményeket adott; ezekben az esetekben a citotoxicitási vizsgálattal és a tenyészet toxinstátuszának ismételt ellenőrzésével erősítettük meg az eredményeket (**6. táblázat**). A 39 széklet mintából 30 negatívnak bizonyult a BD GeneOhm Cdiff assay-al, a citotoxicitási vizsgálattal 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 vizsgálattal.

5. táblázat: A BD GeneOhm Cdiff vizsgálat eredményeinek összehasonlítása a citotoxicitási vizsgálat eredményeivel

PCR eredmény	A citotoxicitási vizsgálat eredményei					
	Közvetlenül a székletből			Az izolált törzs toxinvizsgálata		
	Pozitív	Negatív	Összesen	Pozitív	Negatív	Összesen
Pozitív	36	22	58	53	5	58
Negatív	2	536	538	2	540	542
Összesen	38	558	596*	55	545	600

*4 minta inhibitoros volt a PCR vizsgálat során

6. táblázat: A BD GeneOhm Cdiff módszer eredményeinek összehasonlítása a Vidas *C. difficile* toxin A/B vizsgálattal a közvetlenül a székletből történő toxin-kimutatás és az izolált törzs megismételt toxin-vizsgálata után

PCR eredmény	A VIDAS toxin A/B toxin-vizsgálat eredményeinek száma					
	Közvetlenül a székletből			Az izolált törzs toxinvizsgálata		
	Pozitív	Kétes	Negatív	Pozitív	Negatív	Összesen
Pozitív	20	9	29	29	29	58
Negatív	8	30	500	8	534	542
Összesen*	28	39	529	37	563	600

*4 minta inhibitoros volt a PCR vizsgálat során

Toxint nem termelő *C. difficile* törzset 19 mintából izoláltunk; ezek a minták negatívak voltak mind a BD GeneOhm Cdiff assay és Vidas *C. difficile* toxin A/B vizsgálattal. A toxin-pozitív minták többségét az intenzív osztályokon fekvő betegekből gyűjtöttük (34,6%), a Bőrgyógyászati Klinikáról nyolc mintából kettő és a Sebészeti Osztály négy mintájának egyike bizonyult pozitívnak, ezek voltak ebben az időszakban azok a részlegek, amelyekben az orvosok a rutin enterális laboratóriumi diagnosztikai vizsgálatok részeként általában nem igényelték *C. difficile* vizsgálatokat a hasmenéses székletekből.

A BD GeneOhm Cdiff teszt kiváló klinikai hasznosíthatóságát **két olyan beteg esetében** mutattuk ki, ahol a PCR jóval korábban adott megbízható pozitív eredményeket, mint a Vidas *C. difficile* ELFA módszer: az **első eset** egy 39 éves férfi beteg volt, akinek antibiotikummal összefüggő hasmenése volt az appendectomia után. Első hasmenéses széklet mintáját laboratóriumi vizsgálatokhoz 2008. november 3-án küldték be, amikor a BD GeneOhm Cdiff teszt, a citotoxicitási vizsgálat és a toxinogén *C. difficile* tenyésztési eredményei mind pozitívak voltak; de a Vidas *C. difficile* toxin vizsgálata negatív volt. A tartós hasmenés miatt a toxinok kimutatását 10 nappal később, a beteg kórházból történő elbocsátását követően ismételten elvégeztük a Vidas vizsgálattal, amely pozitív eredményt adott.

A **második esetben** egy 75 éves beteget kezeltek a Fertőző Osztályon súlyos hasmenés miatt. Négy mintát küldtek laboratóriumunkba (2008. október 5-én, 14-én és 27-én és november 13-án) a toxin-termelő *C. difficile* kimutatására a megfelelő antibiotikus kezelés ellenére

fennálló tartós hasmenés miatt. Három minta negatív volt, egy minta egyértelmű pozitív eredményt adott a Vidas toxin vizsgálattal, a közvetlen székletvizsgálat eredményeként kapott citotoxicitási vizsgálat pozitív volt két minta esetében: október 5-én és 27-én. Ezzel szemben mind a négy minta pozitív volt a BD GeneOhm Cdiff vizsgálattal, a mintákból ki tudtuk tenyészteni a *C. difficile* törzseket, melyek toxin-termelését minden esetben a citotoxicitási vizsgálat és a PCR vizsgálat igazolta.

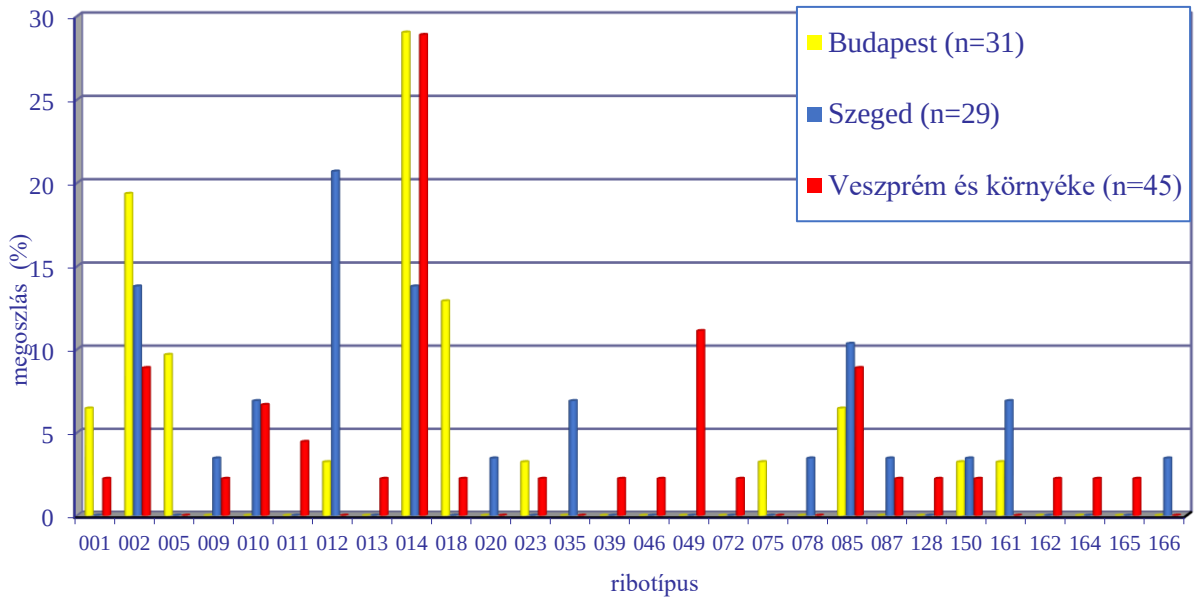
A *C. difficile* PCR ribotípusok megoszlása Magyarországon 2002-2004.

A vizsgálatba összesen **százöt, hasmenéses székletmintákból** származó *C. difficile* izolátumot válogattunk be, melyeket három magyarországi régióból: Szeged, Szolnok (Dél-Magyarország), Budapest (Budapest) és Veszprém (Nyugat-Magyarország) 2002-ben és 2004-ben gyűjtöttünk. A 105 izolátumból 65 törzset fekvőbetegekből, 40 törzset pedig járóbetegből izoláltak a laboratóriumok. Összesen 99 izolátumot választottunk ki abból az előzőekben ismertetett korábbi vizsgálatunkból, amelyben a fő toxin géneket és binary toxin géneket elemeztük (Terhes G. *et al.* 2004) és hat további toxin-termelő törzset választottunk ki a saját törzsgyűjteményünkből azért, hogy meghatározzuk az adott időszakban jellemző hazai PCR ribotípusokat.

A vizsgált százöt *C. difficile* izolátumból 83 (79%) hordozta a *tcd*A és *tcd*B géneket, míg 22 volt a *tcd*A és *tcd*B-génekre negatív. Ezeket a toxin-termelő törzseket 29 és 79 év közötti felnőttekből izoláltuk, kivéve 5 olyan izolátumot, amelyek 3 évesnél fiatalabb gyermekek székletéből származtak. Ebben az időszakban a vizsgálat alatt még nem találtunk A toxin-negatív és B toxin-pozitív izolátumot. A ribotipizálás során összesen 23 különböző ribotípust találtunk és a cardiffi típustenyészet gyűjteményben a PCR ribotípusok *C. difficile* könyvtárában rögzített mintákkal való összehasonlítás során 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 a 085 PCR ribotípushoz (9/22 izolátum) tartozott (**4. ábra**).

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 (**7. táblázat**). Ebben az időszakban összesen 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/lásd előző fejezetben részletesen bemutatott 2 eset/) mutattuk ki, de Dél-Magyarországon ebben az időszakban még nem jelentek meg binary toxin-termelő törzsek. A különböző ribotípusok gyakoriságát összehasonlítottuk a fekvőbetegek és a járóbetegek között, de nem találtunk szignifikáns különbségeket, kivéve a 012-es PCR ribotípus esetében amely gyakrabban fordult elő a fekvőbetegekből származó izolátumok között.

4. ábra: A PCR ribotípusok eloszlása a vizsgált három magyar régióban 2002-2004.



7. táblázat: A PCR ribotípusok eloszlása a vizsgált három magyar régióban 2002-2004.
Piros színnel jelölve a binary toxin-termelő törzsek

Ribotípus	Toxin A/B	Binary toxin	Budapest régió	Nyugat-Magyarország	Dél-Magyarország	Összes
001	+ / +	-	2	1	0	3
002	+ / +	-	6	4	4	14
005	+ / +	-	3	0	0	3
009	- / -	-	0	1	1	2
010	- / -	-	0	3	2	5
011	+ / +	-	0	2	0	2
012	+ / +	-	1	0	6	7
013	+ / +	-	0	1	0	1
014	+ / +	-	9	13	4	26
018	+ / +	-	4	1	0	5
020	+ / +	-	0	0	1	1
023	**+ / +**	**+**	**1**	**1**	**0**	**2**
035	- / -	-	0	0	2	2
039	- / -	-	0	1	0	1
046	+ / +	-	0	1	0	1
049	+ / +	-	0	5	0	5
072	+ / +	-	0	1	0	1
075	**+ / +**	**+**	**1**	**0**	**0**	**1**
078	+ / +	-	0	0	1	1
085	- / -	-	2	4	3	9
087	+ / +	-	0	1	1	2
128	- / -	-	0	1	0	1
150	+ / +	-	1	1	1	3
161	+ / +	-	1	0	2	3
162	+ / +	-	0	1	0	1
164	- / -	-	0	1	0	1
165	+ / +	-	0	1	0	1
166	- / -	-	0	0	1	1

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

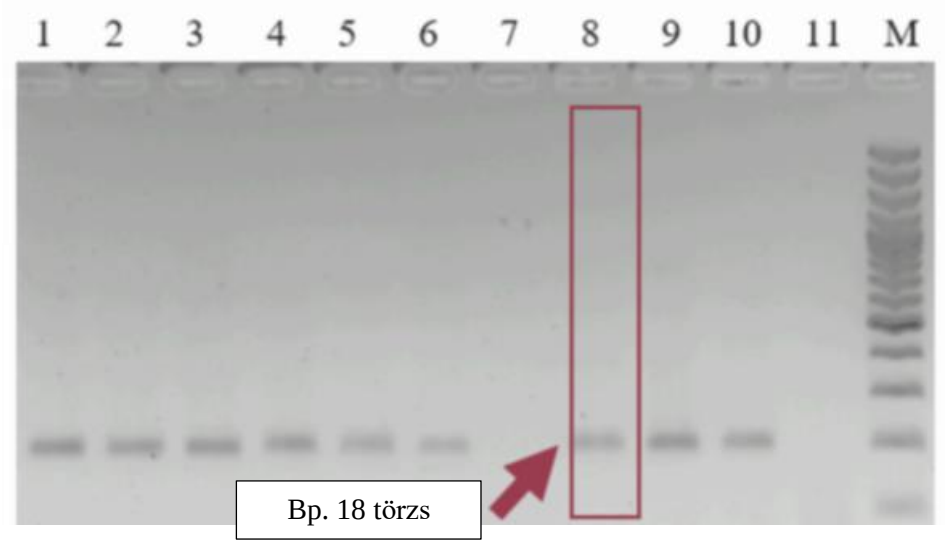
Esetismertetés: 2007. júniusában egy 53 éves, súlyos hasmenés- és hányinger tünetekkel rendelkező férfibeteg került kórházba Budapesten. A kórtörténetben 2 héttel a jelen felvétele előtt kórházba került a szisztémás lupus erythematosus miatt, akkor antibiotikum-kezelést (ceftriaxon, clarithromycin és imipenem) kapott. A bennfekvése alatt laboratóriumba küldött székletmintái negatívak voltak *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolytica, Campylobacter* spp. és enterális vírusokra. A támogató terápia ellenére a beteg állapota nem javult, és a hasmenés tovább perzisztált. A kolonoszkópia kimutatta, hogy az ileális nyálkahártya érintetlen volt, de a vastagbélben fekélyek voltak láthatóak. Ezért a beteget nagyobb adag szteroidal és empírikusan metronidazollal kezelték. *C. difficile* toxin kimutatás (VIDAS ® *C. difficile* A toxin II; bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Fr) pozitív eredményt adott a kezelő intézmény mikrobiológiai laboratóriumában. A súlyosbodó és tartós hasmenés illetve a terápiás kudarc miatt az antibiotikum-kezelést orális vancomycinre váltották. Július 25-én magas láz, jobb oldali tüdőgyulladás és légzési rendellenesség alakult ki; a beteget felvették az Intenzív Osztályra, ahol hamarosan exitált. A betegnél az *Escherichia coli* szepszist a pozitív hemokultúra tenyésztés igazolta.

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, illetve molekuláris vizsgálattal az A és B toxin gének, továbbá a binary toxin termeléséért felelős gének jelenlétét igazoltuk (**5-6. ábra**). A *tcd*A gén 3'-végén deléciót nem detektáltuk a NK9 és NK11 primerek alkalmazásával. Elvégeztük a törzs *tcd*C génjének részletes szekvencia analízisét, mely egy 18 bp hosszúságú 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 ribotípus mintázatával és a 027 ribotípusú kontroll törzsek mintáival, ami alapján egyértelmű volt, hogy az **izolált törzs 027 ribotípusú**.

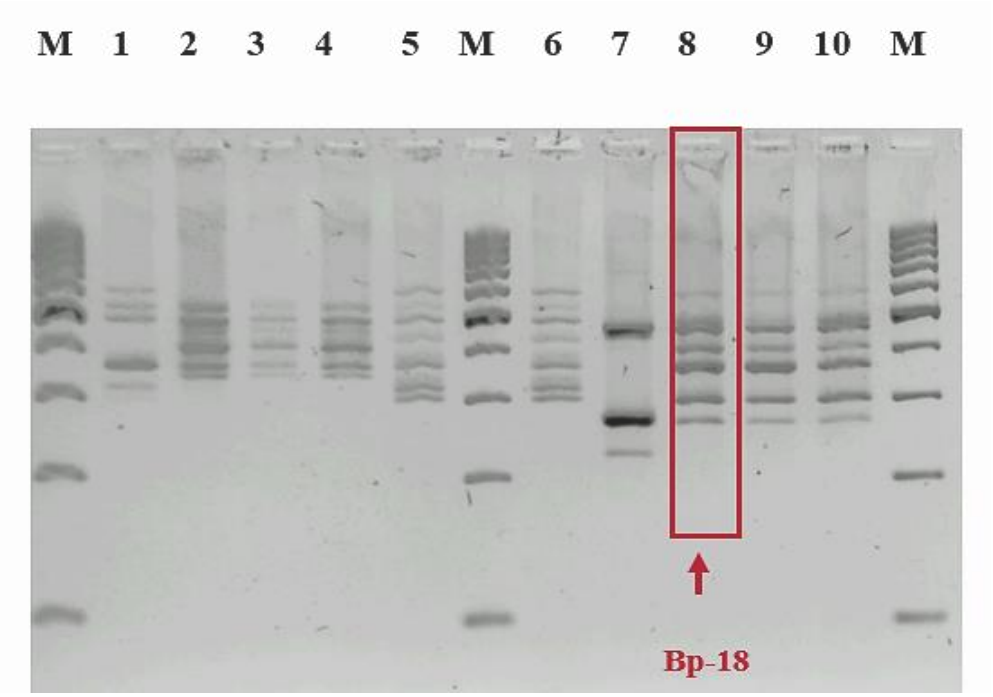
A törzs rezisztens volt az erythromycinre (≥256 mg/l) és a moxifloxacinra (≥32 mg/l), míg a metronidazolra (1 mg/l), vancomycinre (1 mg/l) és a rifampicinre (≤0,002 mg/l) érzékeny a clindamycinre mérsékelten érzékeny volt (4 mg/l).

Ez az eset is bizonyítja a kockázati tényezők fontosságát: a korábbi hospitalizáció, az antibiotikum terápia és az immunszupresszió jelen esetben is hozzájárult a *C. difficile*-asszociált hasmenés (CDAD) kialakulásához. Bár nem volt további bizonyíték 027-es PCR ribotípusú törzs által okozott későbbi súlyos esetekre, illetve az osztályon, vagy az Intenzív Osztályon enterális esethalmozódásra, vagy járványra, ez volt az elsőként felfedezett és molekuláris diagnosztikai módszerekkel igazolt hazai 027-es PCR ribotípus okozta eset, amely felhívta a figyelmet a *C. difficile,* mint nozokómiális enterális patogén szerepére, a kórokozó lehető legrövidebb időn belül történő kimutatására és az időben történő mikrobiológiai diagnózis, majd az ez alapján történő adekvát terápia fontosságára.

5. ábra: A *tcd*B gén kimutatása PCR módszerrel
1-6: ismert *tcd*B gén pozitív törzsek, 7: negatív kontroll, **8: saját vizsgált törzs**, 9-10: 027 PCR ribotípusú törzsek, 11: negatív kontroll, M: molekulasúly marker



6. ábra: PCR ribotípus meghatározás
M: Molekulasúly marker, 1-7: különböző PCR ribotípusú törzsek, **8: saját vizsgált törzs**, 9-10: 027 PCR ribotípusú kontroll törzsek



A *C. difficile* PCR ribotípusok előfordulása Magyarországon: 2006-2007.

2006 és 2007 között négy nagy hazai mikrobiológiai laboratóriumból (Budapest, Szeged, Székesfehérvár és Veszprém), -amelyek a Nyugat-, Közép és Délkelet magyarországi régiókat reprezentálták- 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 *tcd*A és *tcd*B gének jelenlétét. A *tcd*A 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 *cdt*B gént, ezekben a törzsekben a *tcd*A és a *tcd*B géneket is kimutattuk. Az A és B toxin-pozitív törzsek többségét (35,8%) a viszonylag idősebb korosztályú: 61-80 éves betegekből izoláltuk.

Mivel ebben az időszakban a hipervirulens 027 ribotípusú törzsek jelentős, járványszerű európai elterjedéséről számoltak be a közlemények, illetve néhány magyarországi kórházban megjelentek a súlyos és gyakran rekurrens CDI esetek, 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, míg a fennmaradó három a 131-es ribotípusba tartozott. Az ebben az időszakban újonnan leírt hipervirulens 078-as ribotípusú törzsek az 51-62 éves korosztályba tartozó betegekből származtak, az anamnesztikus adatok alapján három esetben kórházi-nozokómiális infekcióból származott a minta, egy esetben közösségben szerzett volt az infekció.

A *C. difficile* PCR ribotípusok előfordulása Magyarországon 2014.

2014 meghatározott időszakában (október 1. és december 1. között) gyűjtött **százkilencvenkét** toxin-termelő *C. difficile* törzset vizsgáltunk kapilláris gélelektroforézis (CE) PCR ribotípus meghatározási módszerrel. A törzseket fekvőbetegek (n=154) és járóbetegek (n=38) hasmenéses székletmintáiból izoláltuk két laboratóriumban, amelyek a közép- és délkelet-magyarországi országrészeket képviselik: a Synlab Hungary (Budapest) és a SzTE KMDI. A budapesti laboratórium főként budapesti kórházakból származó törzseket gyűjtött (29 izolátum); 41 további izolátumot gyűjtöttek be különböző vidéki kórházak betegeitől. A szegedi klinikai izolátumokat (84 törzs) a szegedi egyetemi klinikák kilenc különböző osztályáról gyűjtöttük össze. Csak a toxin-termelő törzsek kerültek be a vizsgálatba, mindegyik esetben a QUIK CHEK COMPLETE (TechLab, Blacksburg, VA, USA) immuno-kromatográfiás módszerrel végzett pozitív eredmény igazolta a toxin A/B pozitivitást. Az összegyűjtött demográfiai adatok a betegek életkorát, nemét és a kórképet: hasmenés, tartalmazták.

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%), 0 14 (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. Ezen új ribotípusok megjelölésére további vizsgálat egyenlőre nem történt. Az izolátumok döntő többsége, 141 (73,4%), 61 év feletti betegekből származott és ebben a betegcsoportban a 027-es és 036-os ribotípusok (52 illetve 33 izolátum) domináltak.

A **8. táblázat** mutatja be a négy domináns ribotípus eloszlását a budapesti és szegedi régióból gyűjtött fekvő- és járóbeteg-izolátumok között. 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 ebben az időszakban. 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 izoláltaknál, ahol ez jóval kevesebb volt (19,8%).

8. táblázat: A Magyarország két régiójában kórházakból és járóbetegekből izolált *C. difficile* törzsek domináns ribotípusainak megoszlása 2014-ben

Ribotípusok	**A *C. difficile* törzsek száma**					
	Budapest			**Szeged**		
	fekvő	**járó**	**Teljes (%)**	**fekvő**	**járó**	**Teljes (%)**
014	2	0	2 (2,1)	9	2	11 (11,4)
027	36	8	44 (45,8)	18	2	20 (20,8)
036	10	0	10 (10,4)	27	1	28 (29,1)
176	6	7	13 (13,5)	0	0	0
Egyéb *	9	10	19 (19,8)	24	5	29 (30,2)
'Új'†	7	1	8 (8,3)	6	2	8 (8,3)
Összesen	70	26	96	84	12	96

Egyéb *: 002, 003, 010, 012, 018, 020, 056, 066, 070, 078, 087, 126, 203, 209, 400, 430, 449, 456, 484, 541, 591, 653, 698, AI-3 AI-12, AI-75, AI-83. † A tanulmány időpontjában nem ismert ribotípusok.
Kék színnel kiemelve az epidémiás 027-es ribotípus.

A *C. difficile* PCR ribotípusok előfordulása 2018.

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 (*tcd*B) és binary toxin gén A komponens (*cdt*A) 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 hipervirulens 027-es ribotípusú *C. difficile* törzsek kivétel nélkül rendelkeznek a *cdt*A génnel, a vizsgált törzsek mindegyike rendelkezett a PaLoc lókuszban elhelyezkedő *tcd*B génnel. A legtöbb CDI az idősebb korosztályt érintette: a 61 és 80 év közötti korcsoportban a leggyakoribb ribotípusok okozta megbetegedések száma 24-volt, ami a vizsgált betegek 24%-át teszi ki és az esetek 90%-ában a 027-es PCR ribotípust lehetett kimutatni, ami a 80 év felettieket érinti, esetükben is a 027-es PCR ribotípus dominált (60%).

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. A **9. táblázat** mutatja be a vizsgálatok eredményeit; a MIC értékek megoszlási határait a MIC_{50}, MIC_{90} értékeket és az alkalmazott rezisztencia határértékeket.

9. táblázat: A vizsgált antibiotikumok MIC értékeinek megoszlási tartományai, a MIC_{50}, MIC_{90} értékek a vizsgált *C. difficile* törzsek esetében (n=100)

Antibiotikum	**MIC mg/l**					
	Megoszlási tartományok	**MIC_{50}**	**MIC_{90}**	**Alkalmazott határértékek**		
				Érzékeny	**Mérsékelten érzékeny**	**Rezisztens**
Clindamycin*	0,5–256	2	256	≤2	4	≥8
Erythromycin**	0,064–256	1	256	≤0,5	4	≥8
Metronidazol*	0,032–2	0,25	1	≤8	16	≥32
Moxifloxacin***	0,25–32	1	32	≤2	4	≥8
Rifampicin**	≤0,002–32	≤0,002	0,5	≤1	2	≥4

*CLSI határérték anaerob baktériumokra; **CLSI határérték *S. aureus*-ra; ***Ambler J. *et al.* 2008.

Az összes vizsgált izolátum érzékeny volt metronidazolra. A rifaximin a rifamicin félszintetikus derivátuma, ami számos aerob és anaerob Gram-pozitív és negatív baktériummal szemben baktericid hatással rendelkezik és az e csoportba tartozó antibiotikumokhoz hasonlóan irreverzibilisen kötődik a baktérium DNS függő RNS-polimeráz enzim béta alapegységéhez, gátolva ezzel a baktérium RNS és fehérje szintézisét. A per os alkalmazott rifaximin gyakorlatilag nem szívódik fel a gyomor-bél traktusból (kevesebb, mint 1%), aktív formában a bélben és a székletben koncentrálódik. Az intesztinális traktusban magas koncentrációban jelenlévő rifaximin igen hatékony a patogén baktériumok (így a toxin-termelő *C. difficile*) eradikációjában, azonban eddig csak néhány érzékenységi vizsgálat történt a *C. difficile* esetében. Ennek a magyarázata az lehet, hogy nincs kereskedelmi forgalomban kapható teszt a rifaximin rezisztencia mérésére és nincsenek CLSI interpretatív határértékek. O'Connor *és munkatársai* összehasonlították a *C. difficile* törzsek esetében a rifaximin agar dilucióval és E-teszt-el kapott MIC értékeit, arra a megállapításra jutottak, hogy a rifampicin E-teszt-el végzett vizsgálatok jobban előrejelzik a rifaximin rezisztenciát (O'Connor JR. *et al.* 2008), ezért ebben a vizsgálatunkban rifampicin E-teszt-et használtunk, hogy a rezisztens fenotípusokat kimutassuk. 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, igen alacsony MIC értékkel: 0,002 mg/ml **(10. táblázat)**.

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. A 2006-2007-es törzsek 20%-a (16 izolátum) mutatott mérsékelt érzékenységet a clindamycinnel szemben, míg a 2002-2003-as törzsek között csak 2 volt mérsékelten érzékeny a clindamycinre. 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. Ezeket a törzseket (13), melyek kereszt-rezisztenciát mutattak az erythromycin, clindamycin és a moxifloxacin esetében, olyan betegekből izoláltuk, akiket Intenzív Osztályokon (4 törzs), Haematológiai Osztályon (3 törzs), Infektológiai Osztályon (3 törzs), Sebészeti Osztályon (2 törzs) és Kardiológiai Osztályon (1 törzs) kezeltek. Ezek az adatok rámutatnak arra a tényre, hogy társult rezisztenciával rendelkező törzsek sokkal gyakoribbak azokon az osztályokon, ahol az antibiotikum túlzott mértékű felhasználása nagyobb arányú.

10. táblázat: A rezisztens/mérsékelten érzékeny *C. difficile* izolátumok száma a két vizsgálati időszakban

Antibiotikum	**A rezisztens/mérsékelten érzékeny izolátumok száma/%**			
	2002-2003-ban izolált törzsek n=20		**2006-2007-ben izolált törzsek n=80**	
	Rezisztens	**Mérsékelten érzékeny**	**Rezisztens**	**Mérsékelten érzékeny**
Clindamycin	0	2 (10%)	22 (27,5%)	16 (20%)
Erythromycin	0	0	20 (25%)	2 (2,5%)
Metronidazol	0	0	0	0
Moxifloxacin	0	0	20 (25%)	4 (5%)
Rifampicin	0	0	5 (6,25)	0

Az előző vizsgálatunkat 2008 és 2010 között gyűjtött **kétszáz toxin-termelő** *C. difficile* törzzsel ugyanezekkel a standardizált módszerekkel megismételtük. A vizsgálatba bevont törzsek közül hat hordozta a *cdt*B gént; kettő tartozott a 027-es ribotípusba. Ebben az időszakban a binary toxin-termelő izolátumok prevalenciája igen jelentősen megemelkedett, amely köszönhető a 027-es ribotípusú törzsek által okozott nemzetközi járványnak. Mivel az Országos Anaerob Referencia Laboratóriumba küldött törzsek igen jelentős része ebbe a ribotípusba tartozott ebben a vizsgálati periódusban és a 027-es ribotípusú törzsek antibiotikum érzékenységi profiljuk nagyjából egységes, a nem-PCR 027-es ribotípusú toxin-termelő törzseket válogattuk be ebbe a vizsgálatba. Ez lehetővé tette az előző vizsgálattal való összehasonlítást is. Az összes, ebben az időszakban vizsgált törzs érzékeny volt metronidazolra mind a CLSI, mind az EUCAST határértékei alapján, a MIC_{50} 0,5 µg/ml, míg a MIC_{90} 1 µg/ml volt (**11. táblázat**).

11. táblázat: A vizsgált antibiotikumok MIC értékeinek megoszlási tartományai, a MIC_{50}, MIC_{90} értékek a vizsgált *C. difficile* törzsek esetében (n=200)

Antibiotikum	**MIC mg/l**				
	Megoszlási tartományok	**MIC_{50}**	**MIC_{90}**	**Rezisztens**	**Mérsékelten érzékeny**
Clindamycin*	≤0,016-≥256	2	≥256	29,5%	16%
Erythromycin**	≤0,016-≥256	1	≥256	31%	25,5%
Metronidazol*	0,032–2	0,5	1	0	0
Moxifloxacin***	0,125-≥32	1	≥32	21,5%	3,5%
Rifampicin**	≤0,002-≥32	≤0,002	≥32	11,5%	0

*CLSI határérték anaerob baktériumokra; **CLSI határérték *S. aureus*-ra; ***Ambler J. *et al.* 2008.

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 CLSI határértékei illetve Ambler *et al.* által ajánlott határérték alapján. Amikor az EUCAST még nem hivatalos határértékeit vettük figyelembe a moxifloxacinra (az epidemiológiai határérték: Epidemiologic Cutoff Value: ECOFF a "vad" típusú izolátumok esetén: ≥4 mg/l moxifloxacinra), ugyancsak a törzsek 21,5 %-a rezisztens volt a moxifloxacinnal szemben. A vizsgált törzsek közül 34 (17%) törzs mutatott rezisztenciát csak az erythromycinnel és/vagy a clindamycinnel szemben, míg 18 (9%) törzs esetében társ-rezisztencia volt kimutatható a makrolid/linkózamid és a moxifloxacin között. Társ-rezisztenciát makrolid/linkózamid, moxifloxacin és rifampicinre együttesen 20 (10%) törzs esetében mutattunk ki. Érdekes, hogy 5 (2%) törzs volt rezisztens csak a moxifloxacinra és egy (0,5%) törzs mutatott rezisztenciát csak a rifampicinnel szemben.

A rifampicin esetében a MIC megoszlási tartományok meglehetősen széles határok között mozogtak: ≤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 (MIC ≥32 mg/l) rifampicinnel szemben (**11. táblázat**). A rifampicin rezisztens izolátumok közül 19 törzs volt rezisztens az erythromycinre, clindamycinre és a moxifloxacinra is, de csak egy törzs volt kizárólag a rifampicinre rezisztens. Abban az esetben, ha az EUCAST még nem hivatalos határértékeit vettük figyelembe (rifampicin ECOFF a "vad" típusú törzsek esetében: 0,004 mg/l), a törzsek 20%-a mutatott rezisztenciát, mely ebben az esetben magasabb érték volt, mint amikor a CLSI kritériumokat vettük figyelembe.

Ugyanebben az időszakban egy másik vizsgálatunkban az újonnan bevezetett **fidaxomicin**nel (szűk spektrumú, a makrociklusos antibiotikumok egy osztályának első tagja) szembeni érzékenységi viszonyokat vizsgáltuk a *C. difficile* törzsek esetében. A per os bevitt fidaxomicin minimálisan szívódik fel a véráramba, baktericid és szelektíven hat az intesztinális toxin-termelő *C. difficile* törzsekre, irodalmi adatok alaján csökkenti a relapszusok arányát. A szakmai kritériumok alapján bizonyítottan CDI-ben szenvedő betegek hasmenéses székletmintáit gyűjtöttük 2008 és 2010 között három magyarországi laboratóriumból (SYNLAB Székesfehérvár, Debrecen DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet Diagnosztikai részlege, SZTE ÁOK KMDI). A mintagyűjtés után a székletekből a SZTE KMDI-ben izoláltuk a *C. difficile* törzseket. A mintákból izolált *C. difficile* törzsek esetében komparátor antibiotikumokként

alkalmazva metronidazol, vancomycin, moxifloxacin és rifampicin érzékenységi vizsgálatokat végeztük el.

Összesen **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*". Habár az összes törzs esetében nem történt meg a PCR ribotipizálás, öt törzs (2,6%) esetében ismert volt, hogy a törzsek a 027 ribotípusba tartoznak.

A vizsgálat során metronidazol és vancomycin rezisztens, vagy csökkent érzékenységű törzset nem találtunk. A törzsek 19,7%-a (37 törzs) volt rezisztens moxifloxacinra és 28 törzs (14,9 %) esetében volt a rifampicin rezisztens. Minden vizsgált antibiotikum esetében a MIC_{50} értékek viszonylag alacsonyak voltak, azonban a moxifloxacin és a rifampicin MIC_{90} értéke 32 mg/l volt (**12. táblázat**).

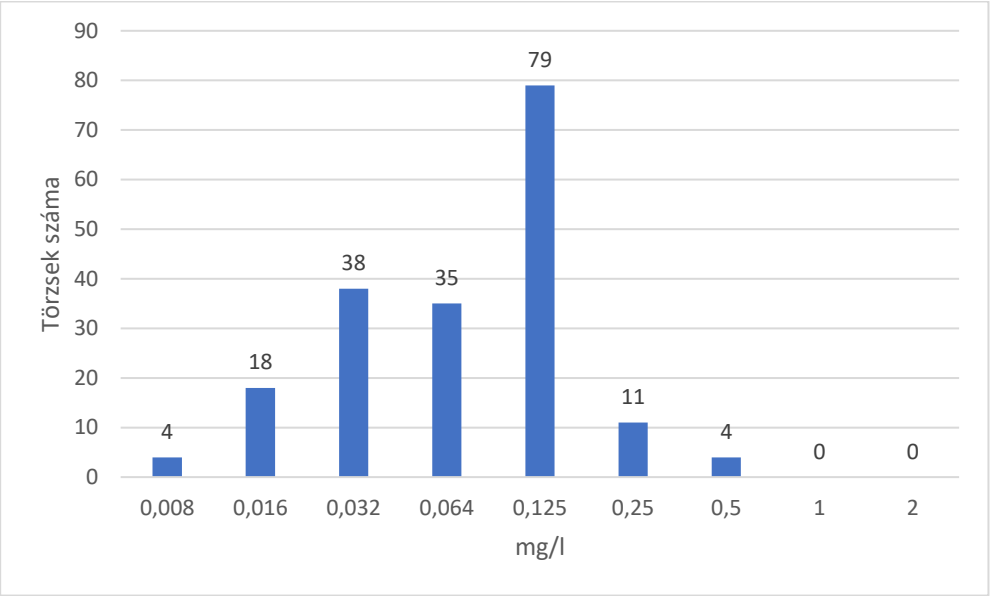
Az összes *C. difficile* törzs érzékeny volt fidaxomicinre (MIC ≤0,5 mg/l), az izolátumok többségének 0,125 mg/l, vagy alacsonyabb fidaxomicin MIC értéke volt, csak 4 izolátum MIC-e volt 0,5 mg/l (**7. ábra**). Ezek közül a törzsek közül egy volt rezisztens moxifloxacinra (MIC 32 mg/l) és egy másik törzsnek csökkent érzékenysége volt rifampicinre (MIC 1 mg/l). Ebben a vizsgálatunkban a fidaxomicin MIC értékek megoszlása teljesen megegyezik az EUCAST adatbázisában található "vad" típusú törzsek MIC értékeinek megoszlásával (http://eucast.org). A kontroll *C. difficile* (CD 630) törzs fidaxomicin MIC értéke 0,064 mg/l± 1 hígítás volt. A binary toxin-termelő izolátumok (5 törzs) fidaxomicin MIC értékei ≤0,125 mg/l voltak, nem találtunk különbséget a fidaxomicin érzékenységében az egyéb, feltehetően más ribotípusú vizsgált *C. difficile* törzsek között.

12. táblázat: A vizsgált antibiotikumok MIC értékeinek megoszlási tartományai, a MIC_{50}, MIC_{90} értékek a vizsgált *C. difficile* törzsek esetében (n=188)

Antibiotikum	**MIC mg/l**				
	Határok	**MIC_{50}**	**MIC_{90}**	**Geometriai**	**Rezisztens %**
Fidaxomicin	≤0,008 – 0,5	0,064	0,125	0,097	0
Vancomycin*	0,125 – 2	0,5	1	0,647	0
Metronidazol*	0,032 – 2	0,5	1	0,542	0
Moxifloxacin**	0,125 - >32	1	32	6,977	19,7%
Rifampicin**	≥0,002–32	≥0,002	32	4,318	14,9

*CLSI határérték anaerob baktériumokra; **CLSI határérték *S. aureus*-ra,
Fidaxomicin határérték: http://eucast.org

7. ábra: A fidaxomicin MIC értékek megoszlása a 188 vizsgált *C. difficile* törzs esetében



Extraintesztinális *C. difficile* infekciók

A toxintermelő *C. difficile* törzsek patogén szerepe az antibiotikum adását követő colitisekben, hasmenésekben, pseudomembranous colitisekben, nozokómiális hasmenésekben, székletszóródással összefüggő abdominális infekciókban széles körben publikált és ma már jól ismert. Az irodalmi adatok alapján azonban 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.

Esetismertetés: 31 éves, jó általános állapotú, egészséges, alapbetegségben, immunhiányos állapotban nem szenvedő frissen traumatizált férfibeteget szállított be a mentő a SzTE ÁOK Traumatológiai Klinikájának Sürgősségi ambulanciájára. Mezőgazdasági munka (burgonyabetakarító géppel történt sérülés) során szenvedett nagy kiterjedésű, mély, egészen a csont felszínéig terjedő jobb alsó végtagi sérüléseket. A sérülést követő azonnali műtét során sebfeltárás, sebtisztítás és mikrobiológiai mintavétel történt. A 2. posztoperatív napon bullaképződést és lokális erythemát figyeltek meg a seb körül, majd ismételt feltárás és ismételt mikrobiológiai mintavétel következett. A mediálisan elhelyezkedő sebet kitisztították, a laterális sebből a nekrotizált, elhalt szöveteket eltávolították és a sebet nyitva hagyták. A betegnek szisztémás tünete, láza, hőemelkedése nem volt. A kórházi tartózkodás ideje alatt, illetve az azt követő 3 hónapban a betegnek hasmenése, laza széklete, hasi panaszai nem voltak.

A mikrobiológiai tenyésztés során mindkét mintából az aerob inkubálás során nagy csíraszámban *Bacillus subtilis*, az anaerob inkubálás során toxin-termelő *C. difficile* törzs tenyészett ki, mely a szóba jöhető anaerob ellenes antibiotikumokkal szemben, a metronidazol és a karbapenemek kivételével rezisztens volt. A klinikus az eddig alkalmazott antibiotikumok (Dalacin, Zinnat) helyett a tenyésztés és az antibiogram ismeretében Dalacin, Tienam kombinációt alkalmazott. 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 kitenyészett *Bacillus subtilis* törzzsel történő együttes előfordulás felvetette a földdel történő szennyeződés gyanúját. Későbbi mintavételek során már nem sikerült a *C. difficile* törzset izolálni a beteg sebéből. A beteg sebe a megfelelő sebkezelés, antibiotikus terápia hatására hosszas gyógyulási folyamat után jól záródott, a beteg 2 hét klinikai ápolás után lobmentes sebbel otthonába távozott.

A kitenyésztett *C. difficile* törzs antibiotikumokkal szembeni érzékenységi MIC értékei: penicillin: 4 mg/l, amoxycillin/klavulánsav: 8 mg/l, metronidazol: 0,5 mg/l, imipenem: 1 mg/l, meropenem: 2 mg/l, cefoxitin: 64 mg/l, clindamycin: 8 mg/l voltak. Az izolált törzsnél a toxin-vizsgálatokat egyrészt ELFA MiniVIDAS (bioMérieux, Marcy, Fr) módszerrel végeztük el, mely alapján a törzs A/B toxin-termelőnek bizonyult, illetve a törzs B toxin termelését HeLa sejtvonalon is ellenőriztük. Az elvégzett 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 meghatározásunk során a törzs 014-es PCR ribotípusúnak, illetve a PaLoc szekvenálási vizsgálatunk alapján XVIII. toxin-típusúnak bizonyult.

Az extraintesztinális *C. difficile* infekciók előfordulása a SZTE ÁOK klinikáin 2008-2017.

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 huszonkét beteg (11 férfi, 11 nő, átlagéletkor: 55,4 év, 9 hó-84 év) extraintesztinális (nem széklet) 24 mintájából tenyészett ki *C. difficile* törzs. A betegek többsége komorbid, súlyos alapbetegségekkel rendelkező beteg volt, tíz beteg (45,5%) életkora volt 65 év feletti. A minták többsége a Sebészeti Osztály különböző részlegeiről származott (n=12), 3 minta az Intenzív Osztályról, 3 minta a Bőrklinikáról, 2-2 minta a Gyermekgyógyászati Klinikáról, a Belklinikáról és 1-1 minta származott a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról, a Fogászati Klinikáról és az Urológiáról.

A minták többsége felületi sebváladék (n=6), sebváladék (n=4) és tályog minta volt (n=5), hasűri és intraoperatív minta 3-3 volt, 1-1 törzset izoláltunk hemokultúrából, epéből és hólyagbennékből. Nyolc beteg esetében volt az infekció valamilyen abdominális eredetű (appendicitis, végbéltályog, Crohn-betegség, stb….) 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) a vegyes, komplex flóra részeként, illetve egy 54 éves nőbeteg, ahol igazolt PID-esetből, rendellenes méh- és hüvelyvérzést követő műtét során vett mintából színtenyészetben, egyedüli kórokozóként izoláltuk a törzset. Két beteg esetében két alkalomman is sikerült a baktériumot izolálni: az egyik beteg egy 60 éves, Intenzív Osztályon fekvő férfibeteg volt, akinek két sebváladék mintájából egy vegyes anaerob baktériumflóra részeként, illetve egy 32 éves nőbeteg, akinél a vese körüli tályog mintából izoláltuk egyedüli kórokozóként, nagy csíraszámban a 027-es ribotípusú törzset egymás után, két különböző mintából.

Ugyanebben az időszakban 4 105 székletmintából tenyésztettünk ki *C. difficile* törzset, tehát a vizsgált 10 éves periódusban az összes CDI eset 0,58%-a volt extraintesztinális. Az extraintesztinális CDI 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 lágyrész infekciója.

A legtöbb esetben a *C. difficile* törzset egyéb, más aerob, fakultatív- és obligát anaerob baktériumokkal együtt izoláltuk, csak 4 minta (2 beteg 1-1 mintája, egy beteg két különböző mintája) esetében (egy hemokultúra, egy nőgyógyászati intraoperatív minta és két vesetályog intraoperatív minta) volt a *C. difficile* törzs színtenyészetben, nagy csíraszámban, egyedüli izolátum. A leggyakoribb társpatogének az *E. coli* (6 eset) és az *E. faecalis/faecium* (6 eset) voltak, négy beteg mintájában csak egyéb anaerob társpatogén baktérium volt jelen a *C. difficile* mellett (**13. táblázat**), 2 minta esetében izoláltunk táspatogénként sarjadzó gomba törzset (1 *C. albicans* és egy *C. tropicalis*). 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. A törzsek minden esetben érzékenyek voltak metronidazolra, vancomycinre, a clindamycin rezisztencia 20,5% volt, a rifampicin rezisztens törzsek aránya 9,7% volt az összes törzsre vonatkoztatva. Az adott vizsgálatok időpontjában a betegek egyikének sem volt hasmenése, székletből történő *C. difficile* vizsgálatot egy beteg esetében sem kértek a klinikusok.

13. táblázat: Az extraintesztinális *C. difficile* infekciók epidemiológiája 2008-2017.

Év	Beküldő	Járó/ fekvő	Nem	Kor	Beutaló diagnózis	Minta típusa	A/B toxin	RT	Társ-patogének
2008.	Sebészet	F	ffi	82	Heveny féregnyúlvány gyulladás	műtéti minta	+	078	*E. faecium* *Veillonella* *C. tropicalis*
2008.	Gyermek ITO	F	nő	9 hó	Bél-betüremkedés	hasűri punctatum	+	011	*B. vulgatus* *B. uniformis* *C. ramosum*
2009.	Szájsebészet	J	nő	38	Nyálmirigy gyulladás	tályog	-		*Str. viridans* *C. ureolyticus* *P. buccae* *P. anaerobius* *Veillonella*
2009.	Urológia	J	nő	37	A bőr és a bőralatti szövetek gyulladása	felületi seb	+	198	*A. meyeri* *C. ureolyticus* *P. anaerobius* *P. melaninogenica*
2009.	Sebészet	F	ffi	69	Üszkösödés	műtéti minta	-		*A. prevotii* *P. buccae* *P. intermedia*
2009.	Bőrgyógyászat	J	ffi	60	Az alsó végtagok visszértágulatai fekéllyel	tályog	-		*S. pyogenes* *S. aureus* *C. ureolyticus* *C. acnes* *E. limosum* *C. fallax*
2010.	Sebészet	F	ffi	58	Epehólyag-kövesség	epe	+	027	*C. bifermentas*
2010.	Nőgyógyászat	F	nő	54	Rendellenes méh- és hüvelyvérzés	intraoperatív seb	+	198	-
2010.	Bőrgyógyászat	J	ffi	22	Erythema intertrigo	felületi seb	-	488	*S. aureus* *P. anaerobius* *C. ureolyticus* *E. lentum* *Mobiluncus* sp.

2011.	Kardiológia	F	nő	80	Elektrolit-folyadék-egyensúly zavarok	hemokultúra	+	027	-
2011.	Sebészet	J	nő	22	Végbéltályog	tályog	+	027	*C. albicans* *E. coli* *S. pyogenes* *P. bivia* *P. oralis* *P. anaerobius* *E. limosum*
2011.	Gyermek Kl.	J	ffi	17	Terápia rezisztens vastag- és vékonybél Crohn betegség	tályog	+	018	*S. acidomiminus* *E. coli* *P. anaerobius* *F. magna* *C. bifermentans* *P. melaninogenica*
2011.	Sebészet	J	nő	80	Hasi fájdalom	felületi seb	+	027	*S. pyogenes* *M. morganii* *P. anaerobius* *B. fragilis*
2012.	ITO	F	ffi	84	Septicaemia	hólyagbennék	**n.v.**		*Acinetobacter* sp. *C. acnes*
2012.	Sebészet	F	ffi	70	Flexura lienalis rosszindulatú daganata	mûtéti minta	+	027	*E. coli* *E. faecium* *P. aeruginosa* *E. lenta* *B. fragilis*
2013.	ITO	F	ffi	60	Myasthenia gravis, Krónikus veseelégtelenség	seb/2 minta	**n.v.**		*P. mirabilis* *P. melaninogenica* *B. fragilis* *B. ovatus*
2013.	Sebészet	F	nő	32	Vese- és vese körüli tályog	hasűri punctatum/2 minta	+	027	-
2014.	Belgyógyászat	F	nő	81	Pitvari fibrillatio és flutter	tályog	**n.v.**		*E. coli* *E. faecalis* *A. vaginalis* *B. uniformis*
2014.	Sebészet	F	ffi	68	A bőr és a bőralatti szövetek helyi fertőzései	seb/2 minta	+	198	*P. mirabilis* *E. coli* *E. faecalis* *F. magna* *P. anaerobius* *B. fragilis*
2016.	Bőrgyógyászat	J	nő	80	Az alsó végtag fekélye	felületi seb	+		*P. aeruginosa* *S. dysgalactiae* *P. anaerobius* *Lactobacillus* sp.
2017.	Sebészet	F	ffi	40	A hasnyálmirigy betegsége	hasűri punctatum	+	027	*E. coli* *E. faecium* *S. aureus* *B. vulgatus* *P. merdae*
2017.	Sebészet	F	nő	83	A bőr és a bőralatti szövetek helyi fertőzései	felületi seb	+		*E. faecalis* *F. nucleatum* *C. histolyticum* *A. vaginalis*

n.v.: nem vizsgált

5.2. Vizsgálatok a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek körében

Európai törzsek antibiotikum érzékenységének meghatározása

Az ESCMID-ESGAI által koordinált vizsgálatba 13 országot vontunk be, minden ország 3-103 egymást követő, nem duplikált *Bacteroides/Parabacteroides* nemzetségbe tartozó, 2008. január és 2009. március között izolált **824** releváns klinikai izolátumot küldött laboratóriumunkba. 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 egyéb *Bacteroides/Parabacteroides*-fajt küldtek a laboratóriumok alacsonyabb számban a különböző fertőző folyamatokból származó mintákból. A gyakoribb fajok mellett a *Bacteroides/Parabacteroides* nemzetség újonnan felfedezett tagjai (*B. nordii, B. massiliensis, B. salyersae* és a *Parabacteroides goldsteinii*) is jelen voltak. (A vizsgálatnak ebben a szakaszában, amely az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokra korlátozódott, minden esetben elfogadtuk a beküldő laboratórium identifikálását.)

A β-laktám típusú antibiotikumokkal szembeni rezisztencia adatok

A CLSI és az EUCAST határértékek alapján a vizsgált törzsek 99%-a és 98%-a volt rezisztens az **ampicillin**re, a különböző fajok közötti lényeges különbségek nélkül. Ha a ≥64 mg/l-es határértéket vizsgáltuk, az összes izolátum 44,5%-a bizonyult rezisztensnek. 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. A legmagasabb rezisztencia arányokat a *B. uniformis* törzsek között (30%) és a *P. distasonis* törzsek között (21,4%) találtunk. Jelentős különbségek voltak megfigyelhetőek 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. Kiemelkedően magas volt a rezisztencia aránya a *B. thetaiotaomicron* törzsek esetében és igen jelentős volt a különbség, ha a két különböző határértéket alkalmaztuk (12% vs. 32,5%). Hasonló különbséget találtunk a *P. disasonis* törzsek esetében is, azonban a két különböző határértéket alkalmazva a rezisztencia arányok közötti különbség nem volt ennyire szignifikáns: 14,3% vs. 21,4%. A **cefoxitin** esetében csak CLSI határértékek állnak rendelkezésre: 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%).

Vizsgálataink szerint az összes izolátum kevesebb mint 1%-a és a *B. fragilis* izolátumok 1,2%-a volt csak rezisztens az **imipenem**re. Érdekesség, hogy csak hét *B. fragilis* izolátum, mely öt országból származott (Finnország, Franciaország, Magyarország, Hollandia és Törökország) volt fenotípusosan rezisztens, MIC-értékei ≥16 mg/l (**14. táblázat**), egyéb, non-fragilis fenotípusosan rezisztens izolátumot nem találtunk. Azokat a törzseket (n=15), melyek imipenem MIC értékei 4 és 8 mg/l voltak, mérsékelten érzékeny, vagy "csökkent érzékenységű"

kategóriába soroltuk és ezeket külön is megvizsgáltuk. Ez 15 törzs, együtt a 7 rezisztens izolátummal (n=22) tíz országból származott, egyenlően eloszlott a különböző régiókban, a legtöbb izolátum a tályogok/sebek (n=11) intraabdominalis minták (n=4) és a hemokultúra (n=3) mintákból származott. Más antibiotikummal szembeni rezisztenciát minden imipenem rezisztens-mérsékelten érzékeny törzsben megfigyeltünk és tizenegy izolátum (50%) rezisztens volt több mint két másik hatóanyaggal szemben is, de minden törzs érzékeny volt a metronidazolra és a tigecyclinre. Ezek közül a törzsek közül a CLSI határértéket alkalmazva csak egy törzs volt rezisztens a piperacilin/tazobaktámmal szemben, míg az EUCAST határértékei szerint 12 volt rezisztens. A **15. táblázat** mutatja a különböző antibiotikumok *in vitro* érzékenységi vizsgálatait a 22 imipenem nem érzékeny törzzsel szemben, az EUCAST (csak ahol nem volt elérhető határérték ott a CLSI) aktuális érzékenységi határértékét alkalmazva (az imipenem rezisztencia határértéke ebben a vizsgálati időszakban >8 mg/l volt). Molekuláris diagnosztikai vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy csak egy *cfi*A-negatív *B. fragilis* izolátum (Finn 37) volt fenotípusosan rezisztens imipenemre. A 10 *B. fragilis* törzs közül, amely mérsékelten érzékeny volt imipenemre (MIC 4–8 mg/l), 4 (40%) volt *cfi*A-pozitív, míg a 7 imipenem-rezisztens (MIC ≥ 16 g/mL) *B. fragilis* izolátum közül 6 (85,7%) hordozta a *cfi*A gént. A mérsékelten érzékeny és *cfi*A pozitív törzsek közül egynél (*B. fragilis* IT15), detektáltunk olyan IS elemet, mely upstream és megfelelő orientációban helyezkedett el a *cfi*A génhez képest. A *cfi*A-pozitív és imipenem-rezisztens törzsek közül 4 hordozott IS elemeket upstream a rezisztencia génhez képest, a további 2 *cfi*A-pozitiv, imipenem rezisztens izolátum amelynél nem találtunk altiváló IS elemeket upstream a *cfi*A génhez képest, heterogén rezisztencia fenotípust mutatott az imipenem E-teszt használatával. Valamennyi vizsgált antibiotikum esetében -a tigecyclin kivételével, ahol az imipenem-nem érzékeny izolátumok között nem találtunk rezisztens vagy mérsékelten érzékeny törzset- a rezisztens törzsek aránya szignifikánsan magasabb volt az imipenemre nem érzékeny izolátumok között, mint az imipenem érzékeny törzsek között.

Az egyéb antibiotikumokkal szembeni rezisztencia adatok

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 (**14. táblázat**). A *B. uniformis* és a *B. vulgatus* törzsek voltak a leginkább rezisztensek a clindamycinre (60% vs. 47,6%). Érdekes azonban, hogy az egyébként más antibiotikumokkal szemben magasabb rezisztencia arányokat mutató *P. distasonis* törzsek clindamycinre viszonylag érzékenyek voltak, nem volt különbség a rezisztencia arányukban (28,6%) a *B. fragilis* (28,5%) törzsekétől. A CLSI rezisztencia határérték (≥8 mg/l) alapján az összes izolátum 13,6%-a és *B. fragilis* törzsek 14%-a rezisztenciát mutatott a **moxifloxacin**nal szemben. Itt is feltűnő, hogy a *P. distasonis* és a *B. uniformis* törzsek 100%-ban érzékenyek voltak a moxifloxacinnal szemben, míg a legrezisztensebbek (21,4%) a *B. vulgatus* törzsek voltak. A *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek túlnyomó többsége érzékeny volt a **metronidazol**ra, 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, mindkettőt posztoperatív sebváladékból izolálták, mutatkozott rezisztensnek az EUCAST határértékek alapján (MIC: 8 mg/l, ill. 16

mg/l). Ezeket a metronidazol rezisztens törzseket Horvátországban, Finnországban, Franciaországban és Magyarországon izolálták. A jelen vizsgálatban a 824 törzsből csak 22 olyan volt, amelynek a metronidazol MIC értéke ≥4 mg/l volt (2,7%); ezen törzsek hat országból származtak, országonként egy-kilenc izolátummal. Ezen törzsek más antibiotikumokkal szembeni érzékenységét (hasonlóan az imipenem nem-érzékeny törzsekhez) külön is megvizsgáltuk (**16. táblázat**). Molekuláris diagnosztikai vizsgálatainkkal megállapítottuk, hogy az összes törzs közül csak 3 törzs (*B. fragilis* IT 724 MIC: 1,0 mg/l, *B. fragilis* IT 797 MIC: 0,125 mg/l; és *B. thetaiotaomicron* HU 66 MIC: 256 mg/l) hordozott *nim* géneket. A két olasz törzs: *B. fragilis* IT797 és az IT724 kromoszómális *nim*A és *nim*C géneket hordozott, míg a szegedi törzs (HU 66) *nim*E gént hordozott, ami egy 8,3 kb (pBF388c-like) plazmidon helyezkedett el és egy ISBf6 elem aktiválta. A két olasz törzsben nem találtunk *nim*-specifikus plazmidokat (egy 5,6 kb class III plazmid volt a *B. fragilis* IT797 törzsben és nem volt plazmid az IT724 törzsben). A *B. fragilis* IT797 két inszerciós szekvencia elemet (IS*1168* és IS*1170*) tartalmazott, azonban ezeket az IS elemeket nem lehetett PCR-el feltérképezni a *nim*A génekhez képest a megfelelő orientációban és helyzetben. Feltehető, hogy a többi, metronidazol nem érzékeny törzsben egyéb, más rezisztencia mechanizmus felelős a metronidazol mérsékelten érzékenységért, illetve rezisztenciáéert.

Szembetűnő, hogy míg a rezisztens törzsek aránya szignifikánsan magasabb volt az imipenemre nem érzékeny törzsek között, addig a 22 metronidazolra nem érzékeny izolátum közül mindössze hat (27,2%) olyan volt, amely több mint két másik antibiotikummal szemben is rezisztens volt. A metronidazollal szemben csökkent érzékenységű valamennyi izolátum érzékeny volt a tigecyclinre és egy kivételével az imipenemre (**15. táblázat**). Egy törzs rezisztensnek bizonyult mind a metronidazolra (MIC 16 mg/l), mind az imipenemre (MIC 32 mg/l) nézve az EUCAST határértékek szerint.

A **tigecyclin** esetében az EUCAST még nem határozott meg határértékeket a vizsgálat végzése idején, így az értékeléshez a CLSI határértékeket használtuk. 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%. A *B. uniformis* törzsek (n=10) közül egy volt rezisztens, ez a statisztika alapján 10%, azonban a kis mintaszám miatt nem tartom relevánsnak az értékelését. A *B. thetaiotaomicron* és a *P. distasonis* törzek között 100%-os volt a tigecyclin érzékenység.

14. táblázat: A vizsgált törzsek (n=824) részletes rezisztencia adatai a kilenc vizsgált antibiotikummal szemben

(Speciesek-szerinti megoszlás, különbségek a CLSI és EUCAST határértékek alkalmazásával)

Antibiotikum	**Törzsek száma**	**MIC (mg/l)**			**Rezisztens % (mg/l)**	
		Tartomány	**MIC_{50}**	**MIC_{90}**	**CLSI**	**EUCAST**
Ampicillin					**≥2**	**>2**
Összes törzs	824	1–>256	32	>256	99,2	98,2
B. fragilis	600	1–>256	32	>256	99,0	97,4
B. thetaiotaomicron	83	2–>256	64	>256	100	98,8
B. ovatus	49	8–>256	64	>256	100	100
B. vulgatus	42	4–>256	64	>256	100	100
P. distasonis	14	8–>256	16	>256	100	100
B. uniformis	10	16–>256	32	>256	100	100
Egyéb speciesek	26	4–>256	64	>256	100	100
Amoxi/klavulánsav					**≥16**	**>8**
Összes törzs	824	0,016–>256	1	16	10,4	
B. fragilis	600	0,016–>256	1	16	8,7	
B. thetaiotaomicron	83	0,125–32	1	16	12,0	
B. ovatus	49	0,25–32	1	16	18,4	
B. vulgatus	42	0,125–256	1	16	14,3	
P. distasonis	14	0,5–256	2	32	21,4	
B. uniformis	10	0,125–64	1	64	30,0	
Egyéb speciesek	26	0,125–64	2	16	11,5	
Piperacillin/tazobaktám					**≥128**	**>16**
Összes törzs	824	0,016–>256	4	32	3,1	10,3
B. fragilis	600	0,016–>256	2	16	1,7	6,5
B. thetaiotaomicron	83	0,125–>256	16	128	12,0	32,5
B. ovatus	49	0,25–32	8	32	0	14,2
B. vulgatus	42	0,25–256	8	32	4,8	14,3
P. distasonis	14	2–256	8	64	14,3	21,4
B. uniformis	10	0,5–256	4	16	10,0	10,0
Egyéb speciesek	26	0,125–64	8	16	15,4	46,1
Cefoxitin					**≥64**	**nincs hé.**
Összes törzs	824	1–>256	16	128	17,2	–
B. fragilis	600	1–>256	16	256	13,7	–
B. thetaiotaomicron	83	2–>256	32	256	27,1	–
B. ovatus	49	1–256	32	256	24,5	–
B. vulgatus	42	1–>256	8	64	14,3	–
P. distasonis	14	8–>256	32	>256	35,7	–
B. uniformis	10	2–256	8	256	20,0	–
Egyéb speciesek	26	2–>256	16	>256	26,9	–
Antibiotikum	**Törzsek száma**	**MIC (mg/l)**			**Rezisztens % (mg/l)**	
		Tartomány	**MIC_{50}**	**MIC_{90}**	**CLSI**	**EUCAST**
Imipenem					**≥16**	**>8**
Összes törzs	824	0,002–>32	0,5	1	0,85	
B. fragilis	600	0,002–>32	0,25	0,5	1,2	
B. thetaiotaomicron	83	0,047–8	0,25	1	0	
B. ovatus	49	0,016–2	0,25	1	0	
B. vulgatus	42	<0,125–2	0,125	0,5	0	
P. distasonis	14	0,125–2	0,5	1	0	
B. uniformis	10	0,125–2	0,125	1	0	
Egyéb speciesek	26	0,012–8	0,5	4	0	
Clindamycin					**≥8**	**>4**
Összes törzs	824	0,016–>256	2	>256	32,4	
B. fragilis	600	0,016–>256	1	256	28,5	
B. thetaiotaomicron	83	0,047–>256	4	>256	42,2	
B. ovatus	49	0,125–>256	4	>256	44,9	
B. vulgatus	42	0,016–>256	2	>256	47,6	
P. distasonis	14	0,016–>256	1	>256	28,6	

B. uniformis	10	1–256	8	256	60,0	
Egyéb speciesek	26	0,047–256	2	256	34,6	
Moxifoxacin					**≥8**	nincs hé.
Összes törzs	824	<0,125–32	1	16	13,6	–
B. fragilis	600	<0,125–64	0,5	8	14,0	–
B. thetaiotaomicron	83	0,125–32	1	16	14,5	–
B. ovatus	49	<0,125–32	1	4	8,2	–
B. vulgatus	42	<0,125–64	1	32	21,4	–
P. distasonis	14	<0,125–2	0,5	1	0	–
B. uniformis	10	<0,125–4	1	4	0	–
Egyéb speciesek	26	<0,125–32	0,25	4	11,5	–
Metronidazol					**≥32**	**>4**
Összes törzs	824	0,016–256	0,5	1	0,25	0,5
B. fragilis	600	0,016–32	0.5	1	0,2	0,5
B. thetaiotaomicron	83	<0,125–>256	0.5	2	1,2	1,2
B. ovatus	49	0,032–2	0.5	2	0	0
B. vulgatus	42	<0,125–4	0.5	1	0	0
P. distasonis	14	0,125–2	0.5	1	0	0
B. uniformis	10	0,016–2	0.5	1	0	0
Egyéb speciesek	26	<0,125–4	0.5	2	0	0
Tigecyclin					**≥16**	nincs hé.
Összes törzs	824	0,016–32	0,25	2	1,7	–
B. fragilis	600	0,016–32	0,5	2	1,8	–
B. thetaiotaomicron	83	0,06–8	0,25	0,5	0	–
B. ovatus	49	0,032–16	0,25	2	2,0	–
B. vulgatus	42	<0,125–16	2	4	4,8	–
P. distasonis	14	0,125–4	0,5	2	0	–
B. uniformis	10	0,016–16	0,125	1	10	–
Egyéb speciesek	26	0,047–8	0,25	1	0	–

Piros színnel jelölve: Rezisztencia határértékek (A vizsgálat idején érvényes határértékek)
Nincs hé: Nincs EUCAST határérték az adott antibiotikumra a vizsgálat időszakában.

15. táblázat: Az **imipenem** rezisztens és mérsékelten érzékeny (MIC: 4 mg/l->32 mg/l) rendelkező *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek egyéb antibiotikumokkal szembeni MIC értékei, *cfi*A gén hordozása

Ország/ sorszám	**Törzs/minta**	**MIC mg/l**									
		AMP	**AMOX/ CLAV**	**PIP/ TAZ**	**CFX**	**IMI**	***cfi*A**	**CLIN**	**MOXI**	**MTZ**	**TIGE**
Svéd 42	*B. fragilis*/hemokultúra	**32**	8	16	16	4	-	1	<0,125	0,25	0,5
Svéd 46	*B. fragilis*/seb	**>256**	**16**	2	**256**	4	-	2	**16**	1	1
Svéd 83	*B. fragilis*/hemokultúra	**8**	4	32	32	4	-	0,5	0,25	0,25	0,5
Finn 63	*B. fragilis*/seb	**>256**	4	4	**>256**	4	-	0,25	0,5	0.5	1
Finn 37	*B. fragilis*/tályog	**>256**	0,5	**>256**	**>256**	**>32**	**+**	**>256**	0,5	1	1
Finn 87	*B. fragilis*/seb	**>256**	**64**	32	**>256**	**>32**	**+**	8	0,25	1	0,25
Hollandia H3	*B. fragilis*/hasűri	**>256**	**>32**	>32	**64**	**>32**	**+**	0,25	4	0,5	0,125
Belgium M28	*B. thetaiotaomicron*/ni	**>256**	**16**	64	**64**	4	-	0,5	0,5	0,125	<0,125
Belgium A22	*B. thetaiotaomicron*/ni	**>256**	**32**	>32	**64**	8	-	2	**32**	2	2
Németo. 14	*B. fragilis*/genitális	1	1	<0,125	**64**	4	**+**	<0,125	0,125	2	0,125
Olaszo. 15	*B. fragilis*/hasűri	**16**	**16**	32	**64**	4	**+**	1	4	0,25	0,25
Töröko. 38	*B. fragilis*/tályog	**4**	1	2	**>256**	4	-	4	1	1	0,25
Töröko. 27	*B. fragilis*/tályog	**64**	**32**	64	**64**	**16**	**+**	0,125	<0,125	0,25	<0,125
Töröko. 31	*B. fragilis*/tályog	**32**	**16**	64	32	**16**	**+**	0,125	<0,125	0,25	<0,125
Görögo. 67	*B. eggerthii*/hemokultúra	**>256**	**>32**	64	**64**	4	**-**	**>32**	**16**	<0,125	<0,125
Görögo. 70	*P. merdae*/tályog	**4**	2	32	32	4	**-**	**8**	0,25	0,25	0,5
Franciao. 9	*B. fragilis*/seb	**8**	4	4	**256**	**32**	**+**	0,125	0,25	**16**	0,125
Magyaro. 25	*B. fragilis*/hasűri	**>256**	**>256**	32	**256**	4	**-**	**256**	**>32**	2	2
Magyaro. 51	*B. fragilis*/respirat. trakt	**64**	0,5	1,5	32	4	**+**	2	0,25	2	2
Magyaro. 92	*B. fragilis*/hasűri	**32**	4	8	**>256**	8	**+**	**8**	0,25	1	1
Magyaro. 59	*B. stercoris*/hasűri	**64**	8	16	16	8	-	<0,125	0,125	2	<0,125
Magyaro. 61	*B. fragilis*/seb	**256**	0,5	2	4	**32**	**+**	8	0,125	1	0,25

ni: nem ismert, **Vastagon szedett**: rezisztens az alkalmazott EUCAST, vagy CLSI határértékei alapján (3. táblázat)

16. táblázat: A **metronidazol** rezisztens és mérsékelten érzékeny (MIC: 4 mg/l->32 mg/l) *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek egyéb antibiotikumokkal szembeni MIC értékei

Ország	**Törzs/ származási hely**	**MIC (mg/l)**								
		AMP	**AMOX/ KLAV**	**PIP/TAZ**	**CFX**	**IMI**	**CLIN**	**MOX**	**MTZ**	**TIG**
Finn 1	*B. fragilis*/ abdominális	**>256**	1	0,5	8	1	1	0,5	4	0,06
Finn 17	*B. fragilis*/abdominális	**>256**	2	0,125	4	0,125	0,25	0,25	4	0,125
Finn 46	*B. fragilis*/anális sebv.	**>256**	4	1	4	0,5	1	2	4	0,25
Finn 57	*B. fragilis*/abdominális	**>256**	0,5	2	**64**	0,06	**>256**	1	**32**	0,125
Németo. 13	*B. fragilis*/sebváladék	**32**	2	1	32	0,5	2	**>32**	4	1
Németo. 25	*B. fragilis*/légúti	**2**	2	4	16	0,125	4	0,25	4	1
Németo. 37	*B. fragilis*/abdominális	**256**	2	**256**	**>256**	0,125	4	2	4	0,5
Belgium M16	*B. fragilis*/hc	**64**	4	4	**8**	0,25	**>256**	**8**	4	1
Franciao. 9	*B. fragilis*/seb	**8**	4	4	**256**	**32**	0,125	0,25	**16**	0,125
Franciao. 4	*B. fragilis*/abdominális	**32**	1	0,25	**256**	0,125	1	0,25	4	0,25
Franciao. 6	*B. fragilis*/légúti	**>256**	8	2	8	0,25	0,25	0,5	4	0,25
Franciao. 22	*B.thetaiotaomicron*/tályog	**32**	1	0,25	2	0,25	0,25	0,5	4	0,125
Magyaro. 22	*B. fragilis*/abdominális	**128**	2	8	**256**	0,5	**8**	**>32**	4	2
Magyaro. 23	*B. fragilis*/genitális női	**>256**	**32**	64	**256**	0,5	**16**	2	4	0,5
Magyaro. 29	*B. fragilis*/tályog	**64**	0,125	4	16	0,25	4	1	4	0,25
Magyaro. 31	*B. fragilis*/abdominális	**32**	0,125	2	16	0,25	1.5	0,25	4	1
Magyaro. 41	*B. fragilis*/abdominális	**32**	0,125	4	8	0,25	1	0,25	4	0,5
Magyaro. 32	*B. fragilis*/abdominális	**16**	1	16	8	0,5	4	0,25	4	1
Magyaro. 38	*B. stercoris*/abdominális	**32**	0,125	0,25	32	<0,125	1	0,125	4	0,25
Magyaro. 14	*B. vulgatus*/genitális női	**32**	1	4	16	0,25	0,06	4	4	8
Magyaro. 66	*B. thetaiotaomicron*/hc	**16**	2	0,06	2	0,06	**16**	0,5	**256**	0,125
Horváto. 4	*B. fragilis*/sebváladék	**8**	0,5	1	4	<0,125	**64**	0,5	**8**	0,5

Vastagon szedett: rezisztens az alkalmazott EUCAST, vagy CLSI határértékek alapján (3. táblázat)

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. A Spanyolországra vonatkozó adatokat külön nem értékeltük, mivel túl kevés számú törzset küldtek, így az arányok statisztikailag nem relevánsak. A különböző országok által gyűjtött törzsek száma közötti különbségek ellenére a vizsgált törzsek száma megközelítőleg hasonló volt a négy földrajzi területen (182 és 248 között).

Az ampicillinnel szembeni rezisztenciában nem volt különbség az országok és régiók között. Az amoxicillin/klavulánsav rezisztenciája változó volt: Franciaország 2%-tól Belgium 18,5%, 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 regionális adatok leginkább kifejezett különbségeit a **clindamycin** rezisztencia adatok esetében figyeltük meg, ahol a legmagasabb rezisztenciát a mediterrán régióban (41,9%) találtunk, ezek között is kiemelkedően magas volt a rezisztencia aránya Törökországban (52,9%) és Görögországban (50,7%). Ezeket a keleti országok követték összességében 29,7%-os rezisztencia aránnyal, azonban itt jelentős különbségek voltak, míg Csehország csak 17,6%, addig Horvátországban 44,6% volt a rezisztens törzsek aránya. A két másik régiónak viszonylag alacsonyabb rezisztencia értékei (22,5% vs. 23,2%) voltak és nem is volt szignifikáns különbség az egyes országok rezisztencia adatai között. Míg a skandináv-, nyugati- és a Keleti régiók rezisztencia adatai hasonlóak voltak, addig a mediterrán régió országaiban kiemelkedően magas volt a clindamycin rezisztencia aránya.

A **moxifloxacin** rezisztencia is jelentősen változott a különböző régiókban és az ezeket alkotó országok között is, a két szélső érték: 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 összességében 21,4% (azonban jelentős különbséget figyeltünk meg a két ország, Finnország és Svédország között 12,9% vs. 28,9%) volt, a mediterrán régióban pedig csak 5,4%.

Alacsony rezisztencia értékeket találtunk minden régióban az **imipenem** esetében, több ország esetében is a rezisztens törzsek aránya 0% volt, azonban 5,8% rezisztencia arányt találtunk Törökországban (bár a törzsek száma alacsony volt), 3,1%-ot Hollandiában és 2,4%-ot Finnországban. A keleti régió országaiban izolált törzsek között (n=248) csak egy magyarországi imipenem rezisztens törzset találtunk.

A vizsgált törzsek még megtartották érzékenységüket a metronidazollal és a tigecyclinnel szemben, bár a tigecyclin rezisztencia meghaladta a 4%-ot Németországban és Olaszországban (**17. táblázat**).

17. táblázat: A vizsgált európai *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek országok/régiók közötti antibiotikum rezisztencia arányai

Ország Régió	Törzsek száma	A rezisztens törzsek aránya (%)								
		AMP	AMOX/ KLAV	PIP/ TAZ	FOX	IMI	CLIN	MOX	MTZ	TIG
Határértékek		**>2**	**>8**	**>16**	**≥64**	**>8**	**>4**	**≥8**	**>4**	**≥16**
Finn	85	100	5,9	12,9	30,6	2,4	23,5	12,9	1,2	1,2
Svédország	97	100	11,3	19,6	21,7	0	21,7	28,9	0	0
Skandináv	**182**	**100**	**8,8**	**16,5**	**25,8**	**1,1**	**22,5**	**21,4**	**0,6**	**0,6**
Hollandia	32	100	3,1	3,1	3,1	3,1	21,9	6,2	0	0
Belgium	103	97,1	18,5	9,7	6,8	0	26,2	17,5	0	2,9
Németország	72	88,9	2,8	7,0	27,8	0	19,5	16,7	0	4,2
Nyugati	**207**	**94,2**	**10,6**	**8,7**	**13.5**	**0,5**	**23,2**	**15,5**	**0**	**2,4**
Spanyolország	3	66,6	33,3	33,3	33,3	0	0	33,3	0	0
Franciaország	51	100	2,0	3,9	19,9	2,0	31,4	3,9	2,0	0
Görögo	75	98,7	17,3	13,3	16,0	0	50,7	6,7	0	2,7
Olaszország	23	95,6	8,7	17,4	8,7	0	21,7	0	0	4,3
Törökország	34	100	17,6	8,8	14,7	5,8	52,9	8,8	0	0
Mediterrán	**186**	**96,8**	**12,4**	**11,8**	**16,2**	**1,6**	**41,9**	**5,4**	**0,5**	**1,6**
Horvátország	56	98,2	8,8	3,5	5,3	0	44,6	7,0	1,8	0
Cseh Közt.	91	100	3,3	6,9	8,9	0	17,6	13,2	0	1,1
Magyarország	100	100	15	12	24	1	27	12	1	2
Keleti	**248**	**99,6**	**9,3**	**8,1**	**14,1**	**0,4**	**29,7**	**11,3**	**0,8**	**1,2**

AMP: ampicillin; AMOX/KLAV: amoxicillin/klavulánsav; PIP/TAZ: piperacillin/tazobactam; FOX: cefoxitin; IMI: imipenem; CLIN: clindamycin; MOX: moxifloxacin; MTZ: metronidazol; TIG: tigecyclin

Magyarországi törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálatai

A vizsgált **négyszáz** magyarországi *Bacteroides* klinikai izolátumból az előző tanulmányokhoz hasonlóan a törzsek többsége *B. fragilis* (58,3%) volt, ezt követte a *B. thetaiotaomicron* (19,8%), a *B. vulgatus* (6,5%), a *B. ovatus* (6%), a *P. distasonis* (3,8%) és a *B. uniformis* (2,8%), egyéb *Bacteroides* fajokat is izoláltunk kisebb arányban: *B. caccae, B. nordii, B. salyersiae, B. stercoris, B. cellulosilyticus, B. intestinalis* és *P. goldsteinii* (0,3-1%, összesen: 2,8%). A törzsek többsége sebváladékból (44,8%) és hasűri mintából (42,7%) származott, az extraabdominális tályogok és a hemokultúrák kisebb arányt képviseltek (3,8%, illetve 4,2%). Egyéb mintatípusok (nőgyógyászati, krónikus otitis media, krónikus sinusitis, liquor, pericardiális folyadék) jóval alacsonyabb arányban fordultak elő (0,25-0,75%, összesen: 4,5%). A minták felét a sebészet, 12,7%-át az intenzív osztály, 12,5%-át a belgyógyászat, 5,8%-át a szülészet-nőgyógyászat, a többit egyéb osztályok és háziorvosok küldték (1-4,5%).

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredményeit, a MIC tartományokat, a MIC_{50} és MIC_{90} értékeket a **18. táblázat** mutatja be. Az alkalmazott határértékek az aktuális EUCAST határértékek voltak, a cefoxitin, moxifloxacin és tigecyclin esetében, mivel nincsenek EUCAST határértékek, a CLSI határértékeit alkalmaztuk. A törzsek 98%-a volt rezisztens **ampicillin**re, viszont mindössze 4,5%-a mutatott rezisztenciát **amoxicillin/klavulánsav**val szemben. A **cefoxitin** rezisztencia aránya 6,75%-os volt, míg a **meropenem**mel és **clindamycin**nel szemben az izolátumok viszonylag magas aránya: 7%-a, illetve 36,5%-a volt rezisztens. A metronidazol kiemelkedő aktivitást mutatott: csupán egy **metronidazol** rezisztens törzset találtunk. A **moxifloxacin** rezisztencia aránya 18,5%-os volt; CLSI határértékei alapján 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. A chloramphenicol kiváló aktivitást mutatott: az izolátumok 99,5%-a érzékeny volt és rezisztens törzset nem találtunk. Az alábbi antibiotikumpárok között találtunk szignifikáns összefüggést ($p<0,05$) a rezisztencia előfordulás viszonylatában: ampicillin és amoxicillin/klavulánsav; cefoxitin és amoxicillin/klavulánsav; valamint tetracyclin és tigecyclin. Statisztikai összehasonlítást végeztünk az antibiotikum érzékenységi adatok és a klinikai mintatípusok között is, de nem találtunk szignifikáns összefüggést (szignifikancia határa: $p<0,05$).

A különböző antibiotikumokkal szembeni rezisztencia faj szerinti vizsgálatát tekintve ampicillinnel szemben a *Bacteroides/Parabacteroides* 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 feltűnően magas aránya: 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 vizsgálatban résztvevő centrumok antibiotikum érzékenységi adatait a **19. táblázatban** láthatók. A magasszintű ampicillin rezisztenciát mutató törzsek (≥64 mg/l) aránya centrumonként jelentős eltérést mutatott: 1-es (SE) és 4-es (SZTE) centrum ($p<0,001$); 2-es (Synlab) és 4-es ($p<0,001$); valamint a 3-as (DEOEC) és 4-es (SZTE) ($p=0,002$) centrum között. A cefoxitin rezisztencia esetén szintén jelentős különbség volt tapasztalható a debreceni (3%) és szegedi (13,0%) izolátumok ($p<0,001$) 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. ovatust* is a 4-es centrumban (Szeged) izoláltuk. Az összes meropenem rezisztens *B. fragilis* izolátum MALDI-TOF MS speciális szoftvere segítségével megállapítottuk, hogy Divízió II-be tartoznak és mindegyik esetben bizonyítottuk RT-PCR módszerre, hogy a *cfi*A gént hordozták (lásd Eredmények: következő fejezet). A szegedi centrumban 11 magasszintű meropenem rezisztenciát (MIC ≥16 mg/l) mutató törzset találtunk, valamint egy-egy *cfi*A-pozitív *B. fragilis* meropenem MIC értéke 4, illetve 8 mg/l volt (**20. táblázat**). Más centrumokban a meropenem rezisztencia jóval alacsonyabb arányú volt (4-7%), de jelentős szignifikáns különbség a budapesti SE és a szegedi izolátumok rezisztencia arányai 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%) ($p=0,003$). A tetracyclin rezisztens törzsek legnagyobb arányban az 1-es (63%) és a 4-es (74%) centrumból származó mintákból tenyésztek ki, de a különbség nem volt szignifikáns ($p=0,003$). Nem volt a centrumok között szignifikáns különbség a moxifloxacin rezisztencia arányaiban sem, ez 16-22% között mozgott, chloramphenicolra csak 2 mérsékelten érzékeny törzset találtunk az összes izolátum között, ezek a 2-es centrumból származtak.

18. táblázat: A magyarországi *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek (n=400) antibiotikum érzékenységi adatai

Antibiotikumok	**MIC (mg/l)**			**Izolátumok aránya (%)**		
	Tartomány	**MIC_{50}**	**MIC_{90}**	**É**	**M**	**R**
Összes törzs n=400						
Ampicillin	0,5->256	64	>256	0,75	1,25	98
Amox/klavulánsav	0,064-32	0,5	8	87	8,5	4,5
Cefoxitin	0,5-256	8	32	77	16,2	6,75
Meropenem	0,064-32	0,5	4	88,75	4,25	7
Clindamycin	0,064->256	2	>256	63,25	0	36,75
Metronidazol	0,064-16	0,5	1	99,75	0	0,25
Moxifloxacin	0,064-64	1	8	75	6,5	18,5
Tetracyclin	0,125-256	16	64	28,75	6	65,25
Tigecyclin	0,064-64	0,5	4	94,75	3,75	1,5
Chloramphenicol	0,125-16	4	8	99,5	0,5	0
***B. fragilis* (n=233)**						
Ampicillin	2-512	64	>256	0	0	100
Amox/klavulánsav	0,064-32	0,5	4	91,87	6,43	1,7
Cefoxitin	1-256	8	16	90,56	6	3,44
Meropenem	0,064-32	0.5	8	84,98	5,15	9,87
Clindamycin	0,064->256	1	>256	74,25	0	25,75
Metronidazol	0,125-4	0,5	1	100	0	0
Moxifloxacin	0,125-64	0,5	8	76,4	8,15	15,45
Tetracyclin	0,125-256	32	64	25,75	3	71,25
Tigecyclin	0,064-32	0,5	4	94,85	4,3	0,85
Chloramphenicol	0,25-8	4	8	100	0	0
B. thetaiotaomicron						
Ampicillin	0,5-512	128	>256	1,27	0	98,73
Amox/klavulánsav	0,064-32	0,25	8	83,54	13,9	2,53
Cefoxitin	0,5-256	16	32	53,16	37,9	8,87
Meropenem	0,125-32	1	2	92,41	6,33	1,26
Clindamycin	0,064->256	8	>256	44,3	0	55,7
Metronidazol	0,064-4	0,5	1	100	0	0
Moxifloxacin	0,064-32	1	16	75,96	5,06	18,98
Tetracyclin	0,125-256	16	64	40,51	5,06	54,43
Tigecyclin	0,064-64	0,5	4	94,94	3,8	1,26
Chloramphenicol	0,125-16	4	8	98,74	1,26	0
***B. vulgatus* (n=26)**						
Ampicillin	4-512	128	>256	0	0	100
Amox/klavulánsav	0,125-16	1	16	69,23	23,0	7,7
Cefoxitin	0,5-128	4	64	80,76	7,69	11,55
Meropenem	0,125-32	1	4	84,62	11,5	3,84
Clindamycin	0,064->256	4	>256	50	0	50
Metronidazol	0,125-2	0.5	1	100	0	0
Moxifloxacin	0,25-64	2	32	50	0	50
Tetracyclin	0,125-64	16	64	19,24	7,69	73,07
Tigecyclin	0,064-8	0,25	2	96,16	3,84	0
Chloramphenicol	0,5-8	4	8	100	0	0

Antibiotikumok	MIC (mg/l)			Izolátumok aránya (%)		
	Tartomány	MIC_{50}	MIC_{90}	É	M	R
***B. ovatus* (n=24)**						
Ampicillin	0,5-512	256	>256	8,33	0	91,67
Amox/klavulánsav	0,064-32	2	16	79,1	12,5	8,33
Cefoxitin	2-128	32	64	41,6	41,67	16,66
Meropenem	0,125-32	1	16	75	8,34	16,66
Clindamycin	0,064->256	8	>256	45,8	0	54,17
Metronidazol	0,125-8	0,5	2	95,8	0	4,17
Moxifloxacin	0,25-32	1	32	79,1	0	20,84
Tetracyclin	0,125-32	8	32	29,1	20,84	50
Tigecyclin	0,064-8	0,25	4	95,8	4,16	0
Chloramphenicol	2-8	8	8	100	0	0
***P. distasonis* (n=15)**						
Ampicillin	8->256	>256	>256	0	0	100
Amox/klavulánsav	0,125-32	4	16	53,33	20	26,67
Cefoxitin	2-128	16	128	60	20	20
Meropenem	0,25-4	0,5	4	86,67	13,33	0
Clindamycin	0,5->256	4	>256	66,67	0	33,33
Metronidazol	0,25-2	0,5	1	100	0	0
Moxifloxacin	0,25-2	0,5	1	100	0	0
Tetracyclin	0,25-32	16	32	20	20	60
Tigecyclin	0,125-4	0,5	2	100	0	0
Chloramphenicol	4-8	8	8	100	0	0
***B. uniformis* (n=11)**						
Ampicillin	32->256	128	>256	0	0	100
Amox/klavulánsav	0,125-2	0,25	2	100	0	0
Cefoxitin	1-64	8	32	81,8	9,1	9,1
Meropenem	0,25-4	0,5	1	90,9	9,1	0
Clindamycin	0,064->256	>256	>256	45,45	0	54,55
Metronidazol	0,125-0.5	0,5	1	100	0	0
Moxifloxacin	0,5-32	0,25	1	72,72	9,1	18,18
Tetracyclin	0,125-32	8	32	54,55	18,18	27,27
Tigecyclin	0,064-2	0,5	2	100	0	0
Chloramphenicol	4-8	8	8	100	0	0
Egyéb *Bacteroides* sp.*						
Ampicillin	2->256	64	64	0	0	100
Amox/klavulánsav	0,125-4	0,5	4	100	0	0
Cefoxitin	1-64	16	32	41,67	41,67	16,67
Meropenem	0,125-2	0,5	1	100	0	0
Clindamycin	0,125->256	4	>256	41,67	0	58,33
Metronidazol	0,125-2	0,5	1	100	0	0
Moxifloxacin	0,064-64	2	16	66,67	8,33	25
Tetracyclin	0,25-128	16	128	16,67	8,33	75
Tigecyclin	0,125-32	0,25	16	75	0	25
Chloramphenicol	0,25-16	4	8	91,67	8,33	0

**B. stercoris* (1), *B. cellulosilyticus* (1), *B. caccae* (4), *B. intestinalis* (1), *B. salyersiae* (2), *B. nordii* (2), *P. goldsteinii* (1)
Amo/klavulánsav: amoxicillin/klavulánsav
É: érzékeny; M: mérsékelten érzékeny; R: rezisztens
Alkalmazott határértékek: lásd **3. táblázat**.

19. táblázat: A különböző magyar centrumokban izolált *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek antibiotikum érzékenységének adatai

Antibiotikumok	MIC (mg/l) tartomány	Izolátumok aránya (%)		
		É	M	R
1. CENTRUM (n=100)				
Ampicillin	4-512	0	5	95
Amox/klavulánsav	0,064-16	92	5	3
Cefoxitin	1-128	77	16	7
Meropenem	0,125-32	95	1	4
Clindamycin	0,125->256	52	0	48
Metronidazol	0,125-4	100	0	0
Moxifloxacin	0,25-32	71	7	22
Tetracyclin	0,125-128	31	6	63
Tigecyclin	0,125-32	89	7	4
Chloramphenicol	0,25-8	100	0	0
2. CENTRUM (n=100)				
Ampicillin	0,5-512	1	0	99
Amox/klavulánsav	0,064-32	89	9	2
Cefoxitin	1-128	77	19	4
Meropenem	0,25-32	92	3	5
Clindamycin	0,064->256	63	0	37
Metronidazol	0,064-4	100	0	
Moxifloxacin	0,125-32	72	9	19
Tetracyclin	0,125-256	27	10	63
Tigecyclin	0,064-16	97	1	2
Chloramphenicol	2-16	98	2	0
3. CENTRUM (n=100)				
Ampicillin	0,5->256	2	0	98
Amox/klavulánsav	0,125-32	89	8	3
Cefoxitin	0,5-128	80	17	3
Meropenem	0,125-32	87	6	7
Clindamycin	0,064->256	73	0	27
Metronidazol	0,064-16	99	0	1
Moxifloxacin	0,125-64	78	5	17
Tetracyclin	0,25-128	35	4	61
Tigecyclin	0,064-8	99	1	0
Chloramphenicol	0,125-8	100	0	0
4. CENTRUM (n=100)				
Ampicillin	16->256	0	0	100
Amox/klavulánsav	0,5-16	77	14	6
Cefoxitin	1-256	74	13	13
Meropenem	0,064-32	81	7	12
Clindamycin	0,064->256	65	0	35
Metronidazol	0,125-4	100	0	0
Moxifloxacin	0,25-64	79	5	16
Tetracyclin	0,125-128	22	4	74
Tigecyclin	0,064-8	95	5	0
Chloramphenicol	4-8	100	0	0

1. CENTRUM: Semmelweis Egyetem, Budapest; 2. CENTRUM: SYNLAB Kft., Budapest;
3. CENTRUM: Debreceni Egyetem; 4. CENTRUM: Szegedi Tudományegyetem
Amox/klavulánsav: amoxicillin/kalvulánsav
É: érzékeny; M: mérsékelten érzékeny; R: rezisztens
Alkalmazott határértékek: lásd **3. táblázat**.

20. táblázat: A *cfi*A-pozitív és –negatív *B. fragilis* törzsek meropenem MIC értékei és a nem-fragilis *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek meropenem MIC értékei a különböző centrumokban

EUCAST határértékek: Érzékeny: ≤2mg/l; Rezisztens: >8 mg/l

	Meropenem MIC (mg/l)	**1. CENTRUM**		**2. CENTRUM**		**3. CENTRUM**		**4. CENTRUM**	
		Törzs szám	**MALDI Divízió**	**Törzs szám**	**MALDI Divízió**	**Törzs szám**	**MALDI Divízió**	**Törzs szám**	**MALDI Divízió**
cfi*A-pozitív *B. fragilis	**≥16**	**1**	**II**	**2**	**II**	**3**	**II**	**11**	**II**
	8							1	II
	4							1	II
	<4	1	II						
cfi*A-negatív *B. fragilis	**≥16**	**2**	**I**	**3**	**I**	**2**	**I**		
	8								
	4								
	<4								
Nem fragilis *Bacteroides* sp.	**≥16**						**I**	**1****	**I**
	8								
	4								
	<4								

**B. ovatus, B. thetaiotaomicron* ***B. ovatus*
Vastagon szedve: fenotípusosan rezisztens

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

Az előző fejezetben bemutattam, hogy az általunk 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 *bex*A gént RT-PCR módszerrel (**8. ábra**) a 400 törzsből 82 esetében tudtuk kimutatni (20,5%), 79,5%-a a törzseknek nem hordozta ezt a gént (**21. táblázat**). A *bex*A gén prevalenciája szignifikánsan magasabb volt (p=0,002) a NFB törzsek között, mit a *B. fragilis* izolátumokban (**21. táblázat**). Legmagasabb előfordulási arányt a *B. thetaiotaomicron* törzsek között találtunk (80,1%), míg mind a *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 NBF törzsek között ez az arány 38,9% volt. Érdekes megfigyelés, hogy a moxifloxacin érzékeny NFB törzsek 42,4%-a (50/118) hordozta a *bex*A gént; míg a moxifloxacin érzékeny *B. fragilis* törzseknek csak 6,04%-a (11/182) (**23. táblázat**). Nem találtunk a moxifloxacinra mérsékelten érzékeny törzsek között *bex*A gén hordozót, míg ez az arány a moxifloxacinra mérsékelten érzékeny nem-fragilis törzsek között 62,5% volt: 8-ból 5 törzs hordozta a gént.

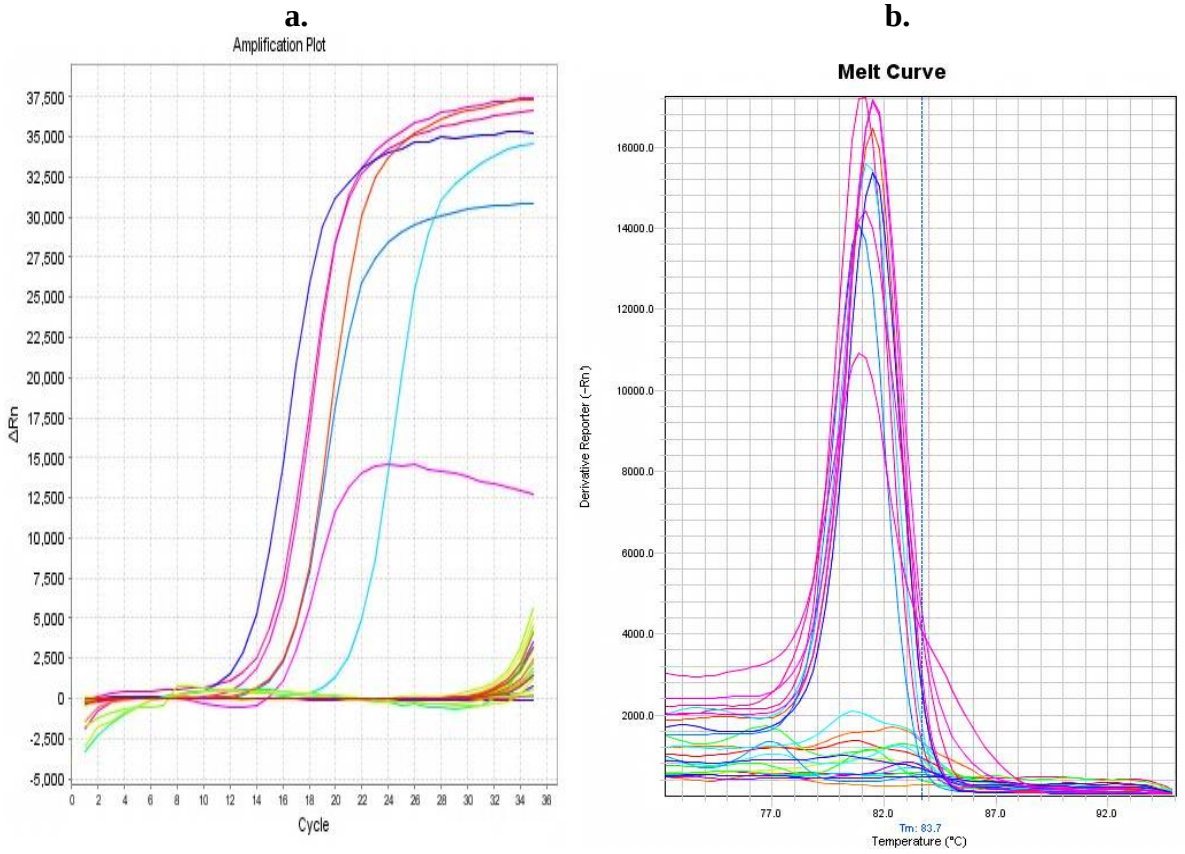
21. táblázat: A *bex*A gén megoszlása a vizsgált *Bacteroides/Parabacteroides* fajokon (n=400) belül

Species	**Törzsek száma**	***bex*A pozitív törzsek száma**	***bex*A negatív törzsek száma**
B. fragilis	238	13 (5,5%)	225
B. thetaiotaomicron	73	**59 (80,1%)**	14
B. ovatus	28	4 (14,3%)	24
B. vulgatus	26	2 (7,7%)	24
B. uniformis	14	2 (14,3%)	12
P. distasonis	11	1 (10%)	10
Egyéb *Bacteroides* fajok	10	1 (10%)	9
Összesen	**400 (100%)**	**82 (20,5%)**	**318 (79,5%)**

22. táblázat: Összefüggés a *bex*A gén megoszlása és a moxifloxacin érzékenysége között

Törzsek	**Moxifloxacin**		***bex*A negatív törzsek száma**	***bex*A pozitív törzsek száma**
***B. fragilis* n=238**	Rezisztens	37	35	2 (5,4%)
	Mérsékelten É	19	19	0
	Érzékeny	182	171	11 (6,04%)
Nem *B. fragilis* n=162	Rezisztens	36	22	14 (38,9%)
	Mérsékelten É	8	3	5 (62,5%)
	Érzékeny	118	68	50 (42,4%)

8. ábra: a: A vizsgált *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek *bex*A gén RT-PCR amplifikációja és b: melting curve analízise



MDR *Bacteroides* törzsek molekuláris vizsgálata

Kutatócsoportunk 2014-ben Magyarországon elsőként publikált egy általunk izolált MDR *B. fragilis* törzset és részletesen jellemezte a rezisztencia mechanizmusok hátterét molekuláris diagnosztikai módszerekkel:

Esetismertetés röviden: osteomyelitis gyanújával került felvételre egy 57 éves vak, krónikus veseelégtelenség miatt dializált férfibeteg a SZTE ÁOK Sebészeti Klinikájára. Az anamnesztikus adatai közül kiemelendő még az inzulin-dependens diabetes mellitus, a III-V. jobb lábujjak amputációja, egy héttel felvétele előtt felsőlégúti infekció miatt fluorokinolon antibiotikum terápiában részesült. Felvételekor a láb hátsó része hyperémiás volt a második lábujja duzzadt és vörös volt, a képalkotó diagnosztika életet veszélyeztető szeptikus osteomyelitist igazolt. Perioperatív prophylaxisként cefuroximot (Zinnat) és clindamycint (Dalacin) adtak a 2. napon, mielőtt a jobb lábfejet amputálták. A 3. posztoperatív napon az amputáció helye gyulladt volt, így az öltéseket eltávolították, majd a sebet nyitva hagyták. Ebből a sebből küldtek mintát a laboratóriumba, melyből aerob tenyésztéssel egy methicillin-rezisztens *Staphyloccoccus aureus* (MRSA) tenyészett, majd a beteg intravénás vancomycin terápiában részesült. Ezzel egy időben masszív hematochezia miatt kolonoscopiát végeztek mely során a sigmoid kolon tumora igazolódott, így transzverzotómiát készítettek. A nem behegedett, nem gyógyult amputációs seb és az MRSA kolonizáció miatt, femorális amputációt végeztek. A posztoperatív időszak eseménytelenül zajlott, a beteget a 15. napon otthonába bocsátották, majd 3 hét múlva kontrollra jelentkezett. Ekkor a 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 hemokultúrák negatívak voltak. A kitenyészett 69566/2012 sorszámú *B. fragilis* törzs antibiotikum érzékenységi 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 (**23. táblázat a.**). A törzs nitrocefin teszttel ellenőrizve β-laktamáz termelőnek bizonyult, a kapott MIC értékeket agar dilúciós módszerrel is ellenőriztük, ugyanezeket a magas fokú rezisztencia értékeket kaptuk.

A törzset a MALDI-TOF MS módszerrel egyértelműen identifikáltuk, magas log(score)-al, majd a következő lépésben a *cfi*A-pozitivitást erősítettük meg mind a MALDI-TOF módszerrel, mind PCR-el, a vizsgált törzs a *cfi*A-pozitív volt és a *B. fragilis* Divízió II-be tartozott. A rezisztenciákért felelős genetikai háttér részletes molekuláris feltérképezése során a törzs egy megfelelő helyzetben, upstream elhelyezkedő IS*1187* inszerciós elem által aktivált *cfi*A gént hordozott, ami a karbapenem rezisztenciáért, illetve egy IS*1168* elem által aktivált *nim*A gént hordozott, mely az alacsony szintű metronidazol rezisztenciáért volt felelős. A vizsgálat során a tetracyclin rezisztenciáért felelős *tet*Q gén jelenlétét és két plazmid (7,0 és 11,0 kb) hordozását igazoltuk a törzsben. A Southern-blott vizsgálat kimutatta, hogy a *nim*A gén az IS*1168* elemmel együtt a 11,0 kb nagyságú plazmidon helyezkedett el (**23. táblázat b)**. Az általunk izolált MDR törzsben feltérképezett IS*1187* elem- és a *nim*A-IS*1168* párok együttes

jelenléte az eddigi irodalmi adatok alapján rendkívül ritka a karbapenem és metronidazol-rezisztens *B. fragilis* izolátumokban.

23. táblázat: A 69566/2012 törzs a: antibiotikum érzékenysége
és b: a részletes molekuláris vizsgálatának eredményei

a:

Anti biot	**PEN**	**Amox/ klav**	**PTZ**	**IMI**	**MER**	**CFX**	**TET**	**TIG**	**MTZ**	**CLI**	**ERY**	**MOX**
MIC mg/l	**>256**	**>256**	**>256**	**>32**	**>32**	**>256**	**>256**	0,125	2	**>256**	**>256**	0,5

b:

PCR	***cfi*A**	***cfi*A UP**	***gyrA***	***nim***	**IS elem**	***tet*Q**	**Plazmid**	**MALDI**
Eredmény	+	1,3 kb (IS*1187*)	-	**A+**	IS*1168*	-(+)	7,5 12	Divízió II

A **magyarországi** gyűjteményből származó 400 *Bacteroides/Parabacteroides* 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 izolálási helyét tekintve 1 származott a debreceni (*B. ovatus* D92) és 5 a szegedi centrumból (*B. vulgatus* SZ4, SZ34; *B. ovatus* SZ9, *B. thetaiotaomicron* SZ35 és *B. fragilis* SZ38), ugyanakkor a másik 2 centrumból származó izolátumok között nem volt MDR törzs (**24. táblázat**). Az MDR törzsek az ampicillin (n=6), moxifloxacin (n=5), clindamycin (n=4) és tetracyclin (n=5) antibiotikumokkal szemben mutattak rezisztenciát. Az antibiotikum rezisztencia gének és egyéb genetikai elemek vizsgálatának eredményét az **25. táblázatban** foglalom össze.

A *B. fragilis* SZ38 izolátum hordozta a *cfi*A 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 *cep*A gént, viszont 3 törzsben volt kimutatható a *cfx*A gén (*B. vulgatus* SZ4, *B. ovatus* SZ9 és *B. thetaiotaomicron* SZ35) és a *B. vulgatus* SZ4 törzs *cfx*A génjének 1,2 kb méretű regulátor régióját mutattuk ki. Négy törzs (*B. ovatus* D92, SZ9; *B. vulgatus* SZ34 és *B. thetaiotamicron* SZ35) magasszintű clindamycin rezisztenciát (MIC>256 mg/l) mutatott, a *B. ovatus* D92 hordozta az *erm*G, míg a *B. vulgatus* SZ4 és a *B. thetaiotaomicron* SZ35 az *erm*F gént, a *B. ovatus* SZ9 mindkét gént. A *B. vulgatus* SZ4 és *B. thetaiotaomicron* SZ35 törzsben jelen volt a teljes hosszúságú IS*4351* elem, de PCR-térképezéssel nem volt kimutatható semmilyen fizikai kapcsolat ezen IS-elem és az *erm*F gén között.

Az összes MDR törzs hordozta a *tet*Q gént és közülük 3 (*B. ovatus* D92, SZ9 és *B. fragilis* SZ38) mutatott magasszintű clindamycin rezisztenciát (MIC≥32 mg/l), ezenkívül a *B. ovatus* SZ9, *B. vulgatus* SZ34 és a *B. thetaiotaomicron* SZ35 izolátumokban kimutatható volt a *tet*X gén is. Bár egyik törzs sem hordozta a *nim* gént, a *B. ovatus* D92 metronidazollal szemben rezisztenciát mutatott az EUCAST határértékek alapján. A fluorokinolon érzékenységi vizsgálatot a moxifloxacin MIC meghatározásával végeztük el: négy izolátum moxifloxacin MIC-értéke ≥32 mg/l volt, közülük csak a *B. thetaiotamicron* SZ35 hordozta a *bex*A gént, a *B. fragilis* SZ38 *gyr*A génjének QRDR (Kinolon rezisztencia meghatározó szakasz: Quinolone-resistance determining region: QRDR) régiójában szekvenálással mutáció jelenlétét vizsgáltuk,

a GyrA alegységben Ser82-Phe szubsztitúciót igazoltunk. A tigecyclinnel és a chloramphenicollal szemben mindegyik MDR izolátum érzékenységet mutatott.

24. táblázat: A magyarországi gyűjteményből származó MDR *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek antibiotikum MIC értékei

Törzs/ faj	**MIC mg/l**									
	AMP	**AUG**	**CFX**	**MER**	**CLI**	**MTZ**	**MOX**	**TET**	**TIG**	**CHL**
	>2	>8	≥64	>8	>4	>4	≥8	≥16	≥16	≥32
D92 ***B. ovatus***	**>256**	**>16**	**32**	1	**>256**	**8**	**32**	**32**	4	8
SZ4 ***B. vulgatus***	**>256**	**>16**	**128**	4	1	0,25	**>32**	**16**	0,25	4
SZ9 ***B. ovatus***	**>256**	**16**	**32**	**16**	**>256**	0,5	**32**	**32**	0,5	8
SZ34 ***B. vulgatus***	**>256**	**>16**	**128**	4	**>256**	0,5	**32**	**8**	0,125	4
SZ35 ***B. thetaiota-omicron***	**>256**	**16**	**128**	2	**>256**	0,5	1	**16**	0,25	8
SZ38 ***B. fragilis***	**>256**	**>16**	**128**	**16**	**8**	0,5	**8**	**32**	0,5	4

Vastagon szedve: Rezisztens az adott antibiotikummal szemben
D: Debrecen, SZ: Szeged
AMP: ampicillin, AUG: amoxicillin/klavulánsav CFX: cefoxitin, MER: meropenem
CLI: clindamycin MTZ: metronidazol, MOX: moxifloxacin, TET: tetracyclin, TIG: tigecyclin
CHL: chloramphenicol

25. táblázat: A magyarországi gyűjteményből származó MDR *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek antibiotikum rezisztencia gének jelenlétének vizsgálata molekuláris diagnosztikai módszerekkel

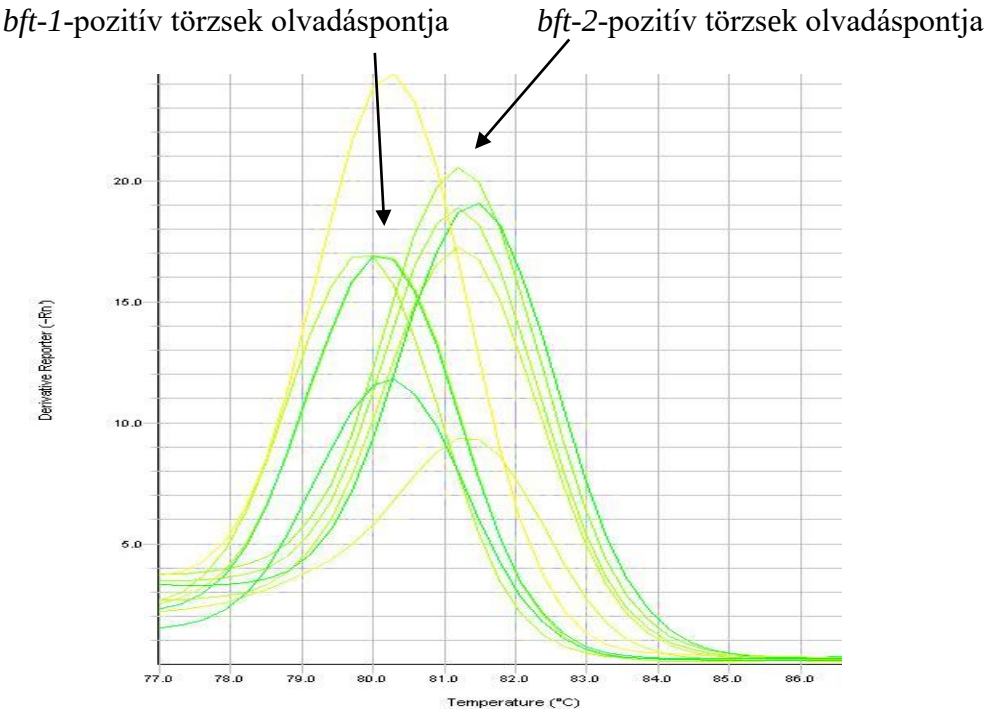
Törzs	***cfi*A/ IS upstream**	***cep*A**	***cfx*A/ *cfx*A upstream**	***nim***	***erm*F/ IS elem**	**IS*4351***	***erm*B**	***erm*G**	***tet*Q**	***tet*X**	***tet*X1**	***bex*A**
D92	- na	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
SZ4	- na	-	+ **1,2 kb**	-	-	+	-	-	+	-	-	-
SZ9	- na	-	+	-	+/-	-	-	+	+	+	-	+
SZ34	- na	-	-	-	+/-	-	-	-	+	+	-	-
SZ35	- na	-	+	-	+/-	+	-	-	+	+	-	+
Sz38	+ **282 bp**	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	- ***gyr*A:** 82Ser → Phe

na: nem alkalmazható
D: Debrecen, SZ: Szeged
AMP: ampicillin, AUG: amoxicillin/klavulánsav CFX: cefoxitin, MER: meropenem
CLI: clindamycin MTZ: metronidazol, MOX: moxifloxacin, TET: tetracyclin, TIG: tigecyclin
CHL: chloramphenicol

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. A *bft-1* és *bft-2* izotípusok olvadáspont-analízissel is elkülöníthetők voltak: a *bft-1*-pozitív törzsek átlagos olvadáspontja 80,1±0,4°C, míg a *bft-2*-pozitív törzseké 81,2±0,2 °C volt (9. ábra). A *bft-1* és *bft-2* izotípusok olvadáspont-analízisét három, véletlenszerűen kiválasztott *bft-1*- és *bft-2*-pozitív *B. fragilis bft* génjeinek szekvenálásával konfirmáltuk. A *bft-1*- és *bft-2*-pozitív *B. fragilis* törzsek elkülönítésében az olvadáspont-analízis és a PCR-RFLP módszerekkel kapott eredmények jó korrelációt mutattak. Vizsgálatunk során egy olyan ritka, általunk izolált törzset is azonosítottunk (*B. fragilis* SZ54), amely egyszerre hordozta a *cfi*A gént és a *bft-1* allélt.

9. ábra**:** A *bft*-1- és *bft*-2-pozitív *B. fragilis* törzsek olvadáspont-analízise



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 horozta 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 (**26. táblázat**). A 26 *bft*-pozitív törzs közül 24 (92,3%) hordozta az *fpn* gént, ugyanakkor 46 *bft*-negatív izolátum közül 36-ból (78,3%) is kimutatató volt az *fpn* gén.

Összefüggést kerestünk a *cfi*A és a *bfp* gének együttes hordozására: a *cfi*A-pozitív izolátumok közül 3 hordozta a *bfp1* és 2 a *bfp3* gént, ugyanakkor a *cfi*A-negatív törzsek közül

35 volt pozitív *bfp1*, 56 *bfp2* és 17 *bfp3* génekre (**27. táblázat**). A 63 *fpn*-pozitív törzs közül egyik sem hordozta a *cfi*A gént, így a *cfi*A 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 gének prevalenciájáról és egymással való korrelációjukról az irodalomban eddig csak kevés adatot közöltek.

26. táblázat**:** Az *fpn* and *bfp*1-4 gének előfordulása *bft*-pozitív és *bft*-negatív *B. fragilis* izolátumok körében

Törzsek	***bft*-pozitív törzsek (n=26)**	***bft*-negatív törzsek (n=46)**
bfp1-pozitív	12	26
bfp2-pozitív	19	39
bfp3-pozitív	7	10
bfp4-pozitív	0	0
bfp1- és *bfp2*-pozitív	3	19
bfp1- és *bfp3*-pozitív	0	1
bfp2- és *bfp-3*-pozitív	0	5
bfp1-, bfp2- és *bfp3*-pozitív	6	3
***fpn*-pozitív**	**24**	**36**

27. táblázat: Az *fpn* és *bfp*1-4 gének jelenléte *cfi*A-pozitív és *cfi*A-negatív *B. fragilis* törzsek körében

Törzsek	***cfi*A-pozitív**	***cfi*A-negatív**
bfp1-pozitív	3	35
bfp2-pozitív	2	56
bfp3-pozitív	0	17
bfp4-pozitív	0	0
bfp1- és *bfp2*-pozitív	0	22
bfp1- és *bfp3*-pozitív	0	1
bfp2- és *bfp-3*-pozitív	0	5
bfp1-, bfp2- és *bfp3*-pozitív	0	9
***fpn*-pozitív**	**0**	**63**

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

Klinikai izolátumok species-szintű meghatározása

Az első vizsgálatunkban 2 éves periódus során **283, random** módon kiválasztott klinikailag releváns **anaerob izolátumot** identifikáltunk MALDI-TOF módszerrel a Bruker Daltonik laboratóriummal együttműködve. A törzseket főként hemokultúrából, diabeteses lábfertőzésekből, sebváladékokból, intra-abdominális-, nőgyógyászati- és az orális régiót érintő fertőzésekből izoláltuk. A **249 izolátum**, amiket a MALDI-TOF MS egyértelműen tudott identifikálni, 14 genushoz és 35 fajhoz tartozott (**28. táblázat**).

28. táblázat: Anaerob izolátumok száma, melyeket a MALDI-TOF MS és fenotípusos módszerekkel azonosítottunk species vagy genus szintjén

Faj	**A MALDI-TOF MS által azonosított törzsek száma log(score)**		**A fenotípusos módszerekkel azonosított törzsek száma**	**Faj**	**A MALDI-TOF MS által azonosított törzsek száma log(score)**		**A fenotípusos módszerekkel azonosított törzsek száma**
Gram-negatív	**≥2,000**	**≥1,700**		**Gram-pozitív**	**≥2,000**	**≥1,700**	
Bacteroides fragilis	57	0	42	*C. perfringens*	45	2	45
B. thetaiotaomicron	14	1	8	*C. difficile*	4	0	2
B. ovatus	9	0	7	*C. innocuum*	4	0	2
B. uniformis	3	0	7	*C. tertium*	2	0	2
B. vulgatus	3	0	5	*C. septicum*	4	0	4
C. ureolyticus	2	5	7	*C. butyricum*	0	1	1
F. capillosus	0	0	3	*C. ramosum*	2	0	0
B. stercoris	0	0	2	*C. baratii*	0	1	0
B. caccae	0	0	3	*C. fallax*	0	0	1
B. eggerthii	0	0	1	*C. paraputrificans*	0	0	1
P. merdae	0	0	1	*C. bifermentans*	0	0	1
P. distasonis	6	0	5	*Clostridium* sp.	0	0	2
Bacteroides sp.	2	0	4	GPAC *	0	0	4
Prevotella oralis	0	0	5	*Finegoldia magna*	2	0	2
P. bivia	11	4	13	*Parvimonas micra*	1	0	1
P. buccae	9	0	9	*P. anaerobius*	5	0	4
P. loescheii	0	0	1	*Peptostreptococcus* sp.	0	0	7
P. intermedia	0	0	1	*Gemella morbillorum*	1	0	2
P. disiens	3	0	2	*G. haemolysans*	0	1	0
P. baronae	1	0	0	*G. sanguinis*	0	1	0
P. asaccharolytica	0	0	1	*S. salivarius*	0	1	0
P. loescheii	0	0	1	*Cutibacterium acnes*	16	0	16
Prevotella sp.	0	0	2	*P. avidum*	1	2	0
F. necrophorum	4	1	3	*Propionibacterium* sp.	0	0	2
F. nucleatum	0	1	5	*A. odontolyticus*	2	5	5
F. varium	0	0	1	*Actinomyces* sp.	0	0	2
Fusobacterium sp.	2	1	0	*Lactobacillus gasseri*	1	0	0
C. sputigena	0	1	0	*L. paracasei*	1	0	0
Capnocytophaga sp.	0	0	1	*L. jensenii*	0	1	0
				Lactobacillus sp.	0	0	3
				G. adiacens	1	2	0
Összesen	**126**	**14**	**140**		**92**	**17**	**109**

*GPAC: Gram pozitív anaerob coccusok

218 (77%) izolátum esetében a MALDI-TOF MS species-szintű identifikációt adott log(score) >2,0 értékkel és 31 izolátumot (10,95%) genus szinten tudtunk identifikálni [log(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 (néhány esetben még a harmadik és a negyedik helyen is). Öt izolátum esetében (1,8%) (két *Bacteroides* sp. és három *Fusobacterium* sp.) az MS mérés nem adott faj-szintű identifikációt; azonban a log(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(score)-ral. Ebből a 34 izolátumból csak nyolcat lehetett szekvenálni az etanol extraktum elégtelen mennyisége miatt. A szekvenálási adatok ezeknek a törzseknek a fenotípusos azononosításával összehasonlítva a **29. táblázatban** láthatóak.

29. táblázat: Azon izolátumok fenotípusos azonosítása és 16S rRNS gén szekvenálása, amelyek esetében a MALDI-TOF MS-el nem volt megbízható az azonosítás: log(score) <1,7 (n=8)

Species azonosítás a 16S rRNS szekvenálással (egyezés)	**A MALDI-TOF MS által kapott log(score)**	**A Rapid ID 32A fenotípusos azonosítása**
Anaerococcus vaginalis (97,97 %)*	1,564	*Anaerococcus prevotii*
Anaerococcus vaginalis (97,97 %)*	1,395	*Anaerococcus prevotii*
Finegoldia magna (100%)	1,238	*Finegoldia magna*
Clostridium hathewayi (99,33 %)	1,406	*Clostridium clostridiforme*
Campylobacter ureolyticus (100%)	1,313	*Clostridium fallax*
Finegoldia magna (99,55%)**	1,417	*Anaerococcus prevotii*
Finegoldia magna (100%)**	1,372	*Anaerococcus prevotii*
Prevotella baroniae (99,56%)	1,277	*Prevotella loescheii*

**A. vaginalis* és *C. hathewayi* nem volt jelen a Rapid ID 32A adatbázisában
** *F. magna* az *Anaerococcus prevotii* csak minimális biokémiai tesztjeiben különbözik

A **30. táblázat** azoknak az az izolátumoknak a szekvenálási eredményeit mutatja, amelyek ellentmondásos species-szintű identifikációs eredményeket adtak az MS [log(score≥2,0)] és a fenotípusos identifikálás alapján. Azokat az izolátumokat, amelyek 1,7-2,0 közötti log(score) ereményeket adtak szintén szekvenáltuk, kivéve azokat, ahol a fenotípusos identifikáció ugyanolyan faj-szintű eredményt adott. Az ellentmondásos eredmények nagy része a *Bacteroides/Parabacteroides* genusból származott. 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(score)-okkal, amelyek azonban szekvenálással *B. xylanisolvens*-nek bizonyultak (99,78%-os azonosság).

Négy *Clostridium* és 6 *Prevotella* törzs esetében ellentmondásos species identifikációt adtak a hagyományos fenotípusos-biokémiai módszerek; azonban 1 eset kivételével a szekvenálás a MALDI-TOF faj identifikációját erősítette meg. Hat Gram-pozitív coccust azonosítottunk fenotípusos identifikálással *Peptostreptococcus* spp.-ként. Közülük 2 a tömegspektrometriás módszerrel *Finegoldia magna*- és *Gemella morbillorum*-nak bizonyult,

azonban a másik négy törzs nem anaerob faj volt: az egyik *Streptococcus salivarius*, 3 *Granulicatella adiacens* eredményt adott, mindegyik eredményt a szekvenálás megerősítette.

30. táblázat: Azon izolátumok szekvenálási adatai, ahol a MALDI-TOF MS és a fenotípusos módszerekkel azonosított fajok azonosítása nem megfelelő eredményeket adott (n=44)

A MALDI-TOF MS által azonosított fajok	Log (score)	Species azonosítása fenotípusos módszerekkel	Species azonosítása 16S rRNS génszekvenálással (egyezés %)
C. difficile	2,392	*C. perfringens*	*C. difficile* (100)
C. ramosum	2,317	*C. paraputrificans*	*C. ramosum* (100)
C. perfringens	2,362	*C. bifermentans*	*C. perfringens* (100)
C. baratii	1,727	*C. fallax*	*Clostridium* sp. (99,77)
Finegoldia magna	2,127	*Peptostreptococcus* sp.	*Finegoldia magna* (100)
Gemella morbillorum	2,491	*Peptostreptococcus* sp.	*Gemella morbillorum* (100)
Streptococcus salivarius	1,998	*Peptostreptococcus* sp.	*Streptococcus salivarius* (99)
Granulicatella adiacens	1,87	*Peptostreptococcus* sp.	*G. adiacens* (99)
G. adiacens	1,962	*Peptostreptococcus* sp.	*G. adiacens* (99,13)
G. adiacens	2,187	*Peptostreptococcus* sp.	*G. adiacens* (99)
B. fragilis	2,153	*B. capillosus*	*B. fragilis* (100)
B. fragilis	2,537	*B. vulgatus*	*B. fragilis* (100)
B. fragilis	2,399	*B. uniformis*	*B. fragilis* (99)
B. fragilis	2,489	*B. uniformis*	*B. fragilis* (99)
B. fragilis	2,454	*B. vulgatus*	*B. fragilis* (99)
B. fragilis	2,576	*B. capillosus*	*B. fragilis* (99,56)
B. fragilis	2,61	*P. merdae*	*B. fragilis* (99,56)
B. fragilis	2,538	*B. thetaiotaomicron*	*B. fragilis* (99,56)
B. fragilis	2,54	*B. caccae*	*B. fragilis* (99)
B. fragilis	2,608	*B. caccae*	*B. fragilis* (99)
B. fragilis	2,489	*B. caccae*	*B. fragilis* (100)
B. fragilis	2,389	*P. loescheii*	*B. fragilis* (99,12)
B. fragilis	2,61	*B. stercoris*	*B. fragilis* (100)
B. fragilis	2,421	*B. stercoris*	*B. fragilis* (99,34)
B. fragilis	2,449	*P. bivia*	*B. fragilis* (99,78)
B. fragilis	2,386	*P. bivia*	*B. fragilis* (99,56)
B. thetaiotaomicron	2,445	*P. distasonis*	*B. thetaiotaomicron* (100)
B. thetaiotaomicron	2,406	*B. uniformis*	*B. thetaiotaomicron* (99)
B. thetaiotaomicron	2,38	*B. fragilis*	*B. thetaiotaomicron* (99)
B. thetaiotaomicron	2,15	*B. fragilis*	*B. thetaiotaomicron* (100)
B. thetaiotaomicron	2,251	*B. ovatus*	*B. thetaiotaomicron* (99)
B. thetaiotaomicron	2,366	*B. fragilis*	*B. thetaiotaomicron* (99,78)
B. thetaiotaomicron	2,216	*B. eggerthii*	*B. thetaiotaomicron* (100)
B. ovatus	2,261	*B. eggerthii*	*B. xylanisolvens* (98,78)
B. ovatus	2,242	*B. thetaiotaomicron*	*B. xylanisolvens* (98,78)
B. uniformis	2,637	*P. buccae*	*B. uniformis* (100)
P. distasonis	2,453	*P. intermedia*	*P. distasonis* (98,89)
P. distasonis	2,533	*B. fragilis*	*P. distasonis* (98,89)
P. buccae	2,297	*P. intermedia*	*P. buccae* (99,78)
P. buccae	2,309	*P. oralis*	*P. buccae* (99,13)
P. disiens	2,194	*P. oralis*	*P. disiens* (98,89)
P. bivia	2,348	*P. oralis*	*P. bivia* (100)
P. bivia	2,236	*P. oralis*	*P. bivia* (100)
P. baroniae	2,189	*P. loescheii*	*P. baroniae* (98,90)

Kék színnel jelölve az egyezőségek

A 4 izolátumból, amelynek a log(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(score) 1,727], a fenotípusos identifikálás *C. fallax* eredményt adott, a 16S rRNS szekvenálás 99,77%-os homológiával *Clostridium* sp. eredményt adott (**30. táblázat**). 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(score)-okat és a fenotípusos, biokémiai módszerek ugyanazokat a fajidentifikációs eredményeket adták. Ugyanez igaz a hét *Actinomyces odontolyticus* izolátumból ötre, amelyeknek 1,730 és 1,947 között volt a log(score) értékük és amelyekre a fenotípusos identifikáció ugyanazt a fajazonosítást adta.

Klinikai *Bacteroides/Parabacteroides* sp. izolátumok species-szintű azonosítása a MALDI-TOF MS módszerrel

A következő vizsgálatunkban **277** klinikai ***Bacteroides/Parabacteroides* sp**. izolátumot választottunk ki az előző fejezetben már ismertetett európai törzsgyűjteményből, hogy identifikáljuk a MALDI-TOF MS módszerrel és a klasszikus fenotípusos identifikáló módszerekkel. A 277 izolátum közül 270-et egyértelműen [log(score)>2,0] sikerült identifikálni a MALDI-TOF MS módszerrel öszehasonlítva a MALDI Biotyper adatbázisában található referencia törzsekkel (**31. táblázat**).

31. táblázat: A *Bacteroides/Parabacteroides* sp.-be tartozó klinikai izolátumok species-szintű azonosítása különböző módszerekkel

Faj	**Az izolátumok száma n=277**		
	A MALDI-TOF MS ≥2,0 log(score)	**Biokémiai vizsgálatokkal eltérő fajok**	**Kiválasztva a 16S rRNS gén szekvenálásához***
B. fragilis	179	5	2
B. thetaiotaomicron	43	5	4
B. ovatus	15	6	1
B. vulgatus	20	1	1
B. uniformis	5	3	2
B. eggerthii	1	0	0
B. nordii	4	3	1
B. salyersiae	1	0	0
B. massiliensis	2	0	0
A MALDI-TOF MS által nem egyértelmű azonosítás	7		
Összesen	**277**	**23**	**12**

*Olyan törzsek esetén történt a szekvenálás, ahol a MALDI-TOF MS log(score) 2,0-2,5 volt, de a biokémiai azonosítás különbözött (n=12), illetve a A MALDI-TOF MS által nem volt egyértelmű az azonosítás (n=7)

Hét izolátum esetén nem történt egyértelmű identifikálás, mivel nem állt rendelkezésre megfelelő referencia spektrum a vizsgálat időszakában az adatbázisban [log(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)*. Ezen törzsek közül egyet két párhuzamos kísérletben előkészítettünk MALDI-TOF

MS mérésre és 20 spektrumot mértünk le, amelyet hozzáadtunk a MALDI Biotyper MSP adatbázishoz.

A három másik izolátum, amelyet nem sikerült identifikálni a spektrumuk alapján (a 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 megfelően identifikált törzs a szekvenálás során *Bacteroides eggerthii*-nek, *P. goldsteinii*-nek és *B. intestinalis*-nak bizonyult (**32. táblázat**). A két *B. fragilis* kontroll törzset (*B. fragilis* ATCC 25285 és *B. fragilis* DSM 2151) többszöri párhuzamos méréssel, mintapreparálással hasonlítottuk össze, az identifikálás mindkét esetben magas log(score)-ral (>2,5) járt.

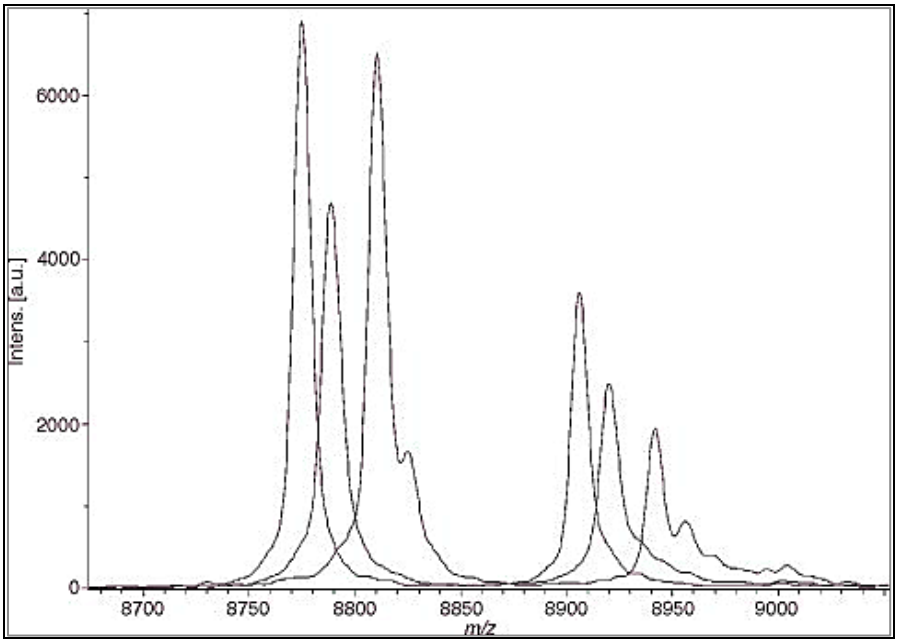
32. táblázat: Azon törzsek 16S rRNS szekvenálás eredményei, melyek species-szintű identifikációja eltérő volt a MALDI-TOF MS és a biokémiai módszerrel vizsgálva, vagy a MALDI Biotyper identifikáció nem volt megfelelő

Sorszám	**Species meghatározás**		
	Biokémiai teszt	**MALDI-TOF MS**	**16S rRNS gén szekvenálás eredménye**
A biokémiai teszt és a MALDI-TOF eredmény különböző			
1.	*B. ovatus*	*B. fragilis*	*B. fragilis*
2.	*B. uniformis*	*B. fragilis*	*B. fragilis*
3.	*B. ovatus*	*B. thetaiotaomicron*	*B. thetaiotaomicron*
4.	*B. uniformis*	*B. thetaiotaomicron*	*B. thetaiotaomicron*
5.	*B. uniformis*	*B. thetaiotaomicron*	*B. thetaiotaomicron*
6.	*B. ovatus*	*B. thetaiotaomicron*	*B. thetaiotaomicron*
7.	*B. uniformis*	*B. ovatus*	*B. ovatus*
8.	*B. thetaiotaomicron*	*B. vulgatus*	*Bacteroides* sp. (új?)
9.	*B. ovatus*	*B. uniformis*	*B. uniformis*
10.	*B. ovatus*	*B. uniformis*	*B. uniformis*
11.	*B. ovatus*	*B. nordii*	*B. nordii*
MALDI Biotyper identifikáció nem volt megfelelő			
12.	*B. thetaiotaomicron*	ni (log(score) >2,5)[a]	*P. distasonis*
13.	*P. distasonis*	ni	*P. distasonis*
14.	*P. distasonis*	ni (log(score) >2,5) [a]	*P. distasonis*
15.	*P. distasonis*	ni (log(score) >2,5) [a]	*P. distasonis*
16.	*B. thetaiotaomicron*	ni	*B. eggerthii*
17.	*B. merdae*	ni	*B. goldsteinii*
18.	*Bacteroides sp.*	ni	*B. intestinalis*

ni: nem meggyőző identifikáció; [a]MALDI-TOF MS analízissel elért log(score) miután az adatbázisba bekerült a szekvenált *P. distasonis* MS; kék színnel jelölve az egyezőségek

A MALDI-TOF módszer egyik előnye a lehetőség a gyorsan és egyszerűen kivitelezhető fajon belüli tipizálásra, a *B. fragilis* fajokon belül, több MS csúcs felhasználható tipizálásra, a 8776 Da-os és 8907 Da-os csúcsok jellemzőek az első csoportra, a 8788 Da-os és 8919 Da-os csúcsok a második csoportra, míg a 8808 Da-os és 8941 Da-os csúcsok a harmadik fajcsoportra (**10. ábra**). 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.

10. ábra: Példák a csúcsokra, melyek alapján a *B. fragilis* törzsek három alcsoportját különböztetjük meg (Nagy E. *et al.* 2009.)



A 270, MALDI-TOF által egyérteműen 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 faj-szintű 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. Vizsgálataink alapján a MALDI-TOF MS identifikáló, elválasztó képessége jobbnak bizonyult a biokémiai teszteknél a *B. thetaiotaomicron*, *B. ovatus* és *B. uniformis* fajok esetében.

Az európai szintű vizsgálatainkat folytattuk, az előző fejezetben ismertetett, **Magyarországból gyűjtött 400 *Bacteroides/Parabacteroides*** törzs species szintű meghatározásával. A vizsgálat során mind a négy részvevő centrum rendelkezett saját MALDITOF készülékkel, így azt kértük, hogy a további vizsgálatra beküldött törzseket minden laboratórium (mindegyik Bruker Daltonik készülék) saját maga is identifikálja a saját módszereikkel a készülékükön, ezt követően mi magunk is elvégeztük az összes törzs identifikálását a saját készülékünkön, egy vizsgáló végezte az összes törzs mérését, azonos körülmények között, azonos módszerrel, 3 párhuzamos méréssel. A résztvevő centrumokban történt identifikálás és a szegedi centrumban végzett ismételt azonosítás során a 400 törzs közül 379 (94,75%) esetében az identifikálás korrekt, faj-szintű volt, ≥2,000 log(score) értékkel (log(score) tartomány: 2,020-2,525, átlagos érték: 2,249). Három párhuzamos, ismételt identifikálás után minden törzs esetében a legjobb log(score) értékeket választottuk ki az analízishez.

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 (**33. táblázat**). 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 21 vizsgált törzs közül. A MALDI-TOF MS és rapid ID 32A módszerekkel történt identifikálással mindössze 5 törzs (23,81%) esetén kaptunk egyező eredményt.

A szekvenálás pontossága minden esetben ≥98% volt, kivéve az SY9 számú törzset, amely esetén ez az érték 95% lett. Az SY9, SY64 és SY81 sorszámú 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. salyeriae*; 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.

33. táblázat: A21 *Bacteroides* törzs három különböző módszerrel történt identifikálásának eredménye

(Kék színnel kiemelve az egyezőségek)

Törzsek	Eredeti (beküldő) identifikálás: MALDI-TOF MS	SZTE KMDI Ismételt identifikálás: MALDI-TOF MS	Log score	16S rRNS gén szekvenálás	Szekvenálás pontossága	Identifikálás rapid ID 32A-val	Identifikálás eredménye
D2	*B. ovatus*	*B. thetaiotaomicron*	1,871	*B. thetaiotaomicron*	99%	*B. thetaiotaomicron*	99,8%
D4	*B. fragilis*	*B. thetaiotaomicron*	1,993	*B. thetaiotaomicron*	99%	*B. thetaiotaomicron*	99,7%
D39	*B. salyersiae*	*B. fragilis*	2,237	*B. fragilis*	98%	*B. uniformis*	39,6%
D46	*B. vulgatus*	*B. thetaiotaomicron*	2,188	*B. thetaiotaomicron*	99%	*B. thetaiotaomicron*	Nagyon jó minőség
D63	*B. ovatus*	*B. fragilis*	2,458	*B. fragilis*	99%	*B. fragilis*	97,1%
D69	*B. uniformis*	*B. thetaiotaomicron*	2,129	*B. thetaiotaomicron*	99%	*B. caccae*	52,4%
D71	*B. uniformis*	*B. thetaiotaomicron*	1,855	*B. thetaiotaomicron*	99%	*B. uniformis*	Nem elfogadható profil
SY2	*B. fragilis*	*P. distasonis*	2,359	*P. distasonis*	99%	*Capnocytophaga sp.*	Nem elfogadható profil
SY9	*B. vulgatus*	*B. intestinalis*	1,916	*B. cellulosilyticus*	95%	*P. distasonis*	82%
SY23	*B. fragilis*	*B. vulgatus*	2,072	*B. fragilis*	99%	*B. uniformis*	Nem elfogadható profil
SY25	*B. thetaiotaomicron*	*B. fragilis*	2,382	*B. fragilis*	99%	*B. thetaiotaomicron*	Nem elfogadható profil
SY53	*B. vulgatus*	*B. ovatus*	2,072	*B. thetaiotaomicron*	99%	*B. uniformis*	61,7%
SY64	*B. ovatus*	*B. nordii*	1,802	*B. salyersiae*	99%	*B. ovatus*	84,5%
SY77	*B. ovatus*	*B. fragilis*	2,081	*B. fragilis*	99%	*B. fragilis*	97,8%
SY81	*B. fragilis*	*B. ovatus*	2,232	*B. xylanisolvens*	99%	*B. caccae*	52,8%
SE33	*B. fragilis*	*B. thetaiotaomicron*	2,39	*B. fragilis*	99%	*B. fragilis*	96,5%
SE56	*B. thetaiotaomicron*	*B. stercoris*	2,357	*B. stercoris*	99%	*B. fragilis*	97,2%
SE57	*B. caccae*	*B. salyersiae*	2,008	*B. salyersiae*	99%	*B. caccae*	54,3%
SE59	*B. fragilis*	*B. thetaiotaomicron*	2,135	*B. thetaiotaomicron*	99%	*B. fragilis*	96,6%
SE67	*B. fragilis*	*B. cellulosilyticus*	2,327	*B. cellulosilyticus*	99%	*B. fragilis*	97,7%
SZ80	*B. ovatus*	*B. nordii*	2,043	*B. nordii*	98%	*B. ovatus*	433%

Egyes anaerob specieseken belüli típusmeghatározás lehetőségei a MALDI-TOF MS módszerrel
A *Bacteroides fragilis* törzsek Divízió I. és Divízió II. elkülönítése

Az előző fejezetben bemutatott 277 klinikai *Bacteroides/Parabacteroides* törzsből, melyeket a MALDI-TOF MS-sel identifikáltuk fajszinten **145 *B. fragilis* izolátum** magas log(score)-os (≥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 "*cfi*A identification" file (a közös tudományos együttműködésünk segítségével a Bruker Daltonik által kifejlesztett módszer) alapján történt. A vizsgálatba két kontroll törzset (*B. fragilis* NCTC 9343 *cfi*A-negatív törzs; és TAL3636 *cfi*A-pozitív törzs) vontunk be. Minden törzs esetében PCR vizsgálattal kerestük a *cfi*A gén jelenlétét. Méréseink alapján **kilenc izolátum** (6,2%) tartozott a *B. fragilis* II. csoportba, mind a kilenc izolátum PCR vizsgálattal *cfi*A-pozitívnak bizonyult, az imipenem MIC értékük <0,125 és >32 mg/l között volt. Még a „silent" *cfi*A gént hordozó izolátumokat is ki tudtuk mutatni ezzel a módszerrel. A Divízió I. csoportba tartozó 136 izolátum nem hordozta a *cfi*A gént. 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. A MALDI Biotyper szoftver minden esetben helyesen osztályozta a *B. fragilis* törzseket, jelezve az ilyen megközelítés alkalmasságát a *B. fragilis* I. és II. csoportjának megkülönböztetésére.

Következő vizsgálatunkba a saját izolátumainkból 2012-ben súlyos humán fertőzésekből kitenyésztett random válogatott **hatvan *B. fragilis* törzset** vontuk be. Mindegyik törzs species-szintű identifikációja a MALDI-TOF/MS módszerrel, majd a Divízió I vagy II-be tartozás a MALDI Biotyper 3.1 software "*cfi*A identification" file alapján történt. A Divízió II-be tartozó törzsek esetében kerestük a *cfi*A rezisztencia gén jelenlétét is PCR módszerrel és meghatároztuk az imipenem MIC értékeket is. A vizsgált 60 *B. fragilis* törzsből 5 tartozott a II-csoportba, ezek mindegyike hordozta a *cfi*A gént, azonban négy törzs fenotípusosan érzékeny volt (az egyik egy heterogén fenotípusú törzs: *B. fragilis* 88768), csak egy törzs volt rezisztens (*B. fragilis* 69566) imipenemre (**34. táblázat**). (Ezt a törzset mutattam be az előző fejezetben az első magyar MDR törzsként.) További vizsgálataink alapján ez a vizsgált törzs a *cfi*A gén upstream régiójában egy IS elemet (IS*1187*) hordozott, mely a karbapenem rezisztencia gén aktiválásáért, így a rezisztencia kifejeződéséért, a fenotípusos megjelenésért felelős.

34. táblázat: A Divízió II-be tartozó *B. fragilis* törzsek MIC értékei, *cfi*A gén kimutatása PCR módszerrel

Törzs száma	**Izolálás helye**	**MIC mg/l**					**MALDI típus**	***cfi*A**	***cfi*A-UP**	***nim***
		CFX	IMI	CLI	MTZ	TIG	II	+	-	-
51158	Peritonitis	16	0,5	1	1	0,125	II	+	-	-
66751	Sebváladék	**128**	0,125	2	1	0,125	II	+	-	-
69566	Intra-abdominális	**256**	**32**	**256**	4	0,125	II	+	1,3 kb (IS*1187*)	**A**
88768	Peritonitis	**64**	0,25	nt	2	0,25	II	+	-	-
103300/4	Tályog	16	0,5	1	1	0,125	II	+	-	-

CFX: cefoxitin, IMI: imipenem, CLI: clindamycin, MTZ: metronidazol, TIG: tigecyclin
*cfi*A UP: IS elem jelenléte upstream régióban, **vastaggal** jelölve: Rezisztens az alkalmazott határértékek alapján

A magyarországi vizsgálatunkban gyűjtött törzsek közül a MALDI-TOF Biotyper 3.1 szoftver "*cfi*A identification project file" segítségével megvizsgáltunk **200 *B. fragilis* törzset**. Az előzetes faj-szintű identifikáció után a második vizsgálattal 20 izolátum tartozott (10%) a Divízió II-be és PCR módszerrel azt is igazoltuk, hogy ezek közül az összes hordozta a *cfi*A gént (eredményeket részben ismertettem az előző fejezetekben: **21. táblázat**), míg a Divízió I-be tartozó 180 törzs egyike sem hordozta a *cfi*A gént. A módszerrel Divízió II-be tartozó törzsek közük 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

Összesen **61 *C. acnes*** izolátumot vizsgáltunk, a legtöbb törzs (n=49) általunk izolált friss klinikai izolátum volt, 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 (HU 24728) is. Ezek közül az izolátumok közül a HU76618 törzset, ami egy hemokultúrából származott, a vizsgálat elején már megvizsgáltuk eMLST tipizálással és úgy bizonyult, hogy a *C. acnes* törzsek II. típusához tartozik. Tizenkét referencia törzset vontunk be (**36. táblázat**, *-al kiemelt törzsek) 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: Hunyadkürti 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 típussal 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, amely a *C. acnes* törzseket egyértelműen megkülönböztette más vizsgált *Cutibacterium/Propionibacterium* fajoktól magas log(score)-ral (átlag score: 2,34), a tömegspektrumok közötti különbségeket kerestük. Összességében, 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.

A **11. A. ábra** mutatja a jellemző különbségeket a 6900–7300 Da intervallumban, a ClinProTools szoftver gel/stack nézetében a *C. acnes* törzsek I., II. és III. típusa között, az MS csúcsok alapján még az IA és IB altípusok közötti különbségeket is egyértelműen lehetett látni. A **40. táblázat** mutatja a különböző típusú *C. acnes* törzsek elkülönítésére jellemző csúcsokat. Az IC típus, a mostanában leírt új *C. acnes* altípus (McDowell A. *et al.* 2012a; 2012b) hasonló MS profilt ad, mint az IB típus az első értékelések során ebben a tömegtartományban, azonban további jellegzetes csúcsokat lehet látni a 9900 és 10000 Da közötti régióban (**11. B. ábra**).

Mivel azonban nem volt elérhető további, ehhez az altípushoz tartozó referencia törzs a vizsgálatunk idején, és más klinikai izolátum sem mutatta ezt a mintázatot, nem tudtuk megerősíteni ennek az eredménynek a diszkriminációs képességét, ezért, az IB és IC típusok ezzel a csúccsal való megkülönböztetésének specificitását bizonyítani kell további törzsekkel a jövőben. Annak a lehetőségnek a kivizsgálására, hogy a *C. acnes* törzsek típusát és altípusát előrejelezzük a törzsek első beállításában meghatározott csúcsmintázat alapján, további 48 friss

klinikai *C. acnes* izolátumot és 2 további, a *C. acnes* csoport III. típusához tartozó referencia törzset vizsgáltunk vakon a korábbi eMLST tipizálásnak megfelelően (VA2/5 és Asn13), az eMLST tipizálást és a MALDI-TOF méréseket egymástól függetlenül végeztük el.

Összesen 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 eMLST tipizálásnál mindegyik IA1 altípus izolátumnak bizonyult. Olyan *C. acnes* klinikai izolátumot nem találtunk a vizsgálat során, ami az IA2 altípushoz tartozott volna az eMLST tipizáláskor. Huszonegy klinikai izolátumot találtunk IB típusúnak mind a MALDI-TOF MS-sel mind az eMLST-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 korábbi tanulmányokból ismert a *C. acnes* törzsek III típusához tartozó két további referencia törzs eMLST tipizálással kapott eredményei ugyanazt a mintázatot adták, mint az előzőleg már vizsgált III-as típusú törzsek a MALDI-TOF MS-sel. 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 (**35. táblázat**).

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 eMLST 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 eMLST 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 eMLST-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.

Elvégeztünk egy pilot vizsgálatot, hogy meghatározzuk, vajon az *C. acnes* törzsek inkubációs ideje befolyásolja-e MALDI Biotyper identifikálási log(score)-kat a illetve a típus specifikus csúcsmintázatot. Ismert, hogy a *C. acnes* apró, tűhegyni telepeket képez már 24 óra tenyésztés után anaerob körülmények között, a MALDI-TOF MS Biotyper identifikációs rendszer rendszeres használatakor javasolt a vizsgálatokat 24 órás inkubációs idő után elvégezni, azonban anaerob baktériumok esetében még nehezen lehet elegendő mennyiségű mintát kapni az extrakciós folyamat kivitelezéséhez. Kiválasztottunk 7 *C. acnes* referencia törzset (az IA és III típushoz tartozókat) és mértük a log score értékeket 24- és 48 órás inkubációs idő után is, a módszerek fejezetben leírt extrakciós módszer alkalmazásával. Az átlag log(score) a 24 órán túli izolátumokra 2,302 (2,178–2,401) volt és csak kis mértékben változott 48 órás inkubációt követően: 2,276 (1,965–2,472). A típus specifikus csúcsokat mindig egyértelműen lehetett detektálni, ami azt mutatja, hogy az inkubációs idő nem befolyásolta szignifikánsan az MS-alapú identifikálást és a *C. acnes* törzsek tipizálását. Mind a hét izolátum esetében azonosítottuk a tipikus csúcsokat az I. típus és III. típus törzsek elkülönítésére (**36. táblázat**) mindkét inkubációs idő után.

35. táblázat: A vizsgált 61 *C. acnes* törzs adatai: *-al jelölve a kontrollként használt törzseket

Sorszám	Minta származási hely	Ország	eMLST			MALDI-TOF filotípus
			Allél profil	ST	Filo típus	
			aroE-atpD-gmk-guaA-lepA-sodA-tly-camp2			
55835	Cystitis	HU	1-1-1-3-1-1-1-1	ST-1	IA_1	IA
3632	Hemokultúra	HU	1-1-1-3-1-1-1-1	ST-1	IA_1	IA
4579	Bőr	HU	1-1-1-3-1-1-1-1	ST-1	IA_1	IA
12604	Pleurális asp.	HU	1-1-1-3-1-1-1-1	ST-1	IA_1	IA
16634	Acne	HU	1-1-1-3-1-1-1-1	ST-1	IA_1	IA
50460	Acne	HU	1-1-1-3-1-1-1-1	ST-1	IA_1	IA
63006	Seb arcról	HU	1-1-1-3-1-1-1-1	ST-1	IA_1	IA
19107	Sebész.tályog	HU	1-1-1-3-1-1-1-1	ST-1	IA_1	IA
20550	Hasűri	HU	1-1-1-3-1-1-1-1	ST-1	IA_1	IA
44064	Fekszíni seb	HU	1-1-1-3-1-1-1-1	ST-1	IA_1	IA
64745	Tályog	HU	1-1-1-3-1-1-1-1	ST-1	IA_1	IA
15614	Hemokultúra	HU	1-1-1-3-1-1-2-2	ST-3	IA_1	IA
26048	Hemokultúra	HU	1-1-1-3-1-1-2-2	ST-3	IA_1	IA
28585	Hemokultúra	HU	1-1-1-3-1-1-8-6	ST-4	IA_1	IA
PRP-60*	Acne	UK	5-1-1-3-1-1-1-1	ST-20	IA_1	IA
76793	Intraorális absc.	HU	1-1-1-3-1-14-1-1	ST-101	IA_1	IA
19695	Sebváladék	HU	1-15-1-3-1-1-1-1	ST-103	IA_1	IA
44264	Hemokultúra	HU	21-1-1-3-1-1-1-6	ST-104	IA_1	IA
44261	Hemokultúra	HU	21-1-1-3-1-1-1-6	ST-104	IA_1	IA
56853	Szív implant.	HU	1-1-1-3-1-1-1-6	ST-105	IA_1	IA
P. acn33*	Csarnokvíz	Fr	1-1-1-5-1-4-8-2	ST-2	IA_2	IA
P. acn17*	Cornea minta	Fr	1-1-1-5-3-5-8-7	ST-22	IA_2	IA
P. acn31*	Csarnokvíz	Fr	1-1-1-13-1-4-8-2	ST-36	IA_2	IA
6609**	Normál bőr	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
89071	Felszíni seb	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
96088	Bőr	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
102778	Izületi aspirát.	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
1945	Pleurális asp.	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
4837	Sebészeti asp.	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
10738	Seb arcról	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
16703	Otitis media	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
20527	Hemokultúra	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
14179	Hemokultúra	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
23766	Seb arcról	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
24728	Traumatológiai	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
45808	IUD	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
51056	Intraorális absc.	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
58828	Conjunctiva	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
57826	Conjunctiva	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
61489	Appendicitis	HU	1-1-1-4-1-4-8-6	ST-5	IB	IB
80329	Tályog	HU	1-1-1-4-1-4-8-31	ST-12	IB	IB
74873	Hemokultúra	HU	1-1-1-4-1-4-8-21	ST-42	IB	IB
67060	Felszíni seb	HU	1-1-1-4-1-4-8-21	ST-42	IB	IB
101320	Sebészeti minta	HU	1-1-1-4-1-4-8-34	ST-98	IB	IB
24763	Hasűri minta	HU	1-1-1-4-1-4-26-6	ST-99	IB	IB
PRP-38*	Acne	UK	9-1-4-8-6-8-14-14	ST-70	IC	IB(IC)
72995	Sebészeti minta	HU	15-4-2-4-2-3-10-10	ST-7	II	II
44073	Hemokultúra	HU	15-4-2-4-2-3-10-10	ST-7	II	II
65763	Hemokultúra	HU	15-4-2-4-2-3-10-10	ST-7	II	II
65311	Hemokultúra	HU	17-9-2-4-2-3-10-10	ST-25	II	II
ATCC11828*	Subcut. tályog	USA	17-4-2-4-9-12-10-13	ST-27	II	II
76618	Hemokultúra	HU	17-4-2-4-2-6-10-12	ST-30	II	II
6187	Hemokultúra	HU	17-4-2-4-2-6-10-12	ST-30	II	II
12553	Hemokultúra	HU	17-4-2-4-2-3-24-10	ST-96	II	II
63848	Conjunctiva	HU	20-4-2-4-2-6-10-12	ST-100	II	II
46361	Acne	HU	15-4-2-19-2-3-10-10	ST-106	II	II
12S*	Prog. maculár.	Brazil	7-6-3-7-5-9-12-15	ST-32	III	III
Asn12*	Gerinc csig.	UK	7-6-3-7-5-9-13-16	ST-33	III	III
VA2/5*	Bőr (normál)	HU	7-6-3-7-5-9-13-16	ST-33	III	III
Asn13*	Gerinc csig.	UK	7-6-3-11-5-9-13-16	ST-73	III	III
Asn10*	Csípőprotézis	UK	7-6-7-7-5-9-12-16	ST-81	III	III/1

36. táblázat: A különböző típusú *C. acnes* törzsek jellegzetes MS csúcsai a már ismert eMLST típus eredményekkel összevetve

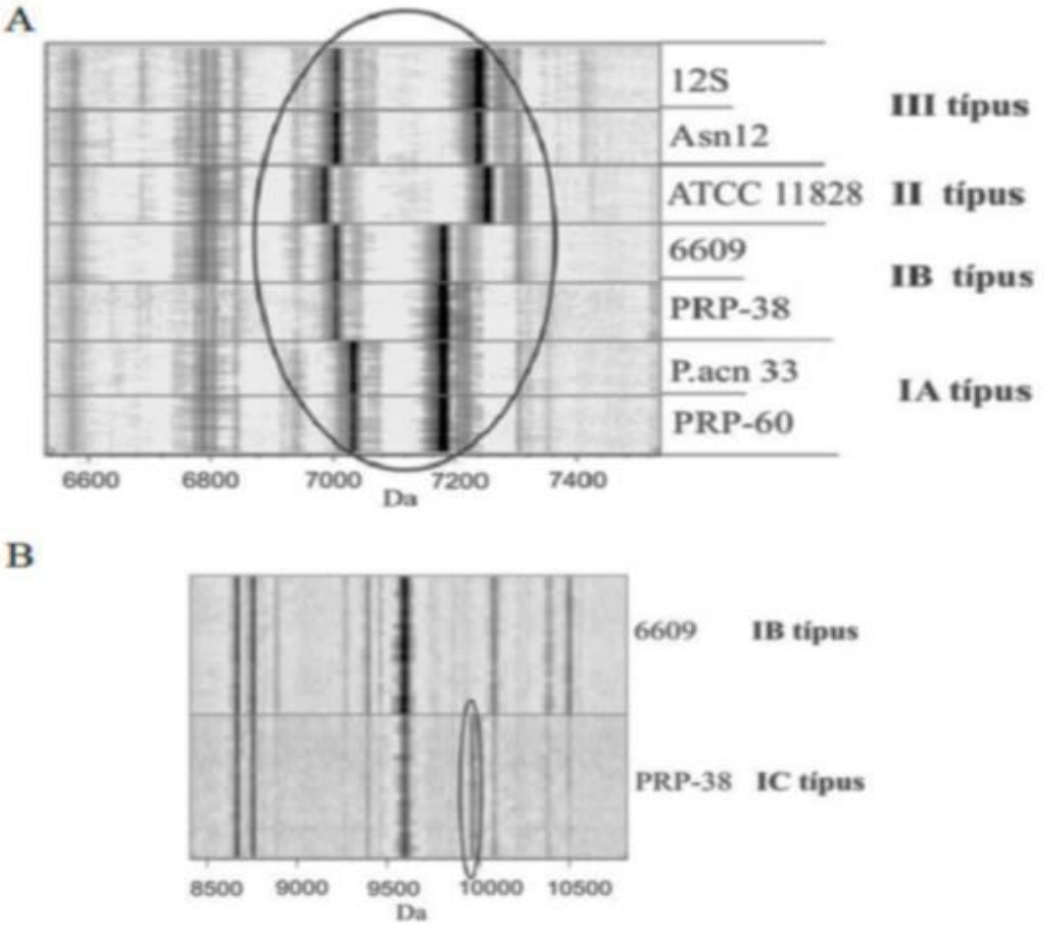
***C. acnes* törzs**	**Jellemző MS csúcsok**	**MS filotípus**	**eMLST filotípus** (McDowell A. *et al*. 2012)
PRP-60	7034, 7180	IA	IA_1
P. acn 33	7034, 7180	IA	IA_2
P. acn 17	7034, 7180	IA	IA_2
P. acn 31	7034, 7180	IA	IA_2
6609	7004, 7180	IB	IB
PRP-38	7004, 7180, 9950	IB/(IC)	IC
ATCC11828	6985, 7525	II	II
76618*	6985, 7525	II	II
12S	7004, 7238	III	III
Asn12	7004, 7238	III	III
Asn10	7063, 7238	III/1	III
VA2/5	7004, 7238	III	III
Asn10	7004, 7238	III	III

*Frissen izolált hemokultúra törzs, az eMLST a vizsgálat kezdetén készült el

11. ábra: A referencia *C. acnes* izolátumok gél-alapú tömegspektrum felvétele

A: az azonosítás alapjául szolgáló tömegspektrum különbségek az adott izolátumokban. Az I-es filogenetikai csoportba tartozó összes izolátumnál megtalálható a 7004Da régióban lévő spektrum.

B: 9950 Da régióban a PRP-38-as az eMLST alapján IC típusnak azonosított mintában egy további spektrum látható, ami így segítségül szolgál az IC izolátumok azonosítása során



6. MEGBESZÉLÉS

6.1. Vizsgálatok a *C. difficile* törzsekkel

A hipervirulens *C. difficile* 027-es PCR ribotípusú járványtörzs megjelenése az USA-ban és Kanadában, majd az európai országokban történő járványos elterjedése után a *C. difficile* törzsek izolálása és tipizálása iránti érdeklődés óriási mértékben nőtt, azonban a kelet-európai országokból -köztük Magyarországról- nagyon kevés adat áll rendelkezésre. Vizsgálataink során a *C. difficile* ribotípusok elterjedésének térbeli és időbeli változását hasonlítottuk össze Magyarország különböző területeiről, egymást követő időszakokban gyűjtött törzsek esetén a korábbi nemzetközi és az előző hazai ribotípusos vizsgálataink eredményeivel. A különböző ribotípusok eloszlásával összefüggésben mind hazai, regionális, mind nemzetközi különbségeket figyeltünk meg és az egyes ribotípusok prevalenciájának változása az idő múlásával is nyilvánvaló volt. Legelső vizsgálataink során a klasszikus agarózgél alapú ribotipizálást használtuk a *C. difficile* izolátumok epidemiológiai nyomonkövetésére hazánkban (*Saját közlemények*: Urbán E. *et al.* 2001; Terhes G. *et al.* 2004, 2006, 2009a), azonban a későbbi vizsgálatunkban már a kapilláris gélektroforézist (CE) alkalmaztunk a PCR ribotípusok elkülönítésére (*Saját közlemények*: Tóth J. *et al.* 2016).

1998-1999-ben a SZTE klinikáiról 65 *C. difficile* izolátumot gyűjtöttünk, majd Magyarországon elsőként írtuk le a *C. difficile* ribotípusok előfordulásának epidemiológiáját az Egyesült Királyság-beli Anaerob Referencia Laboratóriummal (ARL, Cardiff, UK) közös tudományos együttműködésben, PCR ribotipizálási módszerrel. Ebben a felmérésben 3 hónap alatt 253 hasmenéses székletmintából 57 törzset izoláltunk és egyéb különböző klinikai mintákból (pl. szemváladék, sebváladék, epe- és intra-abdominális minták) 8 törzset. A vizsgált törzsek 15 különböző ribotípusba tartoztak; a leggyakoribb típus, a 087-es ribotípus volt, ez az összes törzs 39%-át, a toxin-termelő törzsek 50%-át tette ki (*Saját közlemények*: Urbán E. *et al.* 2001), a második leggyakoribb ribotípus a 012 (20,0%) volt a harmadik a 001 (12,3%), ami az adott időszakban az Egyesült Királyság-beli adatok alapján ott a kórházi törzsek között a leggyakoribb ribotípus volt. Az 50 toxin-termelő törzs 7 különböző ribotípusba, 15 toxin-negatív törzs 8 különböző ribotípusba tartozott. A toxintermelő törzsek döntő többsége, 46 (92%) három különböző PCR ribotípusba tartozott. Ebben az időszakban gyűjtött törzsek között nem találtunk binary toxin-termelő, illetve toxin A-negatív és toxin B-pozitív törzseket és egy új, eddig még nem leírt ribotípust fedeztünk fel a hazai törzsek között.

2002-ben három magyarországi régióból gyűjtöttünk törzseket és a vizsgált száztizenkét *C. difficile* törzsből az A toxin és a B toxin gének együttes jelenlétét 79 törzsben találtuk meg. A toxintermelő izolátumok nem rendelkeztek delécióval, vagy inszercióval a toxin A gén ismétlődő 3' régiójában, de két törzs, melyeket hasmenéses székletmintákból izoláltunk, binary toxin gént hordozott. A két törzs PaLoc szekvenálási elemzésének eredményei azt mutatták, hogy a törzsek a III-as és a IV-es toxin-típusokba tartoztak, amelyek A és B toxint termelnek, a *tcd*A-t és a *tcd*B-t PCR-rel detektáltuk és a citotoxicitási vizsgálatok pozitívak voltak. Ebben az időszakban úgy tűnt, hogy Magyarországon a binary toxin-termelő törzsek elterjedtsége jelentősen eltért a nemzetközi tanulmányok adataitól; ezt az eltérést a vizsgált izolátumok számának vagy a különböző klónok földrajzi eloszlásának különbségei magyarázhatják (Perelle S. *et al.* 1997; Rupnik M. *et al.* 2003; Stubbs SL. *et al.* 2000). Amikor a tanulmányokban a vizsgált törzsek száma alacsony volt, a binary toxin-pozitív izolátumok

előfordulása magas volt (8,3 és 23,5% között); ha a vizsgált törzsek száma nagy, a becsült előfordulási arány 1,6%- (Japán) és 5,5% között mozgott (Rupnik M. *et al.* 2003). Érdekes, hogy a felmérésünk során izolált két binary toxin-pozitív izolátum olyan járóbetegekből származott, akiknek korábban nem volt kórházi kezelése. Eseteinkben a binary toxin patogenitásban betöltött szerepét nem lehetett egyértelműen meghatározni az A toxin és B toxin egyidejű jelenléte miatt. Ebben az időszakban már a molekuláris diagnosztikai eljárásokat széles körben alkalmazták a toxin variáns törzsek kimutatására, de a binary toxin szerepe a *C. difficile*-által okozott kórképekben még nem volt világos. Az általunk izolált két binary toxin-pozitív és toxin A toxin-, B toxin-pozitív izolátum azt sugallta, hogy ez a típus előfordulhat nem csak kórházi környezetben, hanem a közösségben szerzett hasmenéses esetekben is.

A 2002-2004 közötti ribotipizálási vizsgálatunkat kiterjesztettük: három magyarországi laboratóriumból gyűjtött 105 izolátum vizsgálata során összesen 23 különböző ribotípust találtunk, és a cardiffi törzstenyészet gyűjteményben a *C. difficile* PCR ribotípus könyvtárában rögzített mintákkal való összehasonlítás során 5 új ribotípust fedeztünk fel, amelyeket 161, 162, 164, 165 és 166 PCR ribotípusoknak neveztek el (*Saját közlemények*: Terhes G. *et al.* 2006). A vizsgált időszakban a magyarországi izolátumok közül a leggyakoribb típusok a 014 (24,8%), 002 (13,3%) és 085 (8,6%) PCR ribotípusok voltak, a toxin-negatív törzsek többsége a 085 PCR ribotípushoz (9/22 izolátum) tartozott. Az előző tanulmányunkhoz képest a domináns ribotípusok különbözőek voltak, és jelentős eltérést találtunk a régiók között is. Ebben a vizsgált időszakban sem találtunk még A toxin-negatív és B toxin-pozitív izolátumokat.

A 027-es PCR ribotípusú *C. difficile* törzsek által okozott fertőzések első megjelenése Európában a délkelet-Angliában lévő Stoke Mandeville kórházban okozott járvány volt 2004/2005-ben (Brazier JS. *et al.* 2007). Az első magyar 027-es ribotípusú *C. difficile* törzset 2007-ben izoláltuk és erősítettük meg toxinstátuszát, illetve ribotípusát molekuláris módszerrel (*Saját közlemények*: Terhes G. *et al.* 2009b). Velünk párhuzamosan közölték a járványtörzs által okozott esetek -ekkor még szórványos- előfordulását számos más országban: Hollandiában: Goorhuis A. *et al.* 2007, Írországban: Long S. *et al.* 2007, Németországban: Kleinkauf N. *et al.* 2007, és Finnországban: Lyytikäinen O. *et al.* 2007. Mivel ebben az időszakban már megjelentek a magyarországi kórházakban is a súlyos és gyakran rekurrens CDI esetek (bár még csak szórványosan, a bejelentés nem kötelező volta miatt pontos adatok nem ismertek) feltételeztük a hipervirulens 027-es ribotípusú törzsek terjedését az országban, ezért a binary toxin-pozitív törzseket választottuk ki további PCR ribotipizálásra. A vizsgált 8 törzsből azonban csak 1 törzs bizonyult 027-es ribotípusúnak, 4 törzs a 078-as ribotípusba tartozott, míg a fennmaradó három a 131-es ribotípusba tartozott (*Saját közlemények*: Terhes G. *et al.* 2009a). A szintén hipervirulens 078-as ribotípusú törzsek az 51-62 éves korosztályba tartozó betegekből származtak, három esetben kórházi-nozokómiális infekcióból származott a minta, egy esetben azonban nem volt előzetes hospitalizáció. A vizsgált időszakban a hazánkban gyakori 078-as ribotípus prevalenciája 2005-2008 között Hollandiában 3%-ról 13%-ra változott, ott a 078-as ribotípusú törzseket sokkal gyakrabban izolálták fiatalabb betegekből és közösségben szerzett hasmenéses esetekből (Goorhuis A. *et al.* 2008).

2010-ben és 2011-ben -viszonylag későn a nyugat-európai országokhoz képest- a jelentések alapján a hipervirulens *C. difficile* 027-es ribotípusú törzsek által okozott infekciók Magyarországon egyre inkább gyakoribbá váltak a különböző kórházakban. A Humán Patogén Anaerob Baktériumok Nemzeti Referencia laboratóriumába az ország különböző részeiről

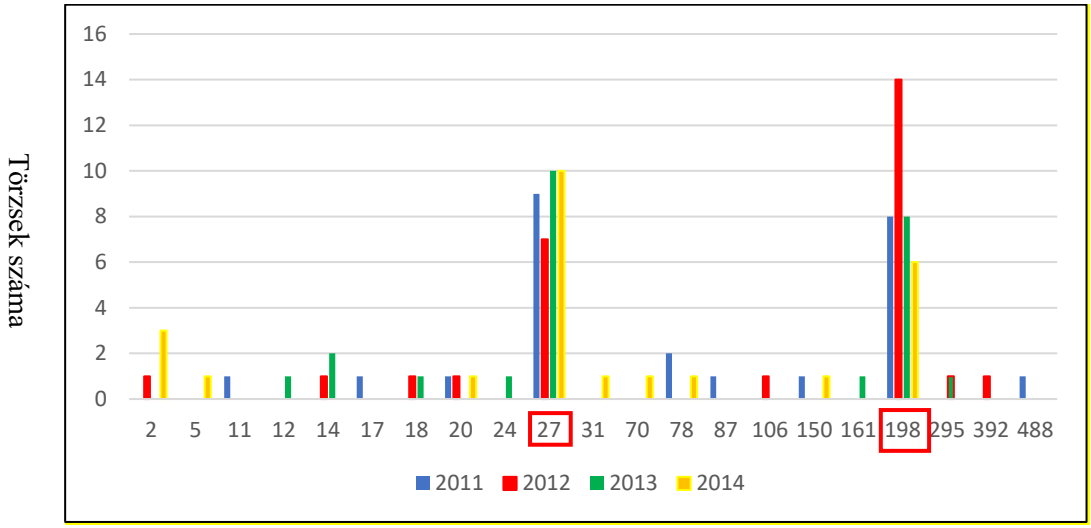
beérkezett hasmenéses székletmintákból kitenyésztett nagy számú *C. difficile* törzs species szintű megerősítése történt meg biokémiai módszerekkel, illetve a törzsek toxin státuszának ellenőrzése PCR vizsgálattal. Teljes körű ribotipizálást nem végeztünk az összes izolátum esetében ezekben az években; csak a toxinok termeléséért felelős gének jelenlétének meghatározását, illetve az összes binary toxin gén pozitív izolátum esetében az agaróz gél sávminták összehasonlítását végeztük el, a PCR ribotípus 027 referencia törzsekkel. A referencia laboratóriumba 2010-ben Magyarország nyolc különböző régiójából küldött 601 toxin-termelő *C. difficile* izolátum 30,4%-a bizonyult 027 ribotípusúnak. Öt egyéb binary toxin-pozitív izolátumot találtunk, ezek közül három a 078-as; kettő a 023-as ribotípusba tartozott. 2011-ben 699 izolátumot vizsgáltunk hasonló módon, 11 különböző laboratóriumból kaptuk a törzseket és az izolátumok 50,2%-a bizonyult a 027-es ribotípusúnak.

Ebben az időszakban hét, más ribotípusba tartozó binary toxin-pozitív izolátumot találtunk, négy a 078-as; egy a 023-as ribotípusba, kettő a 045-ös ribotípusba tartozott. Érdekes módon mindkét évben jelentős különbségek mutatkoztak a 027-es ribotípusú izolátumok prevalenciájában az ország különböző régióiból származó toxin-termelő törzsek között: Szegeden 2010-ben csak a 106 törzs 4%-a, illetve 2011-ben a 139 törzs 8%-a tartozott a 027 ribotípusba, míg Budapesten 2010-ben a 282 törzs 40%-a, majd a következő évben a 252 izolátum 86%-a bizonyult ennek a ribotípusnak, ami igen jelentős különbségeket mutatott a hipervirulens törzs elterjedésében Magyarország különböző régióiban ebben az időszakban.

2011–2014 között Magyarország különböző régióiból három laboratórium (Budapest, SE Mikrobiológiai Részleg, DEOEC Orvosi Mikrobiológiai Intézet, SZTE ÁOK KMDI) vett részt évente 25-25 *C. difficile* izolátummal egy páneurópai vizsgálatban a *C. difficile* antibiotikum-rezisztenciával kapcsolatban, ebben a vizsgálatban a ribotípusok eloszlását is meghatározták ("The extended ClosER study") (*Saját közlemények:* Freeman J. *et al.* 2015) (Freeman J. *et al.* 2019). Huszonnyolc ország 40 laboratóriumából gyűjtött 3499 izolátumot vizsgáltak, melyek 95%-a (3338/3499) volt toxin-termelő. Az egész, öt éves periódusra vonatkoztatva a leggyakoribb ribotípus az összes (264 különböző ribotípus) közül a 027-es ribotípus volt (átlag prevalencia 11,4%). Bár a ribotípusok prevalenciája igen jelentősen változott az országok között és a vizsgált években, a tíz leggyakoribb ribotípus (közte a 027, 014, 072, 001 és 078) prevalenciája az első négy évben még stabil maradt (a 027-es ribotípus: 12,2%; 11,8% 12,6%; 11,3% és 11,8% évenként).

A 027-es ribotípus prevalenciája magas volt Lengyelországban, az első három évben (nem vettek részt a további 2 évben) és Magyarországon az első évben, Ciprusban a prevalencia évről-évre emelkedett 28%-ról 89%-ra. A CE-alapú ribotipizálási módszer alapján az első évben tizennégy különböző ismert ribotípust találtak a magyar izolátumok között, amelyekben a 027-es ribotípus nagyon magas dominanciája volt jellemző (az összes magyar törzs 70,7%-a), a második évben ez már csak 56%, a harmadik évben jelentősen csökkent: 38%, míg a negyedik évben 49% volt. A 027-es ribotípusba tartozó törzsek többségét Magyarország központi régiójából (88%) szereztük be; a Szegeden gyűjtött izolátumok közül jóval kevesebb arányban fordult elő a 027-es ribotípus. Feltűnő különbség az, hogy a második leggyakoribb ribotípus a 198-as (éves bontásban: 32%; 52%; 32%; 24%) volt a szegedi törzsek között (**14. ábra**), amely típus nem fordult elő a másik két laboratórium törzsei között, a többi országban sem fordult elő, illetve minimális számú volt. Érdekesség, hogy ebben a vizsgálatban a magyarországi izolátumok között még viszonylag szűkebb volt a diverzitás, jóval kevesebb ribotípust találtak, mint a többi európai országban.

14. ábra: A ClosER study szegedi törzseinek ribotípus megoszlása a vizsgálat évei alatt



Pirossal jelölve a két leggyakoribb ribotípus

2012–2013-ban az egész Európára kiterjedő pont prevalencia vizsgálat (EUCLID) során az adatokat és a mintákat minden laboratóriumban ugyanazon az egy-egy adott napon a téli-, és a nyári időszakban gyűjtötték össze. A vizsgálat egyik része volt, hogy az izolált törzseket ribotipizálják: a 7297 székletmintából izolált 1211 törzset megvizsgálva 138 különböző *C. difficile* ribotípust találtak. A 027-es *C. difficile* ribotípus volt a leggyakoribb -ezek 88%-a négy országból: Németország (43,5%-a az összes 027-nek), Magyarország (17,5%), Lengyelország (16,1%) és Románia (11,7%) származott-, majd következő ribotípusok követték gyakoriságban: 001/072; 014; 002. Ebbe a tanulmányba 10 magyarországi kórház kapcsolódott be (többnyire Budapesten található és a SZTE) és az innen összegyűjtött, a kritériumoknak megfelelő székletmintákból 270 *C. difficile* törzset izoláltak. A hazai törzsek közül 181 (67,0%) tartozott a 027-es ribotípushoz. A *C. difficile* ribotípusok diverzitása Európában sokkal szélesebb volt, mint az előző 2008-as vizsgálatban: 138 ribotípus 20 országból vs. 65 ribotípus 26 országból (Bauer MP. *et al.* 2011). A 027-es ribotípus összes prevalenciája több, mint háromszorosára emelkedett a két vizsgálat során (5%-ról 18%-ra), bár igen jelentős különbségek voltak az országok között; a 2008-as magas 027-es ribotípus endémia az Egyesült Királyság/Írországból áttevődött Németországba és Kelet-Európába 2012-ben (Davies KA. *et al.* 2014).

2014-ben végzett tanulmányunkban az volt a célunk, hogy egy adott időszakon belül törzseket gyűjtsünk két nagy laboratóriumból, amelyek az ország két régióját reprezentálják, és értékeljük a ribotípusok prevalenciáját a különböző korcsoportok, a fekvőbetegek és a járóbetegek között; meghatározzuk a ribotípusok eloszlásának regionális különbségeit CE-alapú ribotipizálással. A 027-es ribotípus, bár csökkenő arányú, de még mindig meglévő dominanciája (33,3%) mellett az összes izolátumban -hasonlóan a korábban megfigyelt trendekhez- jelentős különbség volt megfigyelhető a régiókban a domináns törzstípus arányában. Még mindig szignifikáns különbséget találtunk a 027-es ribotípusú törzsek megoszlása között: Budapesten a város és a régió több kórházából származó betegekből izolált törzsek esetében az összes törzs 45,8%-a, míg a szegedi klinikák különböző részlegeiből izolált betegekből származó törzsek mindössze 20,8%-a volt 027-es ribotípusú. A 036-os ribotípus volt a második leggyakoribb *C. difficile* ribotípus (19,8%) az összes izolátum között; ugyanakkor ismét jelentős különbség volt ennek a ribotípusnak a prevalenciájában is a

Budapesten izolált és a Szegeden izolált törzsek között (10,4% versus 29,1%). Érdekes, hogy míg a hasonló időszakban zajló, de jóval kevesebb törzset reprezentáló ClosER tanulmányban a második leggyakoribb szegedi ribotípus a 198-as volt, azonban ebben a vizsgálatban ezt a ribotípust már nem találtuk.

A két domináns ribotípus mellett számos más ribotípust találtunk, amelyek azonban csak egy-három izolátumot képviseltek, köztük volt néhány olyan, amelyet Ausztriában rendszeresen izoláltak (AI-3, AI-12, AI-75 és AI-83). A vizsgálatunkban a *C. difficile* izolátumok 6,7%-ában talált, 014-es PCR-ribotípust gyakran jelentették Franciaországban is (Barbut F. *et al.* 2007) (a 2002-2004-es adatainkban még a magyarországi izolátumok között a leggyakoribb típus a PCR 014-es /24,8%/ volt), míg a 027-es ribotípussal közeli rokonságot mutató 176-os ribotípus (Valiente E. *et al.* 2012) a budapesti *C. difficile* izolátumok közül a második leggyakoribb volt, de ebben az időszakban, vizsgálataink szerint Szegeden ez a ribotípus nem volt jelen. Ez a ribotípus ebben az időszakban a Cseh Köztársaságban a hasmenéses betegektől izolált *C. difficile* törzsek között domináns volt (Krutova M. *et al.* 2015) és Lengyelországban is jelen volt (Pituch H. *et al.* 2015).

A 036-os ribotípust, amely a *C. difficile* törzsek második legelterjedtebb ribotípusa volt ebben a vizsgálatban és a vezető ribotípus volt a szegedi fekvőbeteg izolátumok között, eredetileg a X. toxin-típusba tartozott, A toxin-negatív és B toxin-pozitív, binary toxin-termelőnek írták le a gének PCR-rel történő kimutatása alapján (Rupnik M. *et al.* 2001/b), azonban egy nemrégiben közzétett tanulmányban egy nemzetközi könyvtár fejlesztéséről - amelyet szabványosított CE-alapú ribotípussal nyertek és négy referenciaközpontban validáltak az USA-ban, Kanadában, Hollandiában és az Egyesült Királyságban (Fawley WN. *et al.*2015), arról számoltak be, hogy a 036-os és a 198-as ribotípusok keveredése a különböző könyvtárakban lehetséges (Valiente M. *et al.* 2012). A klasszikus agaróz gélalapú PCR ribotipizálási módszert használva kimutatták, hogy a 176-os és 198-as ribotípusok csak minimális eltérést mutatnak a sávmintákban a 027-es ribotípushoz képest, és feltételezték, hogy ezek a típusok nemrégiben alakulhattak ki a 027-es PCR ribotípusból. Ezek az irodalmi adatok arra vezettek bennünket, hogy részletesebben megvizsgáljuk a 036-os ribotípus két képviselőjének (ezek olyan izolátumok voltak, amelyek eltérhetnek a korábban A toxin-negatív, és B toxin-pozitív toxin-típusként képviseltektől) és a két szegedi 198-es izolátumnak (amelyeket a pán-európai vizsgálatban találtunk 2011–2012-ben, és abban az időben a második leggyakoribb ribotípus volt Szegeden) toxin génjeit PCR módszerrel és szekvenálással. Mind a négy törzs pozitív volt a binary toxin génekre, valamint a *tcd*A és *tcd*B génekre, amely eredmények arra utalnak, hogy idővel ugyanazon, vagy nagyon szorosan összefüggő ribotípusok keringenek a SZTE különböző klinikai részlegeiben.

A 2018-ban gyűjtött szegedi fekvőbeteg izolátumaink tipizálási 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, ez köszönhető valószínűleg annak is, hogy sok esetben már nem kórházi-nozokómiális az infekció, hanem a megjelent a járóbetegek között is és az esetek egy része ún. behurcolt infekció.

Több tanulmány is azt mutatta, hogy Európában a 027-es ribotípus 2015-ben már nagy mértékben elterjedt a kelet-európai országokban, azonban előfordulási aránya Európa más részein csökkent, vagy nem változott. Saját adataink is azt mutatták, hogy mind országosan, mind helyileg -bár változó előfordulási arányban- a 027-es ribotípus dominanciája töretlen. Ezek az általunk vizsgált és közölt adatok is arra utalnak, hogy a különböző típusú *C. difficile* törzsek epidemiológiája az idővel és földrajzilag is változhat, még az országon belül is igen jelentős regionális különbségek lehetnek. Számos epidemiológiai felmérés más országokban is igazolta a ribotípusok különböző eloszlását: míg például a 027-es ribotípus által okozott járvány előtt a 001-es ribotípus a brit kórházi fertőzések többségében (55%) volt kimutatható, addig Angliában és Walesben a közösségben szerzett fertőzést okozó törzsek csak 7,5% -a volt 001-es ribotípusú (Stubbs *et al.* 1999). Hasonló időszakban Kuvaitban a 097 és 078 PCR-ribotípusok az intenzív osztályok összes izolátumának ~40%-át tették ki (Rotimi VO. *et al.* 2003).

A járvány klón jelenlétét Ázsiában, Latin-Amerikában és Ausztráliában is jelentették, azonban a *C. difficile* (CDI)-vel kapcsolatos fertőzéseket ezekben a földrajzi régiókban általában más ribotípusok okozzák: a retrospektív vizsgálatok azt mutatták, hogy a CDI előfordulása Japánban alacsonyabb volt, mint Európában vagy Észak-Amerikában. 2014 májusától 2015 májusáig a CDI-re vonatkozó prospektív kohorsz-tanulmányt 12 egészségügyi intézményben (20 osztályon) végeztek Japánban (Kato H. *et al.* 2019). A 146 izolátum közül a domináns ribotípus a 018-as volt (29%), majd 014-es (23%), 002-es (12%) és 369-es (11%) ribotípus követte gyakoriság szerint. Három nem 027-es vagy 078-as ribotípusú binary toxin-pozitív izolátumot találtak. Az összes 018-as ribotípusú izolátum rezisztens volt a moxifloxacinnal, a gatifloxacinnal, a clindamycinnel és az erythromycinnel szemben.

Egy másik, friss vizsgálatban 13 thaiföldi tartományban gyűjtött 145 *C. difficile* izolátumot a 2006-2018-as időszakban ribotípus és toxin-gének kimutatásával jellemeztek (Imwattana K. *et al.* 2019). Feltűnően magas (32%) volt az A toxin-negatív, B toxin-pozitív (A-B+) törzsek aránya, de nem találtak binary toxin-pozitív törzset. A leggyakoribb ribotípus a 017 (A-B+ CDT-, 19%) volt, emellett 20 új, toxint nem termelő, illetve A-B+ ribotípus profil került meghatározásra, amelyek a ribotípus profil hasonlóságával kapcsolatban a 017-es ribotípushoz hasonlíthatnak. Nemrég publikált kóreai adatok alapján Szöulban, a vizsgált 593 közösségben szerzett CDI esetben a leggyakoribb *C. difficile* típus a 012 PCR-ribotípus volt, amely a vizsgált törzsek 18,3%-át jelentette, majd a második leggyakoribb a 018-as PCR ribotípus (16,7%) volt (Kwon SS. *et al.* 2017). Közép-Kínában nagyszámú beteganyagot vizsgálva csak 2019-ben számoltak be először a 027-es ribotípusú járványtörzs előfordulásáról (Zhou Y. *et al.* 2019).

Egy brazil közlemény vizsgálta a kórházi betegek *C. difficile* izolátumának molekuláris epidemiológiáját hatéves időszakban (2012-2017) MLST és ribotipizálással. Az izolátumokat 20 szekvencia típusba (ST) sorolták be, amelyek közül hat (30%) új volt és megoszlásuk nagy különbséget mutatott egyetlen kórházon belül is. A klasszikus hipervirulens járvány törzseket (ST1/RT027 és ST11/RT078) nem azonosították, míg az ST42 (majdnem minden 106-os ribotípus) a leggyakoribb, a törzsek 28,9%-ában volt kimutatható és figyelemre méltó, hogy négy új ribotípust találtak (Diniz AN. *et al.* 2019). Lopes Cançado és munkatársai hasonló eredményekről számoltak be egy egyetemi kórház anyagát vizsgálva: az izolátumok között a 014/020-as és a 106-os PCR ribotípus volt (mindegyik 20,6%) a domináns, hat binary-toxin

termelő törzset találtak, de a 027-es és 078-as hipervirulens ribotípusokat nem találtak (Lopes Cançado GG. *et al.* 2018). Egy másik brazil, onkológiai centrumot érintő vizsgálatban az izolátumok döntő többsége ugyancsak a PCR-ribotípus 014/020-es volt, mely a PGFE típusú NAP4 és a XVIII toxin-típushoz tartozik (Costa CL. *et al.* 2017).

A 027-es ribotípus előfordulásának csökkenéséről számolnak be az észak-amerikai földrészről: egy észak-amerikai vizsgálat eredményeit ismertették 2018-ban, ahol 1808 *C. difficile* törzs jellemzésére restrikciós endonukleáz analízis (REA) és antimikrobiális érzékenység vizsgálatot alkalmaztak: a vizsgálatba 2006 és 2009 között, valamint 2012 és 2015 között többcentrumos, több országban randomizált CDI kezelési vizsgálatba bevont betegekből származó izolátumok kerültek bele (Cheknis A. *et al.* 2018). 2015-re a 027-es ribotípus aránya jelentősen csökkent Észak-Amerikában (USA 43%-18%, Kanada: 39%-24%), de a moxifloxacin rezisztens törzsek aránya magas maradt. Ezzel szemben a REA-Y csoportba tartozó 014/020-as ribotípusú és a 106-os ribotípusú törzsek, amelyek mindkét esetben a moxifloxacinnal szemben alacsony rezisztenciával bírtak, megnövekedtek a prevalenciában (Y törzs US: 6%-17%, Kanada: 11%-23%, 106-törzs USA: 1%-11%, Kanada: 0%-8%). Míg Észak-Amerikában, az Y törzs (014/020-as ribotípus) mindkét időszakban elterjedt, a DH törzset (106-os ribotípus) ritkán azonosították. 2011-2017 között 26 Egyesült Államok-beli kórházban gyűjtött 940 *C. difficile* izolátum PCR ribotipizálása történt meg (Tickler IA. *et al.* 2019). A 027-es ribotípus aránya a három periódusban szignifikánsan csökkent: 31% volt 2011-2012-ban, 22% 2013-2014-ben és 14% 2015-2017-ben. A 106-os ribotípus prevalenciája ezzel szemben jelentősen emelkedett, 7%-ról 19%-ra, hasonlóan az 56-os és a 002-es ribotípusokéhoz (3%-ról 10%-ra), míg az összes egyéb ribotípus aránya a vizsgált időszakok alatt állandó maradt.

Ezek a vizsgálatok arra utalnak, hogy a 027-es ribotípustól eltérő esetleges hipervirulens törzsek véletlenszerű előfordulásban keringhetnek a kórházakban, és ez kiemeli a keringő törzsek nemzeti szinten történő folyamatos felügyeletének fontosságát.

Míg a *C. difficile* ribotípusok első könyvtára a klasszikus agarózgél alapú sávminták elemzése alapján a kezdetekben 116 ribotípust különböztetett meg (Stubbs SL. *et al.* 1999), ma már a módszerek finomodásával több, mint 650 ribotípust azonosítottak (Fawley WN. *et al.* 2015). A *C. difficile* PCR ribotípusainak nagy változatossága ma és az új ribotípusok folyamatos evolúciója nem jelenik meg a nemzetközileg elfogadott WEBRIBO-ban (http://webribo.ages.at) vagy a CE-alapú konszenzus könyvtárban, melyeket jelenleg használnak a különböző európai szintű tanulmányok során, így problémát jelenthet az epidemiológiailag fontos változások követése. Saját adataink is azt bizonyítják (**37. táblázat**), hogy a *C. difficile* által okozott infekciók epidemiológiájának folyamatos nemzetközi-hazai molekuláris felügyelete fontos az ismert járványtörzsek előfordulásának nyomon követésére és új potenciális epidemiológiai jelentőségű törzsek megjelenésének kimutatására.

37. táblázat: A 1998-2018-ig terjedő időszakban történt vizsgálatok összefoglalása

A törzsgyűjtés ideje	Résztvevő laboratóri-umok száma	Izolátumok száma	Ismert ribotípusok/ új ribotípusok száma	Domináns ribotípusok (%)	Binary toxin pozitív törzsek (ribotípusok) száma *	Re-ferencia
1998-1999	1	65	14/1	087 (38,4) 012 (20,0) 001 (12,3)	0	Urbán E. *et al.* (2001)
2002-2004	4	83	17/3	014 (24,8) 002 (13,3) 012 (8,4)	1 (023) 1 (075)	Terhes G. *et al.* (2006)
2006-2007	4	120	nt	nt	1 (027) 4 (078) 3 (131)	Terhes G. *et al.* (2009a)
2010	8	601	nt	027 (30,4)	183 (027) 4 (egyéb ribotípusok)	Nagy E. (2014)
2011	11	699	nt	027 (50,2)	351 (027) 7 (egyéb ribotípusok)	Nagy E. (2014)
2011-2012	3	75	14/0	027 (70,7) 198 (10,6) 078 (5)	53 (027) 4 (078)	Freeman J. *et al.* (2015)
2012-2013	3	75	15/0	027 (56) 198 (16) 020 (4)	42 (027)	Freeman J. *et al.* (2019)
2013-2014	3	75	20/0	027 (38) 198 (10) 014 (6)	29 (027)	Freeman J. *et al.* (2019)
2014-2015	3	75	14/0	027 (58) 198 (12) 014 (7)	44 (027)	Freeman J. *et al.* (2019)
2012-2013	10	270	Nem ismert	027 (67)	181 (027)	Davies *et al.* (2015)
2014	2	192	31/16	027 (33,3) 036 (19,7) 176 (6,7) 014 (6,7)	64 (027) 38 (036) 2 (078) 1 (066)	Tóth J. *et al.* 2016
2018	1	100	25/0	027 (40)	40 (027) 19 (egyéb ribotípusok)	Terhes G. *et al.*

nt: Nincs tesztelve. *A binary toxin gén PCR kimutatásával vagy a ribotípus közzétett toxin-típusa alapján elfogadott. Kékkel kiemelve: domináns ribotípus az adott időszakban. Piros szín: 027-es ribotípusok.

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

Eredményeink alapján a BD GeneOhm Cdiff teszt jobb érzékenységet és specificitást biztosított a toxin-termelő *C. difficile* törzsek közvetlenül székletből történő kimutatására, mint a toxin ELFA vizsgálat. A pozitív minták prevalenciája közvetlenül a székletből a valós idejű PCR-rel magasabb volt (9,7%), mint a „gold standard”-ként használt citotoxicitási vizsgálat esetében (6,3%). A tenyésztést követő citotoxicitási teszttel meghatározott toxin-termelő *C.*

difficile törzsek általános prevalenciája 9,2% volt, így ezek az eredmények hangsúlyozzák a tenyésztési módszer fontosságát is.

Számos tanulmány kimutatta a PCR vagy a valós idejű PCR vizsgálatok jobb teljesítményét toxin-termelő *C. difficile* törzsek kimutatására közvetlenül a hasmenéses székletmintákból: 2002-ben Guilbault és munkacsoportja használt PCR-t a *tcd*B gén nem ismétlődő régiójának kimutatására 59 székletmintából (Guilbault C. *et al.* 2002), a referencia citotoxicitási vizsgálathoz képest ez a módszer 100%-os specificitást és 91,5% érzékenységet mutatott. Bélanger és munkatársai később valós idejű PCR-tesztet fejlesztettek ki a fő toxin génekre (*tcd*A és *tcd*B) (Bélanger SD. *et al.* 2003), ezt alkalmazva van den Berg munkacsoportja két tanulmányt tett közzé valós idejű PCR-vizsgálatokkal a *tcd*B gén kimutatására (van den Berg RJ. *et al.* 2005; 2007). A citotoxicitási vizsgálattal összehasonlítva azonban a teszt érzékenysége és specificitása (87,1%, illetve 96,5%) alacsonyabb volt, mint a Guilbault által közölteké.

Ezek a tanulmányok azt mutatták, hogy jelentős számú minta volt pozitív immuno-assay módszerekkel, de negatív a szövettenyészetre gyakorolt citotoxicitása, toxinogén tenyészete és a valós idejű PCR alapján. Hasonló érzékenységet és specificitást (86%, illetve 97%) találtak Sloan és *mtsai* egy olyan vizsgálatban, ahol valós idejű PCR-t alkalmaztak a *tcd*C gén kimutatására és összehasonlították a toxinogén tenyészettel (Sloan LM. *et al*. 2008). Stamper és munkacsoportja 404 székletmintát vizsgált meg a BD GeneOhm Cdiff teszttel, a sejttenyészet citotoxicitási teszttel és toxinogén tenyészettel, a pozitív minták prevalenciája mind a PCR, mind a citotoxicitási vizsgálat során 10% volt (Stamper PD. *et al.* 2009). Összehasonlítva a citotoxicitási vizsgálattal, mint referencia módszerrel, a BD GeneOhm Cdiff teszt érzékenysége, specifitása, PPV és NPV értéke 90,9%, 95,2%, 70,2% és 98,8% volt.

Saját vizsgálatunkban a következő eredményeket kaptuk: az érzékenység, a specificitás, a PPV és az NPV 96,4%, 99,01%, 92% és 100% volt. A PCR módszer gátlása (inhibitoros minták) vizsgálatunkban 0,6% (4/600) volt; hasonlóképpen Stamper a tanulmányában három mintában mutatott ki inhibitorokat. Vizsgálatunkban két minta csak valós idejű PCR-rel volt negatív, míg a citotoxicitási módszerrel, a Vidas ELFA módszerrel és a tenyésztést követő toxin kimutatási teszttel pozitív; hasonló megállapításokat közöltek Stamper és munkatársai is, akik négy mintát találtak, amelyek a valós idejű PCR-rel negatívnak bizonyultak. Ennek lehetséges magyarázata az, hogy egyes törzsek eltérő *tcd*B gént hordozhatnak, és ez a primer-annealing kudarcát eredményezheti, vagy a székletmintában lévő target DNS kópiaszáma a PCR-teszt kimutatási határa alatt volt. A BD GeneOhm Cdiff assay gyors és megbízható eszköz a toxin-termelő *C. difficile* kimutatására a hasmenéses mintákból, mind specificitása, mind szenzitivitása felülmúlja az összes ismert hagyományos módszert, így használata gyorsabb, megbízhatóbb eredményeket adhat. A CDI gyors és pontos diagnosztizálásával csökkenthető a kórházi ellátás teljes költsége és a beteg kórházi ápolásának időtartama, elkerülhető a felesleges antibiotikum kezelés, így a további lehetséges nozokómiális fertőzések száma is csökkenhet.

A *C. difficile* törzsek antibiotikum érzékenysége

A *C. difficile* fertőzéseket, ezek súlyosságát, kimenetelét, illetve a relapszusok, reinfekciók prevalenciáját befolyásolja a specifikus, domináns *C. difficile* törzsek elterjedtsége,

amelyek igen jelentősen meghatározzák a törzsek antimikrobiális érzékenységét. Első vizsgálatainkban 2002-2003-ben gyűjtött 20, és 2006-2007-ben gyűjtött 80 toxin-termelő *C. difficile* törzs antibiotikum érzékenységi vizsgálatát végeztük el öt antibiotikummal szemben, majd ezt megismételtük kétszáz, 2008 és 2010 között gyűjtött toxin-termelő izolátummal.

Az első időszakban még nem volt a törzsek között 027-es PCR ribotípus, a második periódusban már zajlott a nemzetközi pandémia, így ebből a válogatásból az összehasonlíthatóság miatt a 027-es ribotípusú törzseket kihagytuk. A vizsgált törzsek között egyik időszakban sem találtunk metronidazol rezisztens törzset sem az akkor érvényben lévő CLSI, sem az EUCAST határértékei szerint. A mért metronidazol MIC határok között szignifikáns változást nem tapasztaltunk a két időszakban, 2002-ben és 2006-2007-ben MIC_{50} 0,25 mg/l, míg 2008-2010-ben 0,5 mg/l, a MIC_{90} értéke nem változott. Ha az ún. „geometriai középérték" MIC változását nézzük, emelkedő tendenciát tapasztaltunk a metronidazol vonatkozásában: 2002-2003-ban a geometriai MIC középérték 0,184 mg/l, 2006-2007-ben 0,268 mg/l, 2008-2010-ben 0,352 mg/l volt.

Az erythromycin, clindamycin és moxifloxacin esetében a MIC_{50} és a MIC_{90} értékek nem változtak szignifikánsan, csak egy kismértékű rezisztencia arány emelkedést tapasztaltunk az erythromycin és a clindamycin esetében. 2008-2010-ben a törzsek 17%-a volt rezisztens csak erythromycinre és/vagy clindamycinre, míg a törzsek 9%-a esetében mutattak társ-rezisztenciát a makrolid/linkózamid és a moxifloxacin között, 10%-a a törzseknek mutatott társ-rezisztenciát makrolid/linkózamid, moxifloxacin és rifampicinnel szemben, míg csak 5 törzs (2%) volt rezisztens egyedül a moxifloxacinra és egy törzs volt rezisztens csak rifampicinre. Az előző 2006-2007-es periódusban a törzsek 37,5 %-a volt rezisztens csak erythromycinre és/vagy clindamycinre, 16,25%-uk mutatott társ-rezisztenciát a makrolid/linkózamid és a moxifloxacin között, csak 5 törzs (6,25 %) bizonyult rezisztensnek a makrolid/linkózamid, moxifloxacin és rifampicinnel szemben együttesen.

Vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy a társ-rezisztencia a makrolid/linkózamid, moxifloxacin és rifampicin esetében megjelent és jelentősen emelkedett a nem 027-es ribotípusú törzsek esetében is. A rifampicin esetében a mért MIC szélső értékek meglehetősen tág határok között változtak (≤0,002-≥32 mg/l); 2008-2010-ben a törzsek 11,5%-a magas fokú rifampicin rezisztenciát mutatott (MIC ≥32 mg/l), míg a 2006-2007-es időszakban csak 6,25%. Ennek ellentmondanak a ClosER felmérés eredményei, ahol a rifampicin rezisztens izolátumok aránya -ha kis mértékben is- de csökkent: az első évben észlelt 13,5%-ról 10,2–11,8%-ra a 4.-5. évben (Freeman J. *et. al*. 2019).

Az általunk vizsgált időszakokban a magyarországi *C. difficile* törzsek között csökkent metronidazollal szemben érzékenységű törzseket nem találtunk. Ezzel szemben Peláez és munkacsoportja első közlése alapján 8 éves időszak alatt az általuk vizsgált 415 törzs 6,3%-a metronidazolra csökkent érzékenységet mutatott. Később instabilitást tapasztaltak a metronidazol rezisztenciában és a sorozatos passzázsok után a kezdetben metronidazol rezisztens izolátumok alacsony MIC értékeket mutattak (0,125-8 mg/l) és érzékennyé váltak az antibiotikummal szemben (Peláez T. *et al.* 2002; 2008). A cardiffi Anaerob Referencia Laboratóriumban több, mint ezer *C. difficile* törzs vizsgálata történt meg 2000-ig és csak egy törzs mutatott csökkent érzékenységet (MIC 16 mg/l) metronidazollal szemben (Brazier JS. *et al.* 2001). Baines és munkatársai 2005-2006-ban megvizsgálták a gyűjtött *C. difficile* törzsek metronidazol érzékenységét és összehasonlították a 1995-2001 között gyűjtött „történelmi" törzsekével. A leggyakoribb PCR ribotípus a 001-es esetében a törzsek 24,4 %-a mutatott

csökkent érzékenységet, míg a 106-os és a 027-es PCR ribotípusok esetében nem találtak hasonló adatokat (Baines SD. *et al.* 2008). Egy svéd egyetemi kórházban a vizsgált 238 *C. difficile* izolátum mindegyike érzékeny volt metronidazolra (Aspewall O. *et al.* 2006). 2005-ben tizennégy európai országból 316 *C. difficile* törzset gyűjtöttek össze, mindegyik törzs érzékeny volt metronidazolra, a MIC_{90} érték 0,125 mg/l volt (Spigaglia P. *et al.* 2011). A ClosER európai antibiotikum érzékenységi felmérés (2011-2015) eredményei azt mutatták, hogy a metronidazol és a vancomycin rendkívül hatékony volt a *C. difficile* törzsek túlnyomó többségével szemben, a metronidazol és vancomycin érzékenység emelkedett (Freeman J. *et. al* 2019). Ez a metronidazol és vancomycin használatának csökkenéséből és/vagy a szélesebb ribotípus váltásból-változásból adódhat. A MIC geometriai középértéke 0,46 mg/l volt a metronidazolra és 0,70 mg/l a vancomycinre, érdekes módon csökkent metronidazol érzékenység főként a 027-es és a szinte csak a szegedi törzsek közt jelenlévő 198-es ribotípusú izolátumok között fordult elő.

Lynch és munkacsoportja 2013-ban először közöltek egy stabil, valós, metronidazol rezisztens klinikai izolátumot, amely rezisztens fenotípusúnak mutatkozott a törzs szubinhibitoros metronidazol koncentrációjú táptalajon történő sorozatos passzálása után (Lynch T. *et al*. 2013). A rezisztens izolátumnak a folyékony táptalajban csökkent szaporodása, megváltozott sejtfal szeparációja, csökkent spóra képzése és a vizsgált izolátum szubpopulációjának lassabb szaporodási aránya eredményezi a csökkent metronidazol MIC értékeket. E-teszt módszert és agar-hígításos módszert párhuzamosan használva különbségeket észleltek a mért MIC értékek között; az E-teszt használata esetében a MIC érték 32 mg/l volt, míg az agar-hígításos módszert alkalmazva ez 256 mg/l volt. Lynch és munkatársai kimutatták, hogy ismételt fagyasztások-felolvasztások után a MIC lecsökkent 32 mg/l-ről 2 mg/l-re, ha a táptalaj nem tartalmazott szub-inhibitoros koncentrációban metronidazolt, azonban az E-teszt módszer alapján rezisztensnek bizonyult metronidazolra, köszönhetően a két módszer közötti különbségnek.

Egyes felmérések szerint a clindamycinnel és/vagy erythromycinnel szembeni rezisztencia a leggyakoribb a *C. difficile* törzsek között, a rezisztencia aránya általában magasabb, mint >50 % (Huang H. *et al.* 2009). Dél-kelet Skóciában Mutlu és munkatársai magas fokú erythromycin (94,8 %), clindamycin (62,9 %) és moxifloxacin (87,1 %) rezisztenciáról számoltak be az általuk vizsgált törzsek között 2009-ben, a 149 törzs közül 72 mutatott rezisztenciát az erythromycinnel és a clindamycinnel szemben, 90,9%-a az erythromycin rezisztens, 87,7%-a a clindamycin rezisztens izolátumoknak rezisztens volt a moxifloxacinra is (Mutlu E. *et al.* 2007). Magas fokú multidrug rezisztenciát figyeltek meg az európai országokban 2005-ben: a vizsgált 316 *C. difficile* törzs 47%-a mutatott rezisztenciát legalább egy antibiotikummal szemben, míg ezek 55%-a volt multidrug rezisztens, azaz legalább három antibiotikum csoport tagjaival szemben rezisztensek voltak, az erythromycin rezisztens izolátumok több, mint 60%-a hordozta az *erm*B gént (Spigaglia P. *et al.* 2011). Tickler 2019-ben közölt adatai szerint az USA-ban moxifloxacin, rifampicin és vancomycin rezisztencia aránya csökkent a vizsgált törzsek között az elmúlt években, köszönhetően a 027-es ribotípusú törzsek fokozatos kiszorulásának. A moxifloxacin rezisztens törzsek arányának csökkenése és a tetracyclin rezisztens törzsek arányának növekedése volt jellemző a 027-es ribotípusú törzsekre. Annak ellenére, hogy a 027-es ribotípus aránya összességében jelentősen lecsökkent, a multidrug rezisztens izolátumok aránya ezekben a ribotípusú törzsekben jelentős (Tickler IA. *et al.* 2019).

Magyarországon az erythromycin, clindamycin és moxifloxacin rezisztencia aránya 2006-2007 és 2008-2010 között magas volt, a két időtartam alatt szignifikáns változást nem észleltünk a rezisztens törzsek prevalenciájában. Az erythromycin és/vagy clindamycin rezisztencia gyakran társult a moxifloxacin és/vagy rifampicin rezisztenciával, míg a moxifloxacin vagy rifampicin rezisztencia önmagában nem volt jellemző. A társ-rezisztencia a makrolid/linkózamid, moxifloxacin és rifampicin között szintén emelkedett 6,25%-ról 10%-ra.

A 2005-ös európai felmérésben Spigaglia és munkatársai úgy találták, hogy a multidrug rezisztens törzsek többsége (51/82) rezisztens volt mind a moxifloxacinra mind a rifampicinre Spigaglia P. *et al.* 2011). Ezekben a törzsekben a rifampicinnel szembeni rezisztencia mindig a moxifloxacinnal szembeni rezisztenciával volt összefüggésben, mivel hasonló aminosav csere a felelős ezen antibiotikumok esetében a rezisztenciáért: a Thr-82→Ile aminosav-szubsztitúció a GyrA-ban és az RpoB-ben két aminosav-változás egyidejűleg a His-502 → Asn és Arg-505 → Lys, a moxifloxacinnal és a rifampicinnel szembeni rezisztenciáért felelősek.

A 2011 és 2015 között zajló pán-európai *C. difficile* antibiotikum érzékenységi vizsgálat (ClosER study) megerősítette az előzőleg már publikált meglévő kapcsolatot egyes ribotípusok (pld. 027-es és 001-es) és a moxifloxacinnal, clindamycinnel és a chloramphenicollal szemben kialakult rezisztencia között (Freeman J. *et al*. 2019). A különböző ribotípusok prevalenciájának országok közötti és a vizsgált évek alatti dinamikus változása visszahat az antimikrobiális érzékenység változására is. A többszörös antimikrobiális rezisztencia nyilvánvaló volt az epidémiás ribotípusoknál, de figyelemre méltó volt az egyéb ribotípusoknál is: a 017-es, 012-es, az újonnan felbukkanó 198-as (kizárólag Magyarországon, ezen belül a szegedi törzsek között fordult elő) és a 356-os (kizárólag Olaszországban endémiás) ribotípusok esetén. A vizsgálatban a ribotípusok diverzitása és az antibiotikumok kumulatív rezisztencia score-ok között állandó fordított összefüggést találtak az adott országokban.

Az általunk mért rifampicin MIC szélső értékek viszonylag széles határok között mozogtak, de a vizsgált *C. difficile* izolátumaink többsége alacsony MIC értéket mutatott, míg a rezisztens törzsek általában magas szintű rezisztenciát mutattak. Eredményeink hasonlóak voltak, mint O'Connor és munkatársai által közölt eredmények, az érzékenységi eredményeink szintén bimodális megoszlási mintázatot mutattak nagyon alacsony (≤0,002 mg/l), vagy nagyon magas (≥32 mg/l) MIC értéket mutatva (O'Connor JR. *et al*. 2008), a mért MIC szélső értékeink (≤0,002-≥32 mg/l), MIC_{50} (≤0,002 mg/l) és a MIC_{90} (≥32 mg/l) ugyanazok voltak, mint az amerikai közölt adatok.

Saját adataink azt mutatták, hogy metronidazol rezisztencia a vizsgált törzsek között, a vizsgálat időszaka alatt gyakorlatilag nem jelent meg, a változások az érzékenységi mintázatban nem jelentősek, annak ellenére, hogy egyre több esetben számoltak be a klinikusok metronidazol terápiát követő relapszusokról, klinikai sikertelenségről országunkban. Az erythromycin, clindamycin és moxifloxacin esetében kismértékű rezisztencia növekedést tapasztaltunk, ezen antibiotikumok fokozott felhasználása ellenére (bár a társult rezisztencia mértéke jelentősen emelkedett), míg a rifampicin rezisztencia aránya majdnem megduplázódott.

A fidaxomicin érzékenységi vizsgálatunk során a vizsgált törzsek fidaxomicin MIC értékek megoszlása hasonló megoszlást mutatott, mint az EUCAST adatbázisában található „vad típusú" törzseké (http://eucast.org). A binary toxin-termelő izolátumok (5 törzs) fidaxomicin MIC értéke ≤0,125 mg/l volt és nem találtunk jelentős különbséget a fidaxomicin

érzékenységben az egyéb, más ribotípusba tartozó *C. difficile* törzsek között, hasonlóan az irodalomban közölt adatokhoz (Goldstein EJC. *et al.* 2012; Citron DM. *et al.* 2009). A törzsek fidaxomicin érzékenysége hasonló megoszlást mutatott, mint az előző amerikai vizsgálatok (Hecht DW *et al.* 2007).

A 2011-2014-ben gyűjtött ClosER study eredményei azt mutatták, hogy az 5 év alatt gyűjtött törzsek majdnem mindegyike érzékeny volt fidaxomicinre (MIC ≤1 mg/l) a geometriai MIC középérték 0,04 mg/l volt minden évben. Egyetlen fidaxomicin-rezisztens izolátumot találtak (MIC ≥4 mg/l) az 5. évben, mely Franciaországból származott és a 344-es ribotípusba tartozott. A fidaxomicin MIC értékek a 198-as ribotípusok esetén voltak magasabbak: 0,04–0,10 mg/l a vizsgált évek alatt, a 027-es ribotípusú izolátumok esetében 0,02 mg/l és 0,08 mg/l között változtak. A fidaxomicin MIC értékek következetesen alacsonyak maradtak a vizsgálat öt éve alatt és nem volt bizonyíték arra, hogy a szer 2011-es bevezetése után a rezisztens törzsek számottevően megjelentek volna.

Ez a megfigyelés hasonló volt két, Fázis III tanulmányban közöltekéhez, ahol 1164, hasmenésben szenvedő beteg székletmintájából származó *C. difficile* törzset vizsgálva a fidaxomicin MIC_{90} 0,25 mg/l volt (Goldstein EJC. *et al.* 2011/b), egyetlen olyan *C. difficile* törzset találtak, melyet egy rekurrens infekcióból izoláltak, ahol a fidaxomicin MIC értéke 16 mg/l volt; bár az összefüggés a kezelés előtt, majd utána izolált törzsek között nem volt meghatározva és a kapcsolat a rezisztencia és a szer expozició között nem lett megállapítva. Schwanbeck és *mtsai.* leírták a fidaxomicin rezisztenciát ötven vizsgált klinikai *C. difficile* izolátumból egy esetben (MIC >64 mg/l), a V1143D mutációt a törzs *rpo*B-génben azonosították, A *C. difficile* 630Aerm-be való bevitelnél ez a mutáció csökkentette a fidaxomicin érzékenységét (MIC> 64 mg/l), de csökkent replikációs sebességgel, alacsony A és B toxin-termeléssel járt és jelentősen lassította a spóraképződést. Ezzel ellentétben a klinikai rezisztens törzs, bár mérséklődött a toxin-termelés is, normál szaporodási sebességet mutatott, és csak mérsékelten csökkentette a spóraképző kapacitásokat. Ez azt jelzi, hogy az *rpo*BV1143D allélhoz kapcsolódó fitnesszhiba a klinikai izolátumban kevésbé kifejezett (Schwanbeck J. *et al.* 2019). Az ellenállást közvetítő rpoB V1143D allél várhatónál alacsonyabb fitnessz terhelése a mutánsok in vivo kiválasztása során fellépő kompenzációs mechanizmusok jelzése lehet.

Felméréseink során először vizsgáltuk és közöltük a magyarországi *C. difficile* törzsek antibiotikum érzékenységi adatait, ezek időbeli változását először vizsgáltuk hasmenéses székletmintákból származó törzsek esetében a klinikumban alkalmazott új antibiotikum a fidaxomicin érzékenységét. Azt találtuk, hogy a fidaxomicin egyelőre még a vizsgált *C. difficile* törzsek ellen nagyon jó aktivitást mutat, vancomycin és metronidazol rezisztens izolátumot sem találtunk.

A CDI **extraintesztinális** megnyilvánulása rendkívül ritka, azonban az irodalmi adatok alapján az ebben a betegségben szenvedő egyéneknél magas mortalitási arányt és rossz prognózist figyeltek meg. Smith és King voltak az elsők között, akik leírták az extraintesztinális CDI eseteket: az első eset egy 65 éves férfi volt, aki krónikus pleuritisben szenvedett, ahol a *C. difficile*-t két különböző alkalommal izolálták alsó légúti mintákból, a második eset egy 58 éves férfi volt, akinél pneumothorax és ezt követő pleurális effúzió lépett fel, mindkét esetben a

fertőzések valószínűleg másodlagosak voltak az aspirációval szemben (Smith LD, King EO. 1962).

2013-ban Mattila 10 év anyagát feldolgozó retrospektív vizsgálatot végzett az extraintesztinális CDI-ről a Helsinki Egyetem mikrobiológiai laboratóriumában (Mattila E. *et al.* 2013). Extraintesztinális CDI-t 31 betegnél találták, akik az összes CDI-k 0,17%-át tették ki: két betegnek bakteriémiája volt, 4-nek volt előzetes műtét nélküli hasi fertőzése, hétnél műtét utáni hasi fertőzés lépett fel, négy betegnek perianális tályog alakult ki, 13 esetben különböző sebfertőzésből izolálták a kórokozót (elsősorban bőr- és lágyrész infekciókból), egy betegnél a húgyúti katétert kolonizálta *C. difficile* törzs.

Spanyol mikrobiológusok 21 (az összes CDI eset 1,08%-a) extraintestinális *C. difficile* esetről számoltak be egy egyetemi intézménytől 10 év alatt (García-Lechuz *et al.* 2001), tizenhét esetben tudták a részletes adatokat ismertetni. Az esetek többségében, 12 betegnél anatómiailag a vastagbélhez közeli szervekből vagy testfolyadékokból nyerték a mintát, a következő fertőzések voltak: öt esetben (három elsődleges és két másodlagos) peritonitis, három betegnél hasüregi tályogok és hasi sebfertőzések négy esetben. A másik öt beteg fertőzése nem volt közel a vastagbél anatómiai lokalizációjához: egy eset agyi tályog, két bakterémia és két lábfertőzés (egy krónikus osteomyelitis). Egy eset kivételével mindegyik *C. difficile* polimikrobiális flóra részeként volt jelen. Az izolátumok általában toxint nem termelők voltak és az extraintesztinális fertőzések esetében nem fordultak elő hasmenéses esetek, vagy megelőző antimikrobiális kezelések.

A Mayo Klinika munkatársai szintén egy tízéves periódus retrospektív vizsgálatát végezték el, az extraintesztinális *C. difficile* infekciók helyi epidemiológiáját vizsgálva (Gupta A. *et al.* 2014). Összesen 40 extraintesztinális CDI-t szenvedő beteget azonosítottak: 25 volt abdominális-pelvicus fertőzés, 11 véráramfertőzés, 3 sebfertőzés és 1 tüdőfertőzés. Az esetek 63%-ában a *C. difficile*-t más kórokozókkal együtt izolálták, a fertőzések 85%-a volt kórházi eredetű. Az extraintesztinális CDI-vel kapcsolatos tényezők közé tartoztak a gyomor-bélrendszeri sebészeti beavatkozás (88%), antibiotikum-expozíció (88%), a rosszindulatú daganatok (50%) és a protonpumpa-inhibitor használat (50%). Hasmenést 18 betegnél (45%) észleltek, akik közül 12-nél toxin-termelő *C. difficile* volt kimutatható PCR módszerrel a székletmintákból.

Saját, 10 éves adataink is alátámasztják azt a fentebb irodalmi adatokkal ismertetett tényt, hogy az extraintesztinális CDI nem gyakori: 0-4 eset/év, a vizsgált 10 éves periódusban az összes CDI eset 0,58%-a volt extraintesztinális és gyakran jelentkezett a gyomor-bél traktus műtéti beavatkozása után, illetve összefüggésben volt az intesztinális CDI-vel kapcsolatos jól ismert kockázati tényezőkkel. Érdekesség, hogy a betegek 36,7%-a volt járóbeteg és ezek közül négynek volt valamilyen bőr- és lágyrész infekciója. A legtöbb esetben a *C. difficile* törzs a vegyes, aerob-anaerob flóra egyik tagja volt, csak 4 minta volt a *C. difficile* törzs színtenyészetben, egyedüli kórokozó. A leggyakoribb társpatogének az *E. coli* és az *E. faecalis/faecium* voltak, azonban négy beteg mintájában csak anaerob kórokozó volt jelen a *C. difficile* mellett 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 előfordulású, magyarországi (szegedi) 198-as PCR ribotípusba tartozott.

Kazuisztikaként ismertetett esetünkben bizonyítottan a toxin-termelő *C. difficile* törzs volt felelős az extraintesztinális fertőzésért, nyilvánvaló volt -a társbaktérium előfordulása, illetve, hogy a beteg székletéből nem sikerült *C. difficile* törzset kimutatni- az exogén infekció. Az extraintesztinális CDI kezelése magában foglalja az antimikrobiális és a sebészeti terápiákat is, azonban az extraintesztinális CDI-t a magas halálozási arányú, rossz prognózis jellemzi. Esetenként toxint nem termelő *C. difficile* izolátumokról is beszámoltak, extraintesztinális fertőzés okaként, ami arra utal, hogy a meghatározatlan virulencia faktorok fontosak lehetnek a mikroorganizmus extraintesztinális fertőzésének előmozdításában (García-Lechuz JM. *et al.* 2001; Mattila E. *et al.* 2013; Gupta A. *et al.* 2014). További vizsgálatokra lesz szükség e virulenciafaktorok pontosabb azonosításához.

6.2. Vizsgálatok a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek körében

Bár a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek számos esetben súlyos fertőzéseket okozhatnak, a kezelést sok esetben még mindig empirikusan történik, főként az aerob és anaerob baktériumok ellen is hatékony, széles spektrumú antibiotikumok alkalmazásának elterjedése miatt. Tanulmányok kimutatták, hogy a nem megfelelő anaerob-ellenes antibiotikum terápia alkalmazása klinikai kudarchoz vezethet (Goldstein EJC. *et al.* 2011/b). Az anaerob baktériumok izolálása és azonosítása, amelyet a szakma szabályai szerint végzett, szigorú kritériumok szerint zajló antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok követnek, rendkívül időigényes. A vizsgálatok költsége és összetettsége, valamint az a feltételezés, hogy az anaerob baktériumok érzékenységi mintázatai kiszámíthatóbbak, ezeknek a kórokozóknak a kevesebb, pontatlanabb rutinszerű vizsgálatát eredményezik a különböző országokban.

Európában kevés ország végez rendszeresen olyan antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat az anaerob baktériumok körében megfelelő számú friss humán klinikai izolátumon, amelyek célja az egyes antibiotikumokkal szembeni rezisztencia alakulásának nyomonkövetése. A *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek antibiotikum-érzékenységére vonatkozó **első**, egész Európában végzett tanulmányban **1988-1989**-ben (Phillips I. *et al.* 1992) 1289 klinikai izolátumot gyűjtöttek össze 15 ország 22 laboratóriumából. A **második** vizsgálatban, **1999-2001**-ben (Hedberg M, Nord CE. 2003) 1284 klinikailag releváns *Bacteroides* izolátumot 19 ország 22 laboratóriumából gyűjtöttek össze. Ezek a közlemények az eltelt mintegy 10 éves időszak alatt számos anti-anaerob szerrel és néhány újabb β-laktám antibiotikummal szembeni regionális eltérésekről és változó mértékben, de növekvő rezisztenciáról számoltak be. Vizsgálataik alapján a különböző *Bacteroides* fajok és a különböző klinikai forrásokból származó izolátumok között az egyes antibiotikumokkal szembeni rezisztencia-különbségeket észlelték.

Az általunk kivitelezett **harmadik európai** *Bacteroides/Parabacteroides* antibiotikum érzékenységi vizsgálat -amelyben 13 európai országból származó 824 izolátumot vizsgáltunk- célja részben az volt, hogy a *Bacteroides/Parabacteroides* fajok esetében a rezisztencia-viszonyok alakulását nyomon kövessük európai szinten az elmúlt 20 évben:

Ebben a vizsgálatban az ampicillin esetében ha a ≥64 mg/l-es határértéket vizsgáltuk, az összes izolátum 44,5%-a bizonyult magas szinten rezisztensnek, ami az utolsó két nagy

európai vizsgálathoz képest jelentős növekedés jelentett, mivel azokban az izolátumok 16%-a és 27%-a bizonyult magas szinten rezisztensnek (MIC ≥64 mg/l). Az összes izolátumot vizsgálva feltűnően megnőtt az amoxicillin/klavulánsav rezisztens törzsek aránya (10x növekedés) az előző európai vizsgálatokhoz képest. A piperacillin/tazobaktám MIC meghatározásakor kismértékű növekedést találtunk a rezisztens törzsek arányában a 2003-ban közölt tanulmányhoz képest, ahol a törzsek csak kevesebb, mint 1%-a bizonyult rezisztensnek a CLSI határértékeket alkalmazva, azonban érdekes, hogy sokkal magasabb rezisztencia arányokat találtunk a *P. distasonis* törzsek között (14,3%). Snydman többcentrikus tanulmánya tíz orvosi központból gyűjtött 5225 *Bacteroides* izolátumot vizsgált az Egyesült Államokban 1997 és 2004 között (Snydman DR. *et al.* 2007), igen alacsony rezisztencia arányokat találtak a piperacillin/tazobaktám esetében a 8 éves vizsgálati időszak alatt: összesen 0,5%-a az izolátumoknak volt rezisztens, míg a jelen európai vizsgálatunk az összes törzs esetében 3,1%-os rezisztenciát mutatott. A cefoxitin esetében a három európai nagy nemzetközi vizsgálat eredményeinek összehasonlítása azt mutatta, hogy az elmúlt 20 évben a cefoxitin teljes rezisztencia-aránya a *Bacteroides* törzsek között igen jelentős mértékben megnőtt (3%; 6% és 17,2%). Ugyanezen határértékek alkalmazása mellett a cefoxitin legmagasabb rezisztencia arányát találtuk *P. distasonis* esetében mind a jelen tanulmányban, mind az amerikai felmérésben (35,7% és 29,9%).

Vizsgálataink szerint az összes izolátum kevesebb mint 1%-a és a *B. fragilis* izolátumok 1,2%-a volt csak rezisztens fenotípusosan az imipenemre. Az imipenem rezisztencia szintje nem változott drámai módon az elmúlt 20 évben (0%; <1% és 1,2%), bár az ún. "csökkent érzékenységű" (MIC ≥4 mg/l) izolátumok százalékos aránya folyamatosan nőtt (0,3%; 1,6% és 2,7%). A 22 csökkent érzékenységű-rezisztens törzs tíz országból származott, egyenlően eloszlott a különböző régiókban. A 22 törzs közül, amelyet fenotípusosan imipenem rezisztensnek, vagy csökkent érzékenységűnek találtunk, 10 (45,5%) volt *cfi*A-pozitív és ezek közül 5 hordozott IS elemeket megfelelő orientációban és upstream a *cfi*A génekhez képest. Ebben a tanulmányban a munkatársaim által PCR-el megvizsgált további 486 *B. fragilis* törzs közül 43 hordozta a *cfi*A gént (8,85%) (Sóki J. *et al.* 2012), míg a 161 vizsgált *Bacteroides/Parabacteroides* izolátum közül 12 (9,4%) (Eitel Zs. *et al.* 2013).

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 legdrámaibb változásokat a három európai vizsgálatban a clindamycin rezisztencia alakulása mutatta: az összes izolátum esetében 9%, 15% és 32,4% rezisztencia fokozódás megjelenése volt megfigyelhető. Az első vizsgálatban *B. thetaiotaomicron* (13%) és *B. uniformis* (13%), a másodikban a *B. vulgatus* (30%) és *B. ovatus* (25%); a harmadik tanulmányban a *B. uniformis* (60%) és a *B. vulgatus* (47,6%) voltak a legrezisztensebb fajok.

A CLSI rezisztencia határérték (≥8 mg/l) alapján az összes izolátum 13,6% -a és *B. fragilis* 14%-a rezisztenciát mutatott a moxifloxacinnal szemben. Az első vizsgálatban a ciprofloxacint vizsgálták ≥4 mg/l rezisztencia határértékkel, így a rezisztens törzsek aránya igen magas volt (a különböző fajok szerint 37-98%). Jelen vizsgálatunkban a második vizsgálathoz képest a moxifloxacinnal szembeni rezisztencia aránya 9%-ról 13,6%-ra nőtt. Mindkét vizsgálatban a leginkább rezisztens faj a *B. vulgatus*, a rezisztencia aránya 19% és 21,4% volt. 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. A három európai vizsgálatban (0%, <1% és <1%) nem volt szignifikáns különbség a rezisztencia arányokban. A jelen vizsgálatban a 824 törzsből 22 olyan volt, amelynek a metronidazol MIC értéke ≥4 mg/l volt (2,7%); ezen törzsek hat országból származtak, országonként egy-kilenc izolátummal. Az előző vizsgálatban a 14 országból származó 1284 izolátumból 43-at (3,3%) találtak, ha a ≥4 mg/l-es MIC-et alkalmazták és csökkent érzékenységű törzseknek tekintették, míg a legelső vizsgálatban (n=1289) csak egy izolátum (0,1%) mutatott, csökkent érzékenységet. A tigecyclin igen aktívnak bizonyult a harmadik vizsgálatban (1,7%-os rezisztencia) és az elmúlt 5 évben az amerikai vizsgálat szerint (4,3%-os teljes rezisztencia) (Snydman DR. *et al.* 2007).

Az évek során az imipenem és a metronidazol-rezisztenciában nem tapasztaltunk jelentős változásokat, a többi antibiotikum esetében azonban a rezisztencia arányok jelentősen változtak (**38. táblázat**). 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.

38. táblázat: A három európai vizsgálat eredményeinek összehasonlítása

Antibiotikum	**Rezisztens törzsek aránya %**			
	Alkalmazott rezisztencia határérték (mg/l)	**1. vizsgálat n=1289** Philipps I. *et al.* 1992.	**2. vizsgálat n=1284** Hedberg M. *et al.* 2003.	**3. vizsgálat n=824** Nagy E. *et al.* 2010.
Ampicillin	≥2	93	99,3	99,2
"Magas-szintű" rezisztencia	≥64	16	27	44,5
Amoxicillin/klavulánsav	≥16	1	-	10,4
Pip/tazobactam	≥128	-	<1	3,1
Cefoxitin	≥64	3	6	17,2
Imipenem	≥16	0	<1	1,7
"Csökkent érzékenység"	≥4	0,3	1,6	2,7
Clindamycin	≥8	9	15	32,4
Moxifloxacin	≥8	-	9	13,6
Metronidazol	≥32	0	<1	<1
"Csökkent érzékenység"	≥4	0,1	3,3	2,7
Tigecyclin	≥16	-	-	1,7

A négy nagy **magyarországi** laboratóriumból gyűjtött törzsek körében végzett felmérésünk is bizonyította, hogy a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek között ma már széles körben elterjedt a β-laktamáz enzim termelése, ennek köszönhetően ampicillinnel szemben a magyarországi izolátumok jelentős hányada (98%) mutatott rezisztenciát, amely eredmény megfelel az előző, európai vizsgálatunknak (97,4%). A hazai izolátumok mindössze 4,5%-a volt rezisztens az amoxicillin/klavulánsavval szemben, ugyanakkor az európai studyban ez 8,7% volt, Wybo és munkatársai tanulmányukban ezt Belgiumban 14%-nak állapították meg (Wybo I. *et al.* 2014). Az általunk talált cefoxitin rezisztencia 6,75%-os aránya sokkal alacsonyabb volt az előbb bemutatott európai illetve korábban közölt kanadai eredményekhez képest (15,2-17,2%) (Karlowsky JA. *et al.* 2012). Eredményeink hasonlóak egy 2019-ben közölt, varsói kórház hat éves érzékenységi adataihoz, ahol a következő antibiotikumokkal szembeni rezisztencia-arányokat találták: penicillin: 100%, clindamycin: 22,5%, cefoxitin:

6,3%, amoxicillin/klavulánsav: 1,8%, minden törzs érzékeny volt az imipenemre és a metronidazolra (Kierzkowska M. *et al.* 2019).

A viszonylag alacsony amoxicillin/klavulánsav és cefoxitin rezisztencia hátterében a törzsek izolálásának eltérő földrajzi helye, az antibiotikum felhasználásának változása és az izolátumok eltérő száma állhat. Érdekes, hogy az amoxicillin/klavulánsav felhasználása ugyan magas és *Bacteroides/Parabacteroides* infekciókban elsőként választandó szer, viszont a rezisztencia még viszonylag alacsony maradt. A hazai vizsgálatunkban a cefoxitin rezisztencia erősen fajfüggő volt: a *B. fragilis* izolátumok 3,44%-a, a *P. distasonis* törzsek 20%-a mutatott ezzel az antibiotikummal szemben rezisztenciát. Ez az eredmény hasonló a Snydman és munkatársai által közölt adatokhoz, akik a *B. fragilis* törzsek 3,7%-át, míg a *P. distasonis* izolátumok 14,7%-át találták cefoxitin rezisztensnek (Snydman DR. *et al.* 2007).

A karbapenemek általában kiváló aktivitást mutatnak az anaerob baktériumokkal szemben, ám az ellenük kialakult rezisztencia terjedése egyre nagyobb fenyegetést jelenthet. Saját vizsgálataink ezt megerősítették, mivel az összes törzs 7%-a, közülük a *B. fragilis* törzsek 9,87%-a meropenem rezisztens volt. A *Bacteroides/Parabacteroides* izolátumok között a meropenem rezisztensek arányát egy amerikai tanulmányban 0,5%-nak, Európában 1,3%-nak (Sóki J. *et al.* 2006), egy 2019-ben közölt holland felmérés szerint 2%-nak találták (Veloo ACM *et al.* 2019); viszont Liu és munkatársai tajwani *B. fragilis* törzsek között ezt az arányt 12%-nak írták le (Liu Ch-Y. *et al.* 2008). A *B. fragilis* törzsek között a *cfi*A gén prevalenciáját 2,4-5,9% közötti tartományban állapították meg (Sóki J. *et al.* 2004; Yamazoe K. *et al.* 1999; Veloo ACM *et al.* 2019).

Az eltérő karbapenem rezisztencia adatok hátterében valószínűleg a *cfi*A gén eltérő prevalenciája és a helyi antibiotikum-felhasználási szokások állhatnak. A *cfi*A-negatív *B. fragilis* izolátumok esetében a meropenem rezisztencia hátterében a PBP-fehérjék megváltozása és ennek következtében a β-laktámokkal szembeni csökkent affinitás, illetve a csökkent permeabilitás állhatnak (Wexler HM. 2007).

Clindamycinnel szemben a törzsek jelentős része (36,75%-a) mutatott rezisztenciát, amely arány fajonként jelentős elérést mutatott: *B. fragilis* esetén ez 25,75%, míg *B. thetaiotaomicron* esetén 55,7% volt. Az előző európai vizsgálatunk, illetve szlovén és kuwaiti felmérés szerint ez az arány 27% és 37,6% között mozgott (Jeverica S. *et al.* 2015; Jamal W. *et al.* 2015), azonban a hollandiai felmérésben csak 15,8%-os volt. A clindamycin rezisztencia mértéke jelentős területi eltérést is mutatott, amely összhangban van az európai törzsgyűjteménnyel végzett adatainkkal: ahol a dél-európai régióban ez az érték 37,6% volt, ugyanakkor a skandináv országokban a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek 81,4%-a volt rezisztens a clindamycinre.

A metronidazol gyakori alkalmazása ellenére megőrizte kiváló aktivitását a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsekkel szemben: mindössze egy fenotípusosan rezisztens izolátumot találtunk (0,25%), amely összhangban állt a világszerte közölt rezisztencia adatokkal (<1%). Moxifloxacinnal szemben az egyes *Bacteroides/Parabacteroides* fajok különböző mértékű rezisztenciát mutattak: az összes *P. distasonis* izolátum érzékeny volt, ugyanakkor *B. fragilis* törzsek 15,45%-a, a *B. vulgatus* törzsek 50%-a volt rezisztens. Snydman és munkatársai szintén jelentős eltérést közöltek a *Bacteroides* fajok moxifloxacin rezisztenciáját illetően: a *P. distasonis* törzsek 38,9%-a, a *B. ovatus, B. vulgatus* és más fajok (*B. caccae, B. eggerthii* stb.) több, mint 70%-a mutatott rezisztenciát (Snydman DR. *et al.* 2017). Viszonylag jelentős hazai regionális különbség volt megfigyelhető a clindamycinnel,

cefoxitinnel és moxifloxacinnal szembeni rezisztencia mértékét tekintve. Az európai felmérésünkben a moxifloxacin rezisztencia arányát Dél-Európában 92,45%-nak, míg északon 70,1%-nak találtuk; a debreceni és szegedi törzsek között mi is igen jelentős mértékű eltérést tapasztaltunk: 3% vs. 13%.

A tetracyclin rezisztencia 65,25%-nak bizonyult, jelentős faj szerinti eltéréssel: a *B. uniformis* izolátumok 27,27%-a, az egyéb bacteroidesek (*B. stercoris, B. cellulosilyticus, B. caccae, B. intestinalis* stb.) 75%-a volt rezisztens ezen antibiotikummal szemben. A törzsekkel szemben a tigecyclin kiemelkedő aktivitással rendelkezett: csak 3 rezisztens izolátumot izoláltunk, ehhez hasonló adatot találtunk az európai törzsek között is (1,7%). A chloramphenicol kitűnő hatékonyságot mutatott a vizsgált izolátumokkal szemben, mindössze egyetlen törzs mutatott mérsékelt érzékenységet, a többi érzékeny volt. A chloramphenicol érzékenységi vizsgálat eredménye összhangban állt Wybo és munkatársai által publikált adattal, aki 2004-ben a *Bacteroides törzsek* 99%-át találta érzékenynek (Wybo I. *et al*. 2014), Nitzan és munkatársai által vizsgált anaerob törzsek pedig 98,5%-a (2012) volt érzékeny (Nitzan O. *et al*. 2015). Spanyolországban 10 év alatt a cefoxitin (12,8% vs. 27,1%), a clindamycin (33,5% vs. 47,9%), moxifloxacin (6% vs 25%) és amoxicillin/klavulánsav (5% vs. 17,9%) rezisztenciájának jelentős növekedése volt megfigyelhető (Betriu C. *et al.* 2008). Franciaországban a tendenciák hasonlóak voltak a clindamycin (Behra-Miellet J. *et al.* 2003) és Belgium esetében az amoxicillin/klavulánsav és a clindamycin (Wybo I. *et al.* 2007) esetében.

Eddigi vizsgálatunkig csak kevés magyarországi adat állt rendelkezésre és a korábbi hazai *Bacteroides/Parabacteroides* érzékenységi adatokkal való összehasonlítás is csak korlátozott mértékben volt lehetséges. A jelenlegi és a korábbi hazai adatok összehasonlítását nehezíti, hogy az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok különböző módszerekkel történtek (mikro-leveshígítás vs. agarhígítás), valamint különbözőek voltak az alkalmazott határértékek és a vizsgált izolátumok száma is eltért. Nagy E. és munkatársai által 1995-ben közölt adatokkal összehasonlítva a clindamycin rezisztens törzsek aránya 23%-ról 36,75%-ra, a moxifloxacin rezisztenseké 13,6%-ról 18,5%-ra emelkedett (**39. táblázat**) (Nagy E. *et al.* 1995), azonban az amoxicillin/klavulánsavval szembeni rezisztencia aránya 15%-ról 4,5%-ra, a cefoxitinnel szemben pedig 24%-ról 6,75%-ra csökkent.

Saját vizsgálataink rezisztencia adatait elemezve az alábbi 3 antibiotikum-pár esetén állapítottunk meg szignifikáns korrelációt ($p<0,05$): ampicillin és amoxicillin/klavulánsav; cefoxitin és amoxicillin/klavulánsav; valamint tetracyclin és tigecyclin. Ennek hátterében közös antibiotikum rezisztencia mechanizmus állt: a β-laktamáz-termelés a *Bacteroides* izolátumok körében a leggyakoribb rezisztencia mechanizmus (Hall GH., Barlow M. 2005; Bush K., Jacoby GA. 2010; Rogers MB. *et al.* 1993), a törzsek több, mint 90%-a legalább egy β-laktamáz gént expresszál. Magyarországon jelenleg nem áll rendelkezésre pontos adat az antibiotikum rendelési gyakorlatról, azonban véleményünk szerint a cefoxitin rezisztencia-csökkenés hátterében annak nagyon alacsony mértékű alkalmazása állhatott. Az utóbbi évtizedben számos tanulmány számolt be a β-laktám/β-laktamáz-gátlók, a cefoxitin, moxifloxacin, tetracyclin és clindamycin rezisztens *Bacteroides/Parabacteroides* izolátumok arányának emelkedéséről világszerte (Bartha N. *et al*. 2011; Boyanova L. *et al.* 2015). Az eltérő antibiotikum rezisztencia-mintázat hátterében a következő tényezők állhatnak: a helyi antibiotikum-felhasználás sajátosságai, antibiotikum rezisztencia gének elterjedése, az érzékenységi

vizsgálatok különböző módszerei, az izolátumok eltérő száma, a határértékek közötti eltérések vagy a még nem megállapított határértékek.

39. táblázat: Jelen tanulmányban és korábban vizsgált magyarországi *Bacteroides/Parabacteroides* csoportba tartozó izolátumok antibiotikum rezisztencia adatainak összehasonlítása

	Rezisztens törzsek aránya (%)		
Antibiotikumok	**1992** **n=200** Nagy E. *et al.* 1995*	**2010** **n=100** Nagy E. *et al.* 2011**	**2016** **n=400** Sárvári KP *et al.* 2018**
Ampicillin	97	100[b]	98
Amoxicillin/klavulánsav	NA	15[b]	4,5
Cefoxitin	11	24[a]	6,75
Meropenem	NA	NA	7
Clindamycin	23	27[b]	36,75
Metronidazol	0	1[b]	0,25
Moxifloxacin	NA	13,6[a]	18,5
Tetracyclin	65	NA	65,25
Tigecyclin	NA	1,7***	1,5
Chloramphenicol	0	NA	0

NA: Nincs adat
*Módszer: mikro leveshígítás, Rezisztencia határérték: CLSI (korábban: NCCLS)
**Módszer: agarhígítás, Rezisztencia határérték: [a]CLSI (korábban: NCCLS) és [b]EUCAST
***Határértékek: Food and Drug Administration 2010.

Az MDR törzsek előfordulása és az antibiotikum rezisztencia gének vizsgálata

A humán klinikai mintákból izolált *Bacteroides/Parabacteroides* törzsekben az antibiotikum-rezisztencia gének prevalenciájára mindezidáig csak korlátozott számú vizsgálatot végeztek (Tran CM. *et al.* 2013; Meggersee R., Abratt V. 2015; Székely E. *et al.* 2015). Munkacsoportunk már igen korán, a 90-es évek végén kezdte el tanulmányozni a humán infekciókból származó *Bacteroides* törzsek egyes antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mechanizmusainak genetikai hátterét. Az IS elemeken keresztüli expressziós mechanizmusú szabályozással rendelkező ***nim*** géneket és az azokat hordozó genetikai elemeket is vizsgáltuk az aktiváló IS elem típusa, a plazmidon ill. kromoszómán való elhelyezkedés szerint.

Első vizsgálatunk során 1998-2000-között gyűjtött 242 *B. fragilis* (ebből 167 izolátumot 2000-ben gyűjtöttünk) izolátumot megvizsgálva négy törzs esetében találtunk csökkent metronidazol érzékenységet és PCR módszerrel a *nim* gének jelenlétét két törzs esetében tudtuk kimutatni. A *B. fragilis* 19924 törzs, amely metronidazol MIC értéke 12 mg/l volt a PCR-RFLP profil alapján *nim*A génnel rendelkezett, míg a *B. fragilis* 29877 törzs, melynek MIC értéke 4 mg/l volt *nim*B gént tartalmazott. A *nim* gének kimutatásán és típusmeghatározásán felül meghatároztuk az azokat aktiváló IS elemeket is: az IS*1186* elemet találtuk meg mindkét törzsben. További vizsgálatokat végezve bizonyítottuk, hogy az IS*1186* elemek megfelelően

közel (upstream) és megfelelő irányban helyezkedtek el a *nim*A és *nim*B génekhez, hogy aktiválják azokat. A két *nim* pozitív törzs plazmid profilját is meghatároztuk: *B. fragilis* 19924 törzs egyetlen 7,7 kb nagyságú plazmidot tartalmazott, míg a másik törzsben nem tudtunk plazmidot kimutatni. Vizsgálataink során munkacsoportunk Magyarországon először írt le és jellemzett részletesen molekuláris genetikai vizsgálatokat alkalmazva metronidazol rezisztens *B. fragilis* törzseket (*Saját közlemény:* Urbán E. *et al.* 2002).

Jelenleg a szakirodalomban egyenlőre még kevés közlemény jelent meg **MDR** *Bacteroides* izolátumokról, a valós prevalenciája ezeknek a törzseknek nem ismert.

Munkacsoportunknak már 2006-ban lehetősége volt az egyesült királyságbeli Anaerob Referencia Laboratóriummal együttműködve egy 48 éves, súlyos pancreatitisben szenvedő, szeptikus nőbeteg hemokultúrájából általuk izolált multirezisztens *B. fragilis* törzs rezisztencia mechanizmusainak molekuláris genetikai vizsgálatára. A törzs minden anaerob ellenes antibiotikummal szemben magas fokú rezisztenciával rendelkezett, kivéve a chloramphenicolt és a linezolidot. Vizsgálataink alapján a R19811 törzs annak ellenére, hogy magas szintű metronidazol rezisztenciával rendelkezett (MIC 64 mg/l) *nim* gént nem hordozott, de *cfi*A gént hordozott, ugyanakkor a *bft*-gén jelenlétét is kimutattuk PCR-rel. Elemeztük a *cfi*A gén upstream régióját az IS elemek kimutatására, feltételezve, hogy ezen szekvenciák egyikének előfordulása hozzájárulhat a karbapenem rezisztencia mechanizmusok kialakulásához. A vizsgált IS elemek közül csak az IS*614* volt kimutatható PCR-el. A citotoxicitási vizsgálatban a vizsgált törzs reverzibilis citopátiás hatást váltott ki a HT-29 sejtvonalra, ez az eredmény azt mutatta, hogy a sejttenyészet felülúszójában funkcionális toxin, fragilizin volt jelen, a *bft* gén PCR-RFLP analízise során a *bft*-1 allélt találtuk. Munkánk során először írtuk le egy MDR *B. fragilis* törzsben a *cfi*A gén és a *bft* gének együttes előfordulását (*Saját közlemény:* Terhes G. *et al.* 2007).

Magyarországon elsőként egy **hazai MDR *B. fragilis*** izolátum vizsgálatát publikáltuk 2015-ben: az 57 éves komorbid férfibetegből izolált törzs rezisztens volt penicillinre, ampicillinre, amoxicillin/klavulánsavra, piperacillin/tazobaktámra, cefoxitinre, meropenemre, clindamycinre and tetracyclinre; a *cep*A, *cfi*A, *erm*, *nim*A, *tet*Q géneket és az IS*1187* elemet hordozta (*Saját közlemény:* Urbán E. *et al.* 2015). A magyarországi több centrumból gyűjtött törzseink esetében a 400 *Bacteroides* törzs közül 6 MDR izolátumot találtunk (1,5%), amelyek 4-6 különböző antibiotikum csoport tagjaival szemben mutattak rezisztenciát. Az antibiotikum rezisztencia molekuláris háttere törzsről-törzsre eltért. A *cfx*A gén upstream régiójában különleges genetikai elemeket (IS*614B*, Tn4555 és Tn4351) mutattunk ki, amelyeket Sóki, valamint Garcia és munkatársai már korábban leírtak (Sóki J. *et al.* 2013/c; Garcia N. *et al.* 2008), de a *B. ovatus* SZ9 és *B. thetaiotamicron* SZ35 törzsek más IS-elemet hordoztak, vagy deléciót tartalmaztak. A *B. fragilis* SZ38 törzs hordozta a *cfi*A gént, de a gén upstream régiójában nem volt kimutatható IS-elem.

Egyik törzs sem tartalmazta a *cep*A gént, viszont 3 izolátum hordozta a *cfx*A gént, az *erm*G vagy *erm*F gént, vagy mindkettőt 4 törzs hordozta. A *B. vulgatus* SZ4 és *B. thetaiotaomicron* SZ35 izolátumokban a teljes hosszúságú IS*4351* elem detektálható volt. Mindegyik törzsben kimutatható volt a *tet*Q gén, háromban pedig a *tet*X, kettőben a *bex*A, de egyikben sem volt jelen a *nim* gén. A *B. fragilis* SZ38 törzs giráz enzim GyrA alegység génjének (*gyr*A) QRDR régiójában Ser82Phe szubsztitúciót igazoltunk, hasonlóan Nakamura és munkatársai közléséhez (Nakamura I. *et al.* 2017). Jelen tanulmányunk után 2018-ban munkacsoportunk az Eszéki Egyetem munkatársaival kollaborációban vizsgált és jellemzett

egy imipenem rezisztens *B. fragilis* törzset, melyet egy 72 éves, húgyhólyag-daganatban szenvedő férfibeteg hemokultúrájából izoláltak. Ez a törzs az ampicillinre, a piperacilin/tazobaktámra, cefoxitinre, clindamycinre, tetracyclinre és imipenemre volt rezisztens, valamint a *cfi*A, *erm*F és *tet*Q géneket hordozta, a *cfi*A gén magas szintű expresszióját egy megfelelő orientáltságú, upstream elhelyezkedő IS*1187* elem okozta (Bogdan M. *et al.* 2018).

Vizsgálatunk újdonsága a MDR *Bacteroides* izolátumok lokális halmozódása volt - közülük 5-öt a szegeden izoláltunk, egyet a debreceni centrumban izoláltak-, illetve, hogy mindegyik törzs rezisztencia mechanizmusainak genetikai háttere eltérő volt, tehát nem egy azonos klón terjedt el helyileg. A közép-kelet európai térségben eddig még nem publikáltak olyan tanulmányt, amely ilyen nagy számú MDR *Bacteroides* izolátumról, illetve ezek részletes molekuláris genetikai hátteréről számolt be. Ezen izolátumok szegedi régióban megfigyelt halmozódásának hátterében valószínűleg az antibiotikum-felhasználás helyi szokásai állhattak, amelyek számos, eltérő hatásmechanizmusú antibiotikum ellen is rezisztenciához vezettek.

A nemzetközi szakirodalomban meglehetősen kevés az a vizsgálat, amely a fluorokinolonok elleni egyik lehetséges rezisztencia mechanizmusért felelős, a *bex*A gén által kódolt BexA efflux pumpa előfordulását vizsgálja humán klinikai eredetű *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek között. Az európai törzsgyűjteményből származó 161 megvizsgált *Bacteroides/Parabacteroides* törzs 7,5%-a hordozta a kinolonok transzmembrán transzporter aktivitásért felelős ***bex*A** gént, ezek közül 6 volt (4,7%) *B. fragilis* törzs és jóval magasabb (18,2%) volt a gént hordozó NFB törzsek aránya, a különbség statisztikailag szignifikáns volt p=0,024 (Eitel Zs. *et al.* 2013). Érdekesség, hogy a 18 moxifloxacin-rezisztens *B. fragilis* izolátum közül egyik sem hordozta a *bex*A gént, a 6 moxifloxacin rezisztens NFB törzs közül pedig csak egy. A romániai vizsgált törzsek között kilenc *bex*A-pozitív törzset találtak, ezek legtöbbje emelt szintű (de nem rezisztens) moxifloxacin MIC értékkel rendelkezett (2-4 mg/ml), de a moxifloxacin rezisztens törzsek között nem találtak *bex*A-gén hordozót (Székely E. *et al.* 2015). Az általunk megvizsgált, magyarországi 400 törzs 20,5%-a hordozta a *bex*A gént és azt találtuk, hogy a NBF törzsek között szignifikánsabban magasabb volt a gén prevalenciája (főként a *B. thetaiotaomicron* törzsek között) (p=0,002), mint a *B. fragilis* izolátumok között. Érdekes megfigyelésünk, hogy a moxifloxacin érzékeny NFB törzsek majdnem fele (42,37%) hordozta a *bex*A gént; míg a moxifloxacin érzékeny *B. fragilis* törzseknek csak 6,04%-a. Az előző, európai szintű vizsgálatunkhoz képest azt találtuk, hogy mind a moxifloxacin rezisztens törzsek aránya, mind a *bex*A gén prevalenciája emelkedett és jóval több NFB izolátum hordozta a gént. Valószínűleg a kinolon/moxifloxacin rezisztencia hátterében a törzsek többségénél a sokkal gyakoribb előfordulású *gyr*A gén mutációja áll, ami a legtöbb egyéb speciesnél is a fenotípusos kinolon rezisztencia fő oka (Bachoual R. *et al.* 2000; Oh H. *et al.* 2001).

A *B. fragilis* törzsek enterotoxin- és proteáz-termeléséért felelős gének vizsgálata

Az ETBF törzsek tünetmentes hordozásának aránya a bélben kb. 6,2-20%-ra tehető (Szőke I. *et al.* 1997; Toprak NU. *et al.* 2006/b; Pantosi A. *et al.* 1997; Luczak M. *et al.* 2001), viszont az ETBF törzsek aránya az extraintesztinális *B. fragilis* törzsek között 18,5-38,2%-os (Chung GT. *et al.* 1999; Mundy LM. *et al.* 1996). A hemokultúrákból izolált enterotoxin-termelő *B. fragilis* törzsek aránya kiemelkedő: Claros és munkatársai a szeptikus betegekből

izolált *B. fragilis* törzsek között az ETBF törzsek arányát 19%-nak találták (Claros MC. *et al.* 2006); míg Kato és munkatársai a hemokultúrákból izolált fragilizin termelő törzsek arányát Japánban 28,1%-nak írták le (Kato N. *et al.* 1996).

Jelen tanulmányunkban a magyarországi, vegyes klinikai anyagból gyűjtött *B. fragilis* törzsek 13%-a volt *bft*-pozitív, ezek többsége a *bft-1* allélt hordozta (76,9%, 20/26), a *bft-2*-t a törzsek 23,1%-a (6/26), viszont egyik izolátumból sem lehetett a *bft-3*-gént kimutatni. Scotto d'Abusco és munkatársai által vizsgált intesztinális és extraintesztinális ETBF törzsek többsége szintén a *bft-1* allélt hordozta (62,5%, 10/16), 25%-a a *bft-2*-t (4/16) 12,5%-a a *bft-3* izotípust (2/16) (Scotto d'Abusco A. *et al.* 2000). Az általunk vizsgált törzsek is hasonló arányban hordozták a *bft* izotípusokat azzal a különbséggel, hogy nem találtunk *bft-3*-pozitív izolátumot. Eredményeink hasonlóak a lengyelországi 2019-ben közölt, varsói kórház adataihoz, ahol a a *bft* gén jelenlétét a vizsgált *B. fragilis* izolátumok 14,4%-ában mutatták ki; a *bft*-1 allél jelen volt a pozitív törzsek 75% -ában, a *bft*-2-t a törzsek 25%-nál, a *bft*-3 pedig egyetlen izolátumban sem mutattak ki (Kierzkowska M. *et al.* 2019).

A *bft* izotípusok RT-PCR vizsgálattal történő meghatározása során végzett olvadáspont-analízis ugyancsak lehetővé tette a *bft-1* és *bft-2* izotípusok elkülönítését. Az olvadáspont-analízis hitelesítése céljából véletlenszerűen kiválasztott 3-3 *bft-1* és *bft-2*-pozitív *B. fragilis* törzset szekvenáltunk. A *bft* izotípusok Genbankban szereplő szekvenciákkal való összehasonlítása és teljes egyezése alátámasztotta az általunk alkalmazott módszer megbízhatóságát, amit a PCR-RFLP-vel és az olvadáspont-analízissel kapott eredmények jó korrelációja is megerősített. Munkánk során vizsgáltuk a *bft* és a *cfi*A gének kapcsolatát is. A Bruker Daltonik által Intézetünkkel való tudományos kooperáció eredményeként (*Saját közlemény*: Fenyvesi VS. *et al.* 2014) kifejlesztett MALDI-TOF Biotyper 3.1 szoftver "*cfi*A identification project file" segítségével megvizsgáltunk 200 *B. fragilis* törzset. A Divízió II-be 20 izolátum tartozott (10%) és RT-PCR-rel igazoltuk, hogy közülük az összes hordozta a *cfi*A gént, amely eredmény kissé magasabb a munkacsoportunk által eddig közölt adatokhoz (2-8,85%) viszonyítva (Eitel Zs. *et al.* 2013; Sóki J. *et al.* 2013/a; Sóki J. *et al.* 2013/c). A 200 törzs közül a szegedi törzseinkből ismét azonosítottunk egy olyan ritka izolátumot (*B. fragilis* SZ54), amely egyszerre hordozta a *cfi*A és *bft* gént (*Saját közlemény:* Sárvári KP. *et al.* 2017).

Kutatásaink során vizsgáltuk a *B. fragilis* törzsekben a C10 és a C11 proteáz patogenitási faktorokat kódoló gének előfordulását a hazai törzsek között. A C10 proteázt kódoló *bfp*1-4 gének közül 34 izolátum két, 9 törzs 3 *bfp* izotípust hordozott egyszerre. A *bft*-pozitív és -negatív törzseket megvizsgálva a *bfp*2 izotípus volt a leggyakoribb és pozitív korrelációt állapítottunk meg a *bfp*2 és *fpn* (fragipain proteáz termeléséért felős gén) gének jelenléte között. Vizsgálataink szerint a 26 *bft*-pozitív törzs közül 24 hordozta a 24 *fpn* gént, amely bizonyítja, hogy a fragipain kulcsszerepet játszik a *B. fragilis* enterotoxin aktivációjában, ugyanakkor 36 *bft*-negatív izolátum szintén hordozta az *fpn* gént. A fragipain valószínűleg további szereppel rendelkezik különböző sejtfunkciókban és a szepszis patogenezisében; a CD szupercsalád tagjai további fontos patogenitási szerepet játszanak: a sejtproliferációban, a sejthalál patogenezisében, a gyulladásban, az oldhatatlan aggregátumok eltávolításában, a virulenciában stb. (McLuskey K., Mottram JC. 2015).

Jelen tanulmányban vizsgáltuk az extraintesztinális mintákból izolált *B. fragilis* törzsekben a *bft* gén jelenlétét és a *bft, bfp*1-4, *fpn* és *cfi*A gének kapcsolatát molekuláris diagnosztikai módszerekkel. Korábbi, 2006-os vizsgálati adatainkkal (8,7%) összehasonlítva a *bft*-hordozó törzsek aránya kis mértékben emelkedett (Nagy E. *et al.* 2006). Az Intézetben

végzett első tanulmányban 1997-ben vizsgáltuk a különböző klinikai mintákból izolált enterotoxigén *B. fragilis* törzsek prevalenciáját: összesen 134 törzset gyűjtöttünk különböző klinikai mintákból: 74-et vegyes humán klinikai mintából, 20-at egészségesek székletéből és 40-et a hasmenésben szenvedő betegek székletéből, ahol más enterális kórokozót nem lehetett kimutatni. A 134 törzs közül 34 (25,3%) bizonyult toxin-pozitívnak HT-29 vastagbélrákos sejtvonalon végzett sejttoxicitási vizsgálattal, ebből a felnőttek hasmenéses székletéből izolált törzsek 40%-a volt toxin-pozitív. Ebben a vizsgálatban jóval magasabb *bft* hordozási arányt állapítottunk meg, de még nem molekuláris diagnosztikai eljárással (toxin termeléséért felelős gének jelenlétének kimutatása), hanem hagyományos, a HT29/C1 sejtre kifejtett citopátiás hatás vizsgálatával, amely kiértékelése nagyon szubjektív (Szőke I. *et al.* 1997).

Későbbi, 2006-os vizsgálatunkban 275 különböző klinikai mintából izolált, egészséges egyénekből származó "normál" és hasmenéses székletből származó *B. fragilis* törzs molekuláris vizsgálata történt meg, a fragilizin (*bft*) gén jelenlétét és ezek különböző izoformjait mutattuk ki "home made" PCR módszerrel. Az enterotoxin gén *bft* típusának (néhány aminosavas eltérés az 1-3 altípusok között) megállapítására PCR-RFLP módszert dolgoztunk ki és alkalmaztunk (a *bft* gének 1142 bp-os, a gének kódoló szakaszát átfogó szegmentjét amplifikálva és azt MboI restrikciós enzimmel emésztve *bft*-1,2 és 3 specifikus mintázatot kaptunk gélelektroforézisben). A *bft* gén előfordulása az összes törzsben 8,7%-os volt (24/275), 17 törzs a *bft*-1 allélt, 7 a *bft*-2 jellegzetes mintáját mutatta a PCR-RFLP módszerrel, *bft*-3 típust nem találtunk. Vizsgálataink alapján csak egy *bft* pozitív törzs származott hemokultúrából (1/8), ez a *bft*-2 allélt hordozta, 2 törzs származott intraabdominális mintából, az egyik a *bft*-1, a másik a *bft*-2 allélt hordozta. Az egészséges egyének székletmintáiból származó izolátumok (22 törzs) közül csak egyben találtunk *bft* gént (*bft*-1), a hasmenéses székletmintákból izolált törzsek esetében 3-ból (3/38, 7,9%) mutattuk ki a fragilizin gént, egy volt *bft*-1 és kettő *bft*-2 hordozó (*Saját közlemény:* Terhes G. *et al.* 2007). Legújabb adatainkat összehasonlítva ezzel a vizsgálattal, úgy találtuk, hogy a *bft*-hordozó magyarországi törzsek aránya csak kis mértékben emelkedett az elmúlt mintegy 10 év alatt, a *bft*-3 izoform jelenlétét továbbra sem tudtuk kimutatni a hazai izolátumok között. Jelen tanulmányunk újdonsága a *bft*, *bfp*1-4, *fpn* és *cfiA* gének molekuláris és egymás közötti statisztikai korrelációs vizsgálata volt.

6.3. A MALDI-TOF MS alkalmazása a humán, klinikai eredetű anaerob baktériumok identifikációjában

A MALDI-TOF MS mikrobiológiai alkalmazásokra való bevezetése óta, kísérleti eszközből egy olyan technológiává fejlődött, ami jelentős előnyökkel bír a mindennapi rutin diagnosztikai és a tudományos vizsgálatokban is.

Eddig számos tanulmány számolt be az anaerob baktériumok körében is egyre inkább terjedő antibiotikum rezisztencia jelenségéről, valamint ebből a szempontból a pontos faj szerinti identifikálás fontosságáról. Azonban egy 2008-as gyakorlati felmérés arról számolt be, hogy az amerikai anaerob referencia laboratóriumok 33%-a nem azonosította a *Bacteroides/Parabacteroides* izolátumokat faji szinten (Goldstein ECJ. *et al.* 2008). A hagyományos biokémiai és a kereskedelmi forgalomban elérhető automatizált identifikáló módszerek számos korlátozó tulajdonsággal rendelkeznek: a biokémiailag hasonló törzseket nem képesek megfelelő megbízhatósággal elkülöníteni, az identifikálás eredménye függ a

megfelelő anaerob környezettől és a kérdéses species profiljának az adott adatbázisban való jelenlététől.

Ha hagyományos módszereket alkalmaznak, sokszor 5-7 napra van szükség a hosszabb generációs idővel rendelkező anaerob izolátumok indukálható enzimaktivitásának kimutatására (Holdeman LV. *et al.*1977). A Rapid ID 32A (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Fr), hasonlóan más, azonos elven működő teszthez, nem képes különbséget tenni a Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok között („one size does NOT fit all"). Az adatbázisokat folyamatosan fejleszteni kell: az újonnan leírt fajok adataival ki kell egészíteni, illetve újabb izolátumok profiljával bővíteni. Az irodalmi adatok szerint a biokémiai aktivitáson alapuló módszerekkel a *Bacteroides/Parabacteroides* csoport fajai csak kb. 78-79%-os megbízhatósággal identifikálhatók (Snydman DR. *et al.* 2007). A biokémiai profilon alapuló identifikálás másik hátránya lehet az inkubációs idő hossza, nagy mennyiségű inokulum szükséges, a teszt elvétől függően különbözhetnek az inkubációs körülmények.

A *Bacteroides/Parabacteroides* csoporton kívüli egyéb anaerob Gram-negatív pálcák esetében a faj-szintű identifikálás sikere a biokémiai aktivitáson alapuló módszerekkel változó lehet: igen rossz az elkülönítés a *F. nucleatum* és a *F. necrophorum* speciesekbe tartozó törzsek esetében, a *Porphyromonas asaccharolytica* és a *P. endodontalis* között és a különböző *Prevotella* spp. között: mint a *P. buccalis, P. denticola, P. loescheii, P. melaninogenica* és a *P. oralis* között a Rapid ID 32A rendszert alkalmazva (Downes J. *et al.* 1999). További akadálya az alkalmazhatóságnak, hogy ezeknek a kiteknek az adatbázisai a fenotípusos identifikáción alapszanak és a jelenlegi taxonómiai változásokkal ezeket nem frissítették (Lee EH. *et al.* 2011; Citron DM. 2012). A kutatási adatok alátámasztják, hogy az anaerob baktériumok nagy része (bacteroidesek 20%-a, prevotellák 36%-a, nagyszámú *Veillonella, Alistipes, Bilophila*) félre lett azonosítva vagy egyáltalán nem azonosítható a fenotípusos módszerekkel (Simmon KE. *et al.* 2008). Tanulmányok (Lau SK. *et al.* 2006; Justesen US. *et al.* 2010) hemokultúrából származó anaerob izolátumokat vizsgáltak és kimutatták, hogy az anerob fajok sokkal pontosabban identifikálhatók a 16S rRNS szekvenálással, összehasonlítva különböző diagnosztikai módszerekkel, amelyek az újabb fajokat nem tudják azonosítani: például *B. dorei, B. nordii, B. xylanisolvens* stb. A MALDI-TOF MS rendkívül gyors megoldásnak tűnik az anaerob baktériumok pontos, faj szintű identifikálására (Shah HN. *et al.* 2002; Justesen US. *et al.* 2011; Nagy E. *et al.* 2018; Veloo ACM. *et al.* 2011; Wybo I. *et al.* 2012).

A PCR-amplifikált bakteriális 16S rRNS direkt szekvenálása viszonylag még új módszer, a klasszikus biokémiai módszerekhez képest gyorsabb, azonban ára és eszközigénye miatt egyelőre még ritkán alkalmazzák a rutin klinikai mikrobiológiai laboratóriumokban. A fenotípusos módszerekkel történő eredménytelen faji szintű meghatározás és a szekvenálási eszköztár hiányának problémáját áthidalandó, több vizsgálatsorozatban is megvizsgáltuk a MALDI-TOF MS hatékonyságát az anaerob baktériumok species-szintű identifikálásban.

Az első tanulmányunkban a vizsgált *Bacteroides/Parabacteroides* sp. izolátumok között a MALDI-TOF csak két *B. xylanisolvens* törzset nem tudott pontosan, species-szinten megfelelően azonosítani, *B. ovatus*-nak identifikálta a törzseket. Ezt a fajt 2008-ban írták le és 16S rRNS gén szekvenciája a legjobban a *B. ovatus* törzsek típusához hasonlít (97,5%) (Chassard C. *et al.* 2008). A *B. xylanisolvens* az első vizsgálatsorozatunk idején még nem volt benne a MALDI Biotyper (3.0 verzió) adatbázisában így hozzá kellett adni a törzseink MSP-it, hogy növelje a MALDI-TOF MS identifikációs képességét erre a fajra. A *B. ovatus* és *B. xylanisolvens* spektrumainak részletes analízisét kellett elkészíteni, azért, hogy a két faj

MALDI-TOF MS-sel való megkülönböztetésének lehetőségét értékeljük. Összesen 16 *B. fragilis* izolátumra kaptunk eltérő eredményeket a fenotípusos identifikálás szerint. A nemzetközi antibiotikum érzékenységi adatokból ismert, illetve az előző fejezetekben ismertetett saját adataink is alátámasztják, hogy a faj meghatározás különösen fontos a rutin laboratóriumokban a *Bacteroides/Parabacteroides* izolátumok esetében, mivel az antibiotikum rezisztencia arányok szignifikáns különbségei figyelhetők meg a különböző fajok között (Snydman DR. *et al.* 2007; Phillips I. *et al.* 1992; Hedberg M. *et al.* 2003; Nagy E. *et al.* 2011b). Számos izolátumot találtunk (17 Gram-pozitív és 14 Gram-negatív izolátum), amelyeket faj-szinten azonosíthattunk, annak ellenére, hogy a log(score)-ok 1,7 és 2,0 között voltak. Legalább az első és második legjobb egyezés (néhány esetben még a harmadik és a negyedik is) ugyanazt a fajidentifikációt adták. Négy eset kivételével az összes azonosítás megegyezett a fenotípusos identifikálással. Mindegyik (n=16) *C. acnes* izolátumunk 2,268 és 2,448 közötti log(score)-okkal volt identifikálva a mintaelőkészítésnél használt extrakciós módszert alkalmazva, ez igen jó eredmény volt, összehasonlítva Justesen és *mtsai.* által publikált adatokkal (Justesen US. *et al.* 2011), akik azt találták, hogy a 21 *C. acnes*-ből 18-nak volt a log(score)-ja >1,7 de <2,0. Alacsony log(score)-okat, viszont helyes identifikációt tapasztaltunk a *C. ureolyticus* és *A. odontolyticus* törzsek esetében.

Wybo és *mtsai.* (2012) értékelték a MALDI-TOF identifikáció teljesítményét a különböző *Prevotella* törzsek esetében, a Bruker MALDI Biotyper általános adatbázisának kiterjesztésével képesek voltak 102 *Prevotella* izolátum faj-szintű identifikálását 62,7%-ról 83,3%-ra emelni. A mi tanulmányunkban négy fajba tartozó 28 *Prevotella* izolátumot identifikáltunk helyesen MALDI-TOF-fal és az ellentmondó fenotípusos identifikálással szemben minden esetben, a szekvenálás megerősítette az MS eredményeket. A vizsgálat kivitelezése, a törzsgyűjtés idejében még a *P. baroniae* species nem volt benne a Biotyper adatbázisban; azonban e tanulmány során ezeknek a fajoknak az MSP-jét hozzáadtuk az adatbázishoz és utána egy későbbi izolátumot helyesen identifikáltunk: log(score) 2,189. A Biotyper adatbázisban szerepelt az *Anaerococcus vaginalis, C. ureolyticus,* valamint a *C. hathewayi,* azonban csak egy vagy két spektruma volt ezeknek a törzseknek, ez így nyilvánvalóan nem fedte le ezeknek a fajoknak a természetes variabilitását. Az *F. magna* szintén változatos tömegspektrumú fajnak tűnik (Veloo ACM. *et al.* 2011); azonban a vizsgálatunk alatt két *F. magna* izolátumot identifikáltunk >2,0 log(score)-ral.

Az ESGAI által koordinált nemzetközi, multicentrikus (European Network for the Rapid Identification of Anaerobes: ENRIA) projekt keretében számos laboratórium működött együtt a klinikai anaerob izolátumok azonosításának optimalizálására egy széles körben hozzáférhető platformon (Veloo ACM. *et al.* 2018). A projektnek egyedüli kelet-európai résztvevője a SZTE KMDI anaerob laboratóriuma volt. Értékelték a MALDI-TOF MS és a VITEK MS rendszer teljesítményét klinikai *Prevotella* spp. izolátumok azonosítására (Toprak NU. *et al.* 2018). Összesen 508 *Prevotella* izolátumot, amelyek 19 különböző fajt képviselnek, 11 európai országból, Kuvaitból és Törökországból gyűjtöttek össze 2014. január és 2016. április között. A vizsgálatot a Marmara Egyetem Mikrobiológiai Intézetében végezték el, VITEK MS-vel (v3.0). Az azonosítás megbízhatóságát 16S rRNS gén szekvenálással ellenőrizték. VITEK MS alkalmazásával az 508 izolátum 422-ét (83,1% -át) a faji szinten, 459 (90,4%) a nemzetség szintjén azonosították, 49 (9,6%) izolátumot nem azonosítottak helyesen. A 16S rRNS génszekvenálás eredményei azt mutatták, hogy ez részben annak a ténynek köszönhető, hogy számos faj nem volt jelen az adatbázisban. Öt *Prevotella* törzset

tévesen azonosítottak a nemzetség szintjén, ebből két törzs egy olyan fajhoz tartozott, amely még nem szerepelt az adatbázisban.

Egy másik, szintén az ESGAI irányításával működő jelentős összefoglaló tanulmányban a résztvevő laboratóriumok segítségével validálták az optimalizált Bruker MALDI-TOF MS adatbázist a humán klinikai mintákból izolált anaerob törzsek nagy csoportjának felhasználásával, az emberi fertőzésekben kevésbé gyakran izolált fajokat is bevonva. A jól jellemzett anaerob törzsek fő spektrális profiljait (MSP-k) adták hozzá a db6903 biotípus adatbázis egyik legújabb frissítéséhez; (V6 adatbázis) közös használatra. Ebben a tanulmányban validálták az optimalizált adatbázist (db5989 [V5 adatbázis] + ENRIA MSP) 6309 anaerob izolátum alkalmazásával. A magas fokú azonosítások 3,7%-kal, 71,1%-ról 74,8%-ra nőttek a V5 adatbázis és a megerősített ENRIA MSP használatával. A V5 és az összes ENRIA MSP használatával a nagyfokú megbízhatóságú azonosítások 8,1%-kal, 71,1%-ról 79,2%-ra nőttek (Veloo ACM. *et al.* 2018)

A saját első vizsgálatunkban a MALDI-TOF MS (Bruker MALDI Biotyper) 86,2%-ban tudta azonosítani egy rutin diagnosztikai laboratórium mindennapos anyagából véletlenszerűen kiválasztott klinikai anaerob izolátumokat. A faj-szintű identifikáció a gyártó által javasoltnál alacsonyabb log(score)-ral is elfogadásra került és ezt a legtöbb esetben a biokémiai tesztek és/vagy a szekvenálás megerősítették. Az irodalomban közölt tanulmányok kimutatták, hogy a MALDI-TOF MS teljesítménye számos tényezőtől függ, a helyes faj-szintű identifikáció százalékát párhuzamos mérésekkel javíthatjuk, ahogyan a teljes extrakciós módszerrel is, ha az első mérés, a közvetlen telepből elvégzett mérés alkalmazása nem ad faj-szintű identifikációt (Justesen US *et al.* 2011). Néhány szerző javasolja a log(score) cut-off értékének csökkentését faj-szintű identifikáció esetében (Fedorko DP. *et al.* 2012), vagy, ha a MALDI-TOF <2,0 log(score)-t ad, a szekvenálás alkalmazását (Justesen US. *et al.* 2011). Vizsgálatunk időszakában a Biotyper adatbázisa (3.0 verzió) 1998 fajból származó 3995 MSP-t tartalmazott, akkor beleértve 212 anaerob fajt, amelyek közül a legtöbb a leggyakoribb humán anaerob fertőzésekben patogén szerepet játszhat.

A *Bacteroides/Parabacteroides* csoport tagjai a leggyakoribb etiológiai ágensek a humán fertőzésekben az anaerob Gram-negatív pálcák közül, a csoport különböző fajai fenotípusosan rendkívül hasonlóak, ezért az ezek identifikálására rutin laboratóriumokban alkalmazott automatizált módszerek nem mindig elegendőek a fajok megkülönböztetésére. A meghatározást befolyásolja az anaerobiózis szintje az inkubációs idő alatt és az adatbázisok nem mindig tartalmazzák naprakészen az összes újonnan leírt és elfogadott fajt. A *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek faj-szintű meghatározása azonban fontos, mivel a különböző fajok között jelentős különbségek figyelhetők meg a különböző antibiotikumokkal szembeni rezisztencia arányokban (lásd előző eredményeink). A klasszikus biokémiai módszerek és a preformált enzimeken alapuló gyors identifikáló kitek további tesztek nélkül csak az esetek 52-75%-ban képesek a *Bacteroides/Parabacteroides* fajok pontos identifikálásra.

A második, csak bacteroidesekre korlátozódó vizsgálatunkban a MALDI-TOF módszerrel egyértelműen azonosítani tudtuk a törzsek 97,5%-át (277-ből 270-et) faj szinten. Ez az arány 98,6%-ra emelkedett, amikor a szekvenálási adatokkal alátámasztott *P. distasonis* tömegspektrumait is hozzáadtuk a MALDI Biotyper adatbázishoz. Ez az adatbázis a vizsgálatunk során még fejlesztés alatt állt, nem tartalmazta az összes humán patogén anaerob baktérium tömegspektrumát, egyes fajok a *B. fragilis* csoportból, illetve fajok, amelyeket

régebben *Bacteroides*-nek soroltak be, de ma már átsorolták őket más nemzetségekbe, alulreprezentáltak voltak. Erre megoldás volt és lehet még ma is, ha a szekvenálási adatokkal alátámasztott fajok tömegspektrumait feltöltjük a MALDI Biotyper adatbázisába. Az adatbázis bővítése további referencia törzsekkel vagy szekvenált klinikai izolátumokkal tovább javíthatja az módszer identifikálási kapacitását.

Az európai országokból származó törzsgyűjteményen végzett vizsgálatainkban a törzsek 8,5%-a (23/270) esetén kaptunk magas MALDI log(score)-értékeket, azonban ezen törzsek esetében ettől különböző eredményt kaptunk a klasszikus biokémiai vizsgálatok során. A törzsek többsége (n=14) biokémiailag *B. ovatus*-nak, *B. thetaiotaomicron*-nak vagy *B. uniformis*-nak bizonyult. 16S rRNS gén szekvenálással kimutattuk, hogy egyes izolátumok, amelyeket fenotípusosan *B. thetaiotaomicron*-nak bizonyultak, a szekvenálás után *B. ovatus*-nak vagy *B. distasonis*-nak találtuk. Ezzel egyidőben, a biokémiai módszerekkel *B. uniformis* és *B. caccae*-nak bizonyuló izolátumokat szekvenálással újra identifikálva *B. thetaiotaomicron* eredményt kaptunk. Vizsgálatunkban a szekvenálással alátámasztott eredménnyel rendelkező izolátumok esetén a MALDI TOF MS jóval gyorsabbnak, pontosabbak bizonyult a biokémiai vizsgálatokhoz képest. A *B. nordii* újonnan leírt és elfogadott faj, amely klinikai jelentőséggel bír: vizsgálataink során négy izolátumot azonosítottunk MALDI TOF MS módszerrel, míg ezek közül csak egyet azonosítottunk megfelelően klasszikus biokémiai módszerekkel, kettő esetén *Bacteroides* sp., és további egy esetben *B. ovatus* lett az eredmény. Az utóbbi törzs esetén elvégzett szekvenálás alátámasztja a MALDI-TOF előnyösségét a biokémiai módszerekhez képest ezen ritkán előforduló *Bacteroides* faj identifikálása esetén.

A későbbi, Magyarországon gyűjtött törzsekkel folytatott vizsgálataink során a Biotyper szoftver 3.0 segítségével a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek 94,75%-át tudtuk pontosan, faj szerint azonosítani. A *dna*J, *gyr*B, *hsp*60, *rec*A, *rpo*B és a 16S rRNS gének szekvenálási adatai alapján a filogenetikailag hasonló törzseket családokba (kládokba) sorolták, pl. a következő fajokat: *B. intestinalis/B. cellulosilyticus, B. nordii/B. salyersiae,* és *B. ovatus/B. xylanisolvens* (Handal N. *et al.* 2015). A MALDI-TOF MS és a 16S rRNS gén szekvenálással kapott eredményeink közötti eltérés azzal magyarázható, hogy az SY9, SY64 és SY81 jelű klinikai *Bacteroides* izolátumok ugyanabba a filogenetikai családba tartoztak. Az SY23 (*B. vulgatus/B. fragilis*), SY53 (*B. ovatus/B. thetaiotaomicron*) és SE33 (*B. thetaiotaomicron/B. fragilis*) izolátumok esetén elfogadtuk a 16S rRNS gén szekvenálás eredményét.

Culebras és munkatársai leírták, hogy a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek MALDI-TOF MS módszerrel történő azonosítása 87%-os pontosságú (Culebras E. *et al.* 2012), ugyanakkor a rapid ID 32A módszerrel ez az arány csupán 52,3%. Az ENRIA adatbázis bővítése során a három leggyakoribb vizsgált nemzetség a *Bacteroides* (13,5%), a *Cutibacterium* (9,4%) és a *Prevotella* (8,7%) volt. Az első két nemzetség esetében a nagy hatékonysággal rendelkező azonosítások száma nem növekedett szignifikánsan, mivel az ezekbe tartozó speciesek akkor már jól reprezentáltak voltak a MALDI-TOF MS adatbázisában. A V5 adatbázisban egyes *Bacteroides* fajok: *B. dorei* és *B. xylanisolvens* nem képviseltették magukat (bár ezeket az illesztő szoftverek már „cross-matching”-ként említik), de ezeknek a fajoknak az MSP-i már szerepelnek a minden ENRIA MSP-t tartalmazó gyűjteményben. Amint azt korábban Pedersen és munkatársai leírták, a MALDI-TOF MS nem képes különbséget tenni a *B. vulgatus* és a *B. dorei* között, vagy *B. ovatus* és a *B. xylanisolvens* speciesek között, ezért ezeket a fajokat *B. vulgatus/dorei* és *B. ovatus/xylanisolvens*-ként nevezzük, ha MALDI-TOF módszerrel történt az identifikáció (Pedersen RM. *et al.* 2013).

Vizsgálataink során a humán patogén anaerob fajok identifikálása esetében bizonyítottuk a MALDI-TOF MS módszer gyorsaságát, pontosságát az automatizált biokémiai tesztekkel szemben, elvégeztük a módszer verifikációját a megfelelő kritériumok alapján: pld. 3 párhuzamos mérést végeztünk azonos körülmények között (kivitelező személye, törzsek, módszerek, reagensek), így bizonyítottuk a módszer kitűnő reprodukálhatóságát (94,75%) a *Bacteroides/Parabacteroides* csoportba tartozó törzsek esetében.

Következő tanulmányunk eredményei a MALDI-TOF MS rendszer alkalmazhatóságát bizonyítják a humán kórfolyamatokból leggyakrabban izolált anaerob patogén, a *B. fragilis* törzsek altipizálására: csak a II. csoporthoz (Divízió II.) tartozó *B. fragilis* izolátumok hordozzák a karbapenem rezisztenciáért felelős *cfi*A gént. A klinikai mintákból izolált, majd MALDI-TOF-fal helyesen identifikált *B. fragilis* izolátumok közül egy második futtatásban lehetséges megkülönböztetni azokat a törzseket, amelyek vagy már rezisztensek a karbapenemekre, vagy valószínűleg rezisztenciát fognak kialakítani terápia alatt a megfelelő inszerciós szekvencia elemek mozgatásával a *cfi*A gén aktivációjával (Wybo I. *et al.* 2011; Nagy E. *et al.* 2011/a).

Az I. és II. csoporthoz (Divízió I. és II.) tartozó *B. fragilis* törzsek sikeres elkülönítésével lehetséges előrejelezni a klinikus számára karbapenemek tekintetében egy fontos rezisztencia fenotípus jelenlétét, ami ma már az egyik leggyakrabban alkalmazott antibiotikum csoport a kevert aerob-anaerob fertőzések kezelésére. A *B. fragilis* karbapenem rezisztenciája a fajspecifikus metallo-β-laktamáz enzim termelésének következménye, amit a baktérium *cfi*A (*ccr*A) génje kódol. A karbapenem rezisztens *Bacteroides* törzsek majdnem 100%-a *cfi*A-pozitív *B. fragilis* izolátum. Annak felismerése, hogy a *B. fragilis* törzsek két csoportba oszthatóak, az 1970-es évek végére nyúlik vissza, amikor Johnson és Ault (Johnson DL. és Ault DA. 1978) DNS–DNS homológia arány különbséget találtak nem csak az ismert *Bacteroides* fajok között, hanem a két *B. fragilis* alcsoport törzsei között. A metallo-β-laktamáz gén klónozása és szekvenálása tette lehetővé a *B. fragilis* populáció szűrését, ami demonstrálta, hogy vannak olyan törzsek, amelyek fenotípusosan még nem imipenem rezisztensek a *cfi*A gén hordozása ellenére; az imipenem rezisztenciával rendelkező törzsek esetében egy aktivátor IS elem szükséges a *cfi*A gén megfelelő, upstream elhelyezkedésével (Podglajen I. *et al.* 1994; Sóki J. *et al.* 2004; 2006; 2013/a).

További vizsgálatok bizonyították, hogy a *cfi*A-pozitív törzsek csak a II. csoporthoz tartoznak és a *cfi*A-pozitív és -negatív törzseket különböző molekuláris tipizálási módszerekkel meg lehet különböztetni (Gutacker M. *et al.* 2000; Podglajen I. *et al.* 1995; Terhes G. *et al.* 2007). Az az eredmény, hogy a genom- és a legfontosabb háztartási gének és rRNS szekvenciák megkülönböztetik a két csoportot, tükrözi a tényt, hogy a különbségek a fajok korai evolúciója során alakultak ki. Tanulmányainkban a MALDI-TOF MS alkalmazásán keresztül a humán klinikai mintákból izolált *B. fragilis* törzsek két csoportját különböztettük meg pontosan és gyorsan.

Eredményeink közlésével párhuzamosan egy belga munkacsoport, Ingrid Wybo és munkatársai (2011) a MALDI Biotyper alkalmazásával szintén kimutatták a *cfi*A-pozitív (n=41) és *cfi*A-negatív (n=207) *B. fragilis* törzsek teljes, egyértelmű elkülönítését klinikai törzseket tartalmazó gyűjteményükből egy dendogram elkészítésén keresztül és az összetétel korrelációs index alkalmazásával. Cordovana és munkatársai 2018-ban közöltek egy nagy esetszámú tanulmányt, ahol 5300 *B. fragilis* izolátumot identifikáltak, majd meghatározták a

szubtípust a MALDI-TOF MS segítségével. A Bologna-ból származó törzsek 10,1%-a (41/406 törzs) és a Dortmundból származó törzsek 7,6%-a (374/4894 törzs) tartozott a Divízió II-be, mely eredményeket molekuláris vizsgálatokkal is igazoltak, ezek a törzsek 100%-ban hordozták a *cfi*A gént (Cordovana M. *et al.* 2018).

Jeverica és munkatársai 2019-ben publikálták vizsgálatukat, melynek célja az volt, hogy meghatározzák a *B. fragilis* II. divízióba tartozó (*cfi*A-pozitív) izolátumok elterjedtségét két nagy szlovén, specializált ellátást végző kórházban a véráramból és nem-véráramból származó izolátumok között. A véráramból és az egyéb humán klinikai mintákból származó egymást követő, nem ismétlődő *B. fragilis* izolátumokat 2015 és 2017 közötti időszakban gyűjtötték, majd az előzőekben ismertetett, általunk publikált MALDI-TOF módszerrel vizsgálták (Jeverica S. *et al*. 2019). Összesen 623 egymást követő *B. fragilis* izolátumot vontak be az elemzésbe; 47 (7,5%) izoláltum a véráramból és 576 (92,5%) az egyéb mintákból származott. Az összes izolátum közül 51 (8,2%) bizonyult a II. osztályba tartozónak (*cfi*A pozitív). A II. osztályba tartozó izolátumok aránya a véráram és a nem véráram-izolátumok között 14,9% és 7,6% volt.

Korábban közölt vizsgálatunkban a kiválasztott ***cfi*A-pozitív** *B. fragilis* izolátumok rezisztencia expresszióját és ezek genetikai hátterét előzőleg már részletesen megvizsgáltuk: (i) fenotípusosan rezisztens törzsek (MIC≥16 mg/l) IS elemekkel a *cfi*A génekhez képest upstream; (ii) fenotípusosan rezisztens törzsek (MIC≥16 mg/l), vagy emelkedett imipenem MIC értékekkel (1-8 mg/l), de a *cfi*A génekhez képest upstream IS elemek nélkül; és (iii) fenotípusosan teljesen érzékeny törzsek (MIC≤0,25 mg/l) a *cfi*A génekhez képest upstream IS elemek nélkül (Nagy E. *et al.* 2011). A törzsek ezen három csoportját nem lehetett MALDI-TOF MS-sel megkülönböztetni, ami megerősíti, hogy több szignifikáns genetikai változás felelős az MS spektrum különbségeiért, mint csupán az IS elemek mozgása a genomban. A fentebb említett *cfi*A-pozitív izolátumok második csoportját még nem határoztuk meg megfelelően a pontos expressziós mechanizmusokat illetően, de az eredményeink azt sejtetik, hogy ezek a törzsek heterogén rezisztensek a karbapenemekre és a *cfi*A gének gyenge self-promoterét hasznosítják.

Habár nem minden *cfi*A-pozitív *B. fragilis* törzs rezisztens fenotípusosan a karbapenemekre, mindegyiknek megvan az esélye arra, hogy rezisztenssé váljon erre a fontos antibiotikum csoportra a *cfi*A gén teljes expressziójához szükséges megfelelő IS elem megszerzésével. A *B. fragilis* genomikai csoportja elkülönítésének MALDI-TOF MS-sel történő megerősítése a fajmeghatározással egyidőben gyors, hasznos előrejelzés a klinikus számára, de a mikrobiológiai laboratóriumnak meg kell erősíteni a törzs antibiotikum érzékenységi vizsgálatával a fenotípusos kifejeződést.

Vizsgálataink során bebizonyítottuk, hogy a MALDI-TOF MS alkalmas módszer arra, hogy különbséget tegyünk a jelenleg ismert **különböző *C. acnes* típusok** között (IA, IB, IC, II és III) a típustörzsekre jellemző jellegzetes MS csúcsok megléte alapján. Minden törzs esetében elértük a megfelelő szintű identifikációt (log(score) >2,0) és 24 vagy 48 órás inkubációs időt alkalmazva sem találtunk lényeges különbséget az identifikáció pontosságában és a típusmeghatározásban. A saját elkülönítő rendszerünket használva 48 friss klinikai *C. acnes* izolátumot tudtunk a species meghatározás után a három fő típusba besorolni és a tipizálási eredményeink megegyeztek az eMLST módszer eredményeivel. A MALDI-TOF segítségével az I filogenetikai csoporton belüli szubtípusokat: IA és IB is el tudtuk különíteni, azonban az IA csoporton belül az IA1 és IA2 között a módszer nem tud különbséget tenni. Az általunk

traumatológiai sebészeti beavatkozásból izolált és kazuisztikaként publikált granulómatózus infekciót okozó *C. anes* törzs is jelen vizsgálataink szerint az IB típusba tartozott, ami megfelel az irodalmi adatokban közölt, eszköz-eredetű infekciókban való magasabb arányú előfordulásának és alátámasztja a törzs patogén szerepét (*Saját közlemény:* Körmöndi S. *et al.* 2011).

Annak ellenére, hogy észleléseink alapján a jellemző, 9950 Da csúcs valószínűleg elkülöníti az IC típust, még további, jól karakterizált törzsekkel meg kell ismételni a méréseket, hogy megerősítsük a kiválasztott csúcsnak az IC típusú *C. acnes* törzsekre jellemző különbséget tevő jellegét. A következő két filogenetikai csoport nevezetesen a II-es és a III-as ellenben nagy biztonsággal beazonosítható. Ily módon a 48 klinikai izolátum közül 19 bizonyult IA típusnak, 21 izolátum IB típusnak és 8 minta II-es típusnak a tömegspektrometriai analízis során. A III-as típus esetében azt találtuk, hogy további alcsoport besorolás lehetséges a MALDI-TOF MS módszerrel egy újabb, jellegzetes specifikus csúcs megléte, jelenléte alapján. A *C. acnes* MALDI-TOF MS-módszerrel történő típusmeghatározása során az eMLST-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 szubtípusok elkülönítése révén a kontamináns vagy valódi patogén kérdés eldöntésében, főként a mély szövetekből nyert, hemokultúra és egyéb klinikai mintából történő izolálás során. A MALDI-TOF MS módszer felbontása kevésbé érzékeny, a fő filogenetikai csoportokba való besorolásra azonban alkalmas. A módszer előnye az eMLST tipizálással szemben, hogy sokkal gyorsabban, egyszerűbben ad eredményt és ez a rutin klinikai diagnosztikában fontos segítség mind a klinikusnak, mind a mikrobiológusnak.

7. Az értekezés legfőbb megállapításai, újdonságai

Kutatásaink során a klinikailag legfontosabb **humán patogén anaerob baktériumok** szerepét tanulmányoztuk a diagnosztika és az antibiotikum rezisztencia vizsgálata területén. Az értekezésben prezentált klinikai-kísérletes munka legfőbb megállapításai, újdonságai 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 *cdt*A, *cdt*B, *tcd*A és *tcd*B 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 molekuláris epidemiológiai módszerekkel.
- Vizsgálataink során a *C. difficile* ribotípusok elterjedésének térbeli és időbeli változását hasonlítottuk össze Magyarország különböző területeiről, egymást követő időszakokban. 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 már két binary toxin-termelő törzset találtunk. 2002-2004 közötti vizsgálatunkban a leggyakoribb típus a 014-es ribotípus volt (24,8%). Ezekben az időszakokban még nem találtunk A toxin-negatív és B toxin-pozitív izolátumokat.
- Munkacsoportunk írta le, jellemezte molekuláris diagnosztikai módszerrel az első magyarországi, bizonyítottan 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) és 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 szövettenyészet citotoxicitási vizsgálattal és a kereskedelemben 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. Hasonlóképpen az irodalmi adatokhoz a PCR módszer gátlása (inhibitoros minták) vizsgálatunkban 0,6% (4/600) volt.
- 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. Az erythromycin, clindamycin és moxifloxacin esetében a MIC_{50} és a MIC_{90} értékek nem változtak a vizsgálati időszak alatt szignifikánsan, azonban vizsgálataink alapján a társ-rezisztencia a makrolid/linkózamid, 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 ez csak 6,25% volt. Ennek ellentmondanak a nemzetközi eredmények, más országokban a rifampicin rezisztens izolátumok aránya -ha kis mértékben is- de csökkent. 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 MIC érték 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.
- Hazánkban először kazuisztikaként 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 0,58%-a. A betegek 36,7%-a volt járóbeteg, közülük négynek volt valamilyen bőr- és lágyrész infekciója. A legtöbb esetben a *C. difficile* törzs a vegyes, aerob-anaerob flóra tagja volt, 4 minta esetében izoláltuk a kórokozót színtenyészetben, 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 előfordulású, szegedi halmozódású 198-as PCR ribotípusba tartozott.

Vizsgálatok a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsekkel:

- Munkacsoportunk nemzetközi kooperáció eredményeképpen több európai országból gyűjtött humán klinikai mintákból származó *Bacteroides/Parabacteroides* izolátumokat, majd antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat végeztünk standardizált módon, kerestük a fajok közötti- illetve a régiófüggő különbségeket. Eredményeinket összehasonlítottuk az elmúlt 20 évben végzett európai szintű két nagy felmérés eredményeivel, így nyomon követtük a rezisztencia-arányok alakulását. Az évek során az imipenem és a metronidazol-rezisztenciában nem tapasztaltunk 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 változatos földrajzi különbségeit tárták fel.
- Elsőként végeztük el nagy számú, Magyarország különböző területeiről származó, klinikailag releváns *Bacteroides/Parabacteroides* csoportba tartozó izolátum antibiotikum érzékenységének vizsgálatát tíz antibiotikummal szemben, standard agardilúciós 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 *cfi*A 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 multi-drog efflux transzporter fehérje termeléséért felelős *bex*A gén előfordulását vizsgálja humán klinikai eredetű *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek között. Az általunk megvizsgált 400 magyarországi törzs 20,5%-a hordozta a *bex*A gént és a NBF 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 *bex*A 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 *bex*A 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 részletes molekuláris diagnosztikai módszerekkel. A vizsgált 400 *Bacteroides* izolátum közül 6 MDR törzset azonosítottunk (felhívtuk a figyelmet a lokális halmozódásra), majd molekuláris genetikai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az MDR izolátumok antibiotikum rezisztenciájának molekuláris háttere törzsenként eltért.
- Vizsgálataink során irodalmi adatok alapján összeállított, saját „home-made" PCR módszert dolgoztunk ki és validáltunk, majd megvizsgáltuk a különböző klinikai mintákból származó *B. fragilis* törzsek enterotoxin-termeléséért felelős gén (*bft*) hordozásának arányát, jellemeztük ezek izotípusait, meghatároztuk a C10 és C11 cisztein proteáz termeléséért felelős gének előfordulását (*bfp*1-4, *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. A *bft*-pozitív és –negatív *B. fragilis* törzsek között a *bfp*2 gén előfordulása volt a leggyakoribb és pozitív korreláció volt megállapítható a *bfp*2 és *fpn* gének között. A 26 *bft*-pozitív törzs közül 24-ben volt kimutatható az *fpn* gén, mely fontos szerepet tölt be a *B. fragilis* enterotoxin aktiválásában, ugyanakkor 36 *bft*-negatív *B. fragilis* izolátum szintén hordozta az *fpn* gént.

- Azonosítottunk egy olyan ritka, különleges *B. fragilis* törzset is, amely egyidejűleg hordozta a *cfi*A 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 faj szinten. A faj-szintű 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 faj-szintű identifikáció arányát párhuzamos mérésekkel és a teljes extrakciós módszerrel javíthatjuk, ha a közvetlen telepből elvégzett mérés alkalmazása nem ad faj-szintű identifikációt.
- Tanulmányoztuk a MALDI-TOF MS módszer 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 *cfi*A gént, illetve amelyek nem (a Divízió I és II). Vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy a törzsek egy *cfi*A-negatív specifikus és egy *cfi*A-pozitív specifikus *B. fragilis* I. és II. csoportba voltak sorolhatóak a törzs spektrum jellemzők alapján. Munkacsoportunk a Bruker Daltonik céggel tudományos-kutatási együttműködés során segítséget nyújtott egy olyan MALDI Biotyper szoftver kifejlesztéséhez, mely vizsgálataink alapján minden esetben helyesen osztályozta a *B. fragilis* törzseket, jelezve az ilyen megközelítés alkalmasságát a *B. fragilis* I. és II. csoportjának megkülönböztetésére.
- Értékeltük 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 eMLST-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 szubtípusok gyors elkülönítése révén a kontamináns vagy valódi patogén kérdés

eldöntésében mély szövetekből nyert, hemokultúra és egyéb klinikai mintából történő izolálás során. Munkacsoportunk ebben az esetben is a Bruker Daltonik céggel tudományos-kutatási együttműködés során tudományos bizonyítékot nyújtott egy olyan MALDI Biotyper szoftver kifejlesztésében, mely vizsgálataink alapján minden esetben lehetőséget adott a *C. anes* törzsek típusmeghatározása.

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 tudományos-kutatási kooperációk eredményeképpen jöttek létre. Másrészt maguk az általunk kapott adatok, ill. feltárt összefüggések mind epidemiológiai, mind diagnosztikus szempontból, mind a klinikumban, a betegek terápiájának vezetése szempontjából fontos tényezők.

Jelenleg Magyarororszagról nincsenek elérhető adatok a különböző fekvőbeteg intézményekből a CDI-t okozó *C. difficile* törzsek ribotípusairól, valamint a 027-es ribotípusú járványtörzs cirkulációjáról. Kutatásaink azonban rávilágítanak arra, hogy egyes kórházakban, osztályokon még mindig a 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 fontos a pontos helyi és nemzeti antibiotikum rezisztencia adatok nyerése, illetve kritikus a betegek számára a megfelelő antibiotikus terápia választása szempontjából.

Munkacsoportunk a Bruker Daltonik céggel és az ESCMID-ENRIA munkacsoport aktív tagjaként, tudományos-kutatási együttműködés során tudományos bizonyítékokat nyújtott a MALDI-TOF MS módszer rutin diagnosztikai alkalmazására az anaerob baktériumok species-szintű identifikálásában, tevékenyen részt vettünk az anaerob adatbázis felépítésében, egyes esetekben új Biotyper szoftver kifejlesztésében.

Vizsgálataink alapján egyértelmű, hogy a MALDI-TOF MS használatának egyik fő előnye az anaerob infekciók diagnosztikájában a megtakarított idő, az adott baktériumtörzs pontos, species-szintű azonosítása kevesebb, mint egy óra alatt végezhető el, szemben a 24–72 órával, ez az idő kritikus a súlyos alapbetegségekben szenvedő betegeknél, immunhiányos betegeknél, sebészeti, intenzív osztályokon fekvő, lélegeztetett szeptikus betegeknél a helyes, célzott terápia miatt.

8. Irodalomjegyzék

Abt CM, McKenney PT, Pamer EG: *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. Nat Rev Microbiol 2016;14(10):609-620.

Achermann Y, Goldstein EJC, Coenye T, Shirtliff ME: *Propionibacterium acnes:* from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. Clin Microbiol Rev 2014;27:419-440.

al Saif N, Brazier JS: The distribution of *Clostridium difficile* in the environment of South Wales. J Med Microbiol 1996;45(2):133-7.

Alauzet C, Lozniewski A, Marchandin H: Metronidazole resistance and *nim* genes in anaerobes: A review. Anaerobe 2018;55:40-53.

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.

Anhalt JP, Fenselau C: Identification of bacteria using mass-spectrometry. Anal Chem 1975; 47:219-225.

Aronsson B, Möllby R, Nord CE: Antimicrobial agents and *Clostridium difficile* in acute enteric disease: epidemiological data from Sweden, 1980-1982. J Infect Dis 1985; 151(3):476-481.

Aspevall O, Lundberg A, Burman LG, Akerlund T, Svenungsson B: Antimicrobial susceptibility pattern of *Clostridium difficile* and its relation to PCR ribotypes in a Swedish University Hospital. Antimicrob Ag Chemother 2006;50:1890-1892.

Aubin GG, Portillo ME, Trampuz A, Corvec S: *Propionibacterium acnes,* an emerging pathogen: from acne to implant-infections, from phylotype to resistance. Med Mal Infect 2014;44:241-250.

Bachoual R, Dubreuil L, Soussy CJ, Tankovic J: Roles of *gyrA* mutations in resistance of clinical isolates and in vitro mutants of *Bacteroides fragilis* to the new fluoroquinolone trovafloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2000;44(7):1842-1845.

Bagdasarian N, Rao K, Malani PN: Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults: a systematic review. JAMA 2015;313(4):398-408.

Baines SD, O'Connor R, Freeman J, Fawley WN, Harmanus C, Mastrantonio P. *et al.*: Emergence of reduced susceptibility to metronidazole in *Clostridium difficile*. J Antimicrob Chemother 2008;62:1046-1052.

Bakker D, Smits WK, Kuijper EJ, Corver J: TcdC does not significantly repress toxin expression in *Clostridium difficile* 630ΔErm. PLoS One 2012;7:e43247.

Bao Y, Tang J, Qian Y, Sun T, Chen H, Chen Z. *et al*: Long noncoding RNA BFAL1 mediates enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-related carcinogenesis in colorectal cancer via the RHEB/mTOR pathway. Cell Death Dis 201912;10(9):675.

Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Brazier J, Kuijper E, Poxton I: Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates. Clin Microbiol Infect 2007;13:1048-1057.

Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, Gorbach SL, Onderdonk AB: Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N Engl J Med 1978;298:531-534.

Bauer MP, Notermans DW, vanBenthem BH, Brazier JS, Wilcox MH, Rupnik M. *et al.*: *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey. Lancet 2011;377:63-73.

Behra-Miellet J, Calvet L, Mory F, Muller C, Chomarat M, Bézian MC. *et al.*: Antibiotic resistance among anaerobic Gram-negative bacilli: lesson from a French multi-centric survey. Anaerobe 2003;9:105-111.

Bélanger SD, Boissinot M, Clairoux N, Picard FJ, Bergeron MG: Rapid detection of *Clostridium difficile* in feces by real-time PCR. J Clin Microbiol 2003;41:730-734.

Betriu C, Culebras E, Gómez M, Lopez F, Rodríguez-Avial I, Picazo JJ: Resistance trends of the *Bacteroides fragilis* group over a 10-year period, 1997 to 2006, in Madrid, Spain. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2686-2690.

Bidet P, Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Petit JC: Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. FEMS Microbiol Lett 1999;175(2):261-266.

Bik EM: Composition and function of the human-associated microbiota. Nut Rev 2009;67: S164-S171.

Bizzini A, Greub G: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clin Microbiol Infect 2010;16:1614-1619.

Boente RF, Ferreira LQ, Falcão LS, Miranda KR, Guimarães PLS, Santos-Filho J. *et al*.: Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. Anaerobe 2010;16:190e4

Boisrenoult P: *Cutibacterium acnes* prosthetic joint infection: Diagnosis and treatment. Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research 2018;104:S19-S24.

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

Borriello SP: Pathogenesis of *C. difficile* infection. J Antimicrob Chemother 1998;41SC:13-19.

Boyanova L, Kolarov R, Mitov I: Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. Anaerobe 2015;31:4-10.

Braun M, Herholz C, Straub R, Choisat B, Frey J, Nicolet J. *et al*.: Detection of the ADP-ribosyltransferase toxin gene (*cdt*A) and its activity in *Clostridium difficile* isolates from Equidae. FEMS Microbiol Lett 2000;184:29-33.

Brazier JS, Fawley W, Freeman J, Wilcox M: Reduced susceptibility of *Clostridium difficile* to metronidazole. J Antimicrob Chemother 2001;48:741-742.

Brazier JS, Patel B, Rearson A: Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in British Hospitals. Euro Surveill 2007Apr 26;12(4):E070426.2

Britz ML, Wilkinson RG: Chloramphenicol acetyl-transferase of *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother 1978;14:105-111.

Brook I: Meningitis and shunt infection caused by anaerobic bacteria in children. Pediatr Neurol 2002/a;26(2):99-105.

Brook I: Endocarditis due to anaerobic bacteria. Cardiology 2002/b;98:1-5.

Brüggemann H, Henne A, Hoster F, Liesegang H, Wiezer A, Strittmatter A. *et al*.: The complete genome sequence of *Propionibacterium acnes*, a commensal of human skin. Science 2004;305:671–673.

Bush K, Jacoby GA: Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(3):969-976.

Cain TC, Lubman DM, Weber WJ: Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser/desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1994;8:1026-1030.

Cambra I, Garcia FJ, Martinez M: Clan CD of cysteine peptidases as an example of evolutionary divergencies in related protein families across plant clades. Gene 2010;449:59-69.

Carter GP, Douce GR, Govind R, Howarth PM, Mackin KE, Spencer J. *et al*.: The anti-sigma factor TcdC modulates hypervirulence in an epidemic BI/NAP1/027 clinical isolate of *Clostridium difficile*. PLoS Pathog 2011;7:e1002317.

Cartman ST, Kelly ML, Heeg D, Heap JT, Minton NP: Precise manipulation of the *Clostridium difficile* chromosome reveals a lack of association between the *tcd*C genotype and toxin production. Appl Environ Microbiol 2012;78:4683-4690.

Centers of Diseases Control and Prevention: Multidrug-Resistant *Bacteroides fragilis*-Seattle, Washington, 2013. CDC Morbidity and Mortality Weekly Report 2013;62:694-696.

Chassard C, Delmas E, Lawson PA, Bernalier-Donadille A: *Bacteroides xylanisolvens* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. Int J Syst Evol Microbiol 2008;58:1008-1013.

Cheknis A, Johnson S, Chesnel L, Petrella L, Sambol S, Dale SE. *et al*.: Molecular epidemiology of *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains recovered from clinical trials in the US, Canada and Europe from 2006-2009 to 2012-2015. Anaerobe 2018;53:38-42.

Choi VM, Herrou J, Hecht AL, Teoh WP, Turner JR, Crosson S. *et al*.: Activation of *Bacteroides fragilis* toxin by a novel bacterial protease contributes to anaerobic sepsis. Nat Med 2016;22(5):563-567.

Chung GT, Franco AA, Wu S, Rhie GE, Cheng R, Oh HB. *et al*.: Identification of the third metalloprotease toxin gene in extraintestinal isolates of *Bacteroides fragilis.* Infect Immun 1999;67:4945-4949.

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.

Citron DM, Babakhani F, Goldstein EJC, Nagaro K, Sambol S, Sears P. *et al*.: Typing and susceptibility of bacterial isolates from the fidaxomicin (OPT-80) phase II study for *C. difficile* infection. Anaerobe 2009;15:234-236.

Citron DM: Pre-molecular identification: ignorance was bliss? Anaerobe 2012;18:189-191.

Clarke G: Minireview: Gut microbiota: the neglected endocrine organ. Mol Endocrinol 2014; 28(8):1221-1238.

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.

Claros MC, Claros ZC, Tang YJ, Cohen SH, Silva J, Goldstein EJ. *et al*.: Occurrence of *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene-carrying strains in Germany and the United States. J Clin Microbiol 2000;38:1996-1997.

Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB: The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. Nature Biotechnol 1996;14:1584-1586.

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.

Cordero-Laurent E, Rodríguez C, Rodríguez-Cavallini E, Gamboa-Coronado MM, Quesada-Gómez C: Resistance of *Bacteroides* isolates recovered among clinical samples from a major Costa Rican hospital between 2000 and 2008 to ß-lactams, clindamycin, metronidazole, and chloramphenicol. Rev Esp Quimioter 2012;25(4):261-265.

Cordovana M, Kostrzewa M, Sóki J, Witt E, Ambretti S, Pranada AB: *Bacteroides fragilis*: A whole MALDI-based workflow from identification to confirmation of carbapenemase production for routine laboratories. Anaerobe 2018;54:246-253.

Correa-Martínez CL, Idelevich EA, Sparbier K, Kostrzewa M, Becker K: Rapid detection of Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBL) and AmpC β-Lactamases in *Enterobacterales*: development of a screening panel using the MALDI-TOF MS-based direct-on-target microdroplet growth assay. Front Microbiol 2019;10:13.

Costa CL, Mano de Carvalho CB, González RH, Gifoni MAC, Ribeiro RA, Quesada-Gómez C. *et al*: Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in a Brazilian cancer hospital. Anaerobe 2017;48:232-236.

Cox MA, Hernandez LD, Gupta P, Zhang Z, Racine F, Therien AG: Assays for measuring *C. difficile* toxin activity and inhibition in mammalian cells. *In.*: *Clostridium difficile*. A comprehensive overwiew. Chapter 5. Intech Open. 2017. Edited by: Shymaa Enamy. ISBN 978-953-51-4328-2.

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.

Culebras E, Rodríguez-Avial I, Betriu C, Gómez M, Picazo JJ: Rapid identification of clinical isolates of *Bacteroides* species by matrix-assisted laser-desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. Anaerobe 2012;18:163-165.

Curry SR: *Clostridium difficile*. Clin Lab Med 2010;30(1):329-342.

Darkoh C, DuPont HL, Norris SJ, Kaplan HB: Toxin synthesis by *Clostridium difficile* is regulated through quorum signaling. MBio 2015;6(2):e02569.

Dave M, Higgins PDR, Middha S, Rioux KP: The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. Transl Res 2012;160(4):246-257.

Davies KA, Longshaw CM, Davis GL, Bouza E, Barbut F, Barna Z. *et al.*: Underdiagnosis of *Clostridium difficile* across Europe: the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID). Lancet Infectious Diseases 2014;14(12):1208-1219.

Dekio I, Rajedram D, Morita E, Garbia S, Shah HN: Genetic diversity of *Propionibacterium acnes* strains isolated from human skin in Japan and comparison with their distribution in Europe. J Med Microbiol 2012;61:622-630.

Delmée M: Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* disease. Clin Microbiol Infect 2001;7(8):411-416.

Diniz AN, de Oliveira Júnior CA, Vilela EG, Figueiredo HCP, Rupnik M, Wilcox MH. *et al*: Molecular epidemiology of *Clostridioides* (previously *Clostridium) difficile* isolates from a university hospital in Minas Gerais, Brazil. Anaerobe 2019;56:34-39.

Downes J, King A, Hardie J, Phillips I: Evaluation of the Rapid ID 32A system for identification of anaerobic Gram-negative bacilli, excluding the *Bacteroides fragilis* group. Clin Microbiol Infect 1999;5(6):319-326.

Eitel Zs, Sóki J, Urbán E, Nagy E: The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. Anaerobe 2013;21:43-49.

Fawley WN, Knetsch CW, MacCannell DR, Harmanus C, DuT, Mulvey MR. *et al.*: Development and validation of an internationally-standardized, high-resolution capillary gel-based electrophoresis PCR-ribotyping protocol for *Clostridium difficile*. PLoS One 2015;10:e0118150.

FDA. 2010. Drug safety communication—increased risk of death with Tygacil (tigecycline) compared to other antibiotics used to treat similar infections. FDA, Washington, DC.

Fedorko DP, Drake SK, Stock F, Murray PR: Identification of clinical isolates of anaerobic bacteria using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012;31:2257-2262.

Fenyvesi VS, Urbán E, Bartha N, Ábrók M, Kostrzewa M, Nagy E, *et al.*: Use of MALDI-TOF/MS for routine detection of *cfi*A gene-positive *Bacteroides fragilis* strains. Int J Antimicrob Agents 2014;44:469-476.

Fernández-Canigia L, Litterio M, Legaria MC, Castello L, Predari SC, Di Martino A, *et al.*: First national survey of antibiotic susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group: emerging resistance to carbapenems in Argentina. Antimicrob Agents Chemother 2012;56(3):1309-1314.

Fernández-García L, Blasco L, López M, Tomás M: *Clostridium difficile* Infection: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. *In: Clostridium Difficile* - A Comprehensive Overview, Shymaa Enany, IntechOpen, (September 27th 2017). DOI: 10.5772/67754.

Finney JMT: Gastroenterology for cicatrizing ulcer of the pylorus. Bull Johns Hopkins Hosp 1893;4:53-55.

Franco AA, Cheng RK, Chung GT, Wu S, Oh HB, Sears CL: Molecular evolution of the pathogenicity island of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains. J Bacteriol 1999;181:6623-6633.

Franco AA: The *Bacteroides fragilis* pathogenicity island is contained in a putative novel conjugative transposon. J Bacteriol 2004;186:6077-6092.

Freeman J, Bauer MP, Baines SD, Corver J, Fawley WN, Goorhuis B. *et al.*: The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections. Clin Microbiol Rev 2010;23:529-549.

Freeman J, Vernon J, Pilling S, Morris K, Nicolson S, Shearman S. *et al.*: Five-year pan-European, longitudinal surveillance of *Clostridium difficile* ribotype prevalence and antimicrobial resistance: the extended ClosER study. Clin Microbiol Infect *accepted for publication* 2019.

Freeman J, Vernon J, Morris K, Nicholson S, Todhunter S, Longshaw C. *et al*.: Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridium difficile* ribotypes. Clin Microbiol Infect 2015;21:248.e9-248.e16.

García N, Gutiérez G, Lorenzo M, García JE, Piríz S, Quesada A: Genetic determinants for *cfxA* expression in *Bacteroides* strains isolated from human infections. Antimicrob Chemother 2008;62:942-947.

García-Lechuz JM, Hernangómez S, Juan RS, Peláez T, Alcalá L, Bouza E: Extra-intestinal infections caused by *Clostridium difficile.* Clin Microbiol Infect 2001;7:453-457.

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.

Ghotaslou R, Yekani M, Memar MY: The role of efflux pumps in *Bacteroides fragilis* resistance to antibiotics. Microbiol Res 2018;210:1-5.

Gilmore MS, Ferretti JJ: The thin line between gut commensal and pathogen. Science 2003;299:1999-2002.

Goldstein EJC, Babakhani F, Citron DM: Antimicrobial activities of fidaxomicin. Clin Infect Dis 2012;55:S143-S148.

Goldstein EJC, Citron DM, Goldman PJ, Goldman RJ: National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: III. Anaerobe 2008;14: 68-72.

Goldstein EJC, Citron DM, Sears P, Babakhani F, Sambol SP, Gerding DN: Comparative susceptibilities to fidaxomicin (OPT-80) of isolates collected at baseline, recurrence, and failure from patients in two Phase III trials of fidaxomicin against *Clostridium difficile* infection. Antimicrob Agents Chemother 2011/a;55:5194-5199.

Goldstein EJC, Solomkin JS, Citron DM, Alder JD: Clinical efficacy and correlation of clinical outcomes with in vitro susceptibility for anaerobic bacteria in patients with complicated intra-abdominal infections treated with moxifloxacin. Clin Infect Dis 2011/b;53:1074-1080.

Goorhuis A, Bakker D, Corver J, Debast SB, Harmanus C, Notermans DW, *et al.*: Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis 2008;47:1162-1170.

Goorhuis A, Van der Kooi T, Vaessen N, Dekker FW, Van den Berg R, Harmanus C, *et al*: Spread and epidemiology of *Clostridioides difficile* polymerase chain reaction ribotype 027/toxinotype III in The Netherlands. Clin Infect Dis 2007;45:695-703.

Grosse-Herrenthey A, Maier T, Gessler F, Schaumann R, Böhnel H, Kostrzewa M, *et al*.: Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry. Anaerobe 2008;14:242-249.

Guilbault C, Labbé AC, Poirier L, Busque L, Béliveau C, Laverdiére M: Development and evaluation of a PCR method for detection of the *Clostridium difficile* toxin B gene in stool specimens. J Clin Microbiol 2002;40:2288-2290.

Gulácsi L, Kertész A, Kopcsóné Németh I, Banai J, Ludwig E, Prinz Gy, *et al*.: A *Clostridium difficile*-fertőzések epidemiológiája, betegségterhe és terápiája. Orvosi Hetilap 2013;154(30):1188-1193.

Gülke I, Pfeifer G, Liese J, Fritz M, Hofmann F, Aktories K, *et al*.: Characterization of the enzymatic component of the ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. Infect Immun 2001;69:6004-6011.

Gupta A, Patel R, Baddour LM, Pardi DS, Khanna S: Extraintestinal *Clostridium difficile* infections: a single-center experience. Mayo Clin Proc 2014;89:1525-1536.

Gürtler V: Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions. J Gen Microbiol 1993;139:3089-3097.

Gutacker M, Valsangiacomo C, Bernasconi MV, Piffaretti JC: RecA and glnA sequences separate the *Bacteroides fragilis* population into two genetic divisions associated with the antibiotic resistance genotypes *cep*A and *cfi*A. J Med Microbiol 2002;51(2):123-130.

Gutacker M, Valsangiacomo C, Piffaretti JC: Identification of two genetic groups in *Bacteroides fragilis* by multilocus enzyme electrophoresis: distribution of antibiotic resistance (*cfi*A, *cep*A) and enterotoxin (*bft*) encoding genes. Microbiology 2000;146:1241-1254.

Hafiz S, Oakley CL: *Clostridium difficile*: isolation and characteristics. J Med Microbiol 1976; 9(2):129-136.

Hall GH, Barlow M: Revised Ambler classification of *β*-lactamases. J Antimicrob Chemother 2005;55(6):1050-1051.

Hall IC, O'Toole E: Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe, *Bacillus difficilis.* Am J Dis Child 1935;49:390-402.

Handal N, Jørgensen SB, Tunsjø HS, Johnsen BO, Leegaard TM: Anaerobic blood culture isolates in a Norwegian university hospital: identification by MALDI-TOF MS vs 16S rRNA sequencing and antimicrobial susceptibility profiles. APMIS 2015;123:749-758.

Hartmeyer GN, Sóki J, Nagy E, Justesen US: Multidrug-resistant *Bacteroides fragilis* group on the rise in Europe? J Med Microbiol 2012;61:1784-1788.

Hecht DW, Galang MA, Sambol SP, Osmolski JR, Johnson S, Gerding DN: In vitro activities of 15 antimicrobial agents against 110 toxigenic *Clostridium difficile* clinical isolates collected from 1983 to 2004. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:2716-2719.

Hedberg M, Nord CE: Antimicrobial susceptibilities of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe. Clin Microbiol Infect 2003;9:475-488.

Heinonen PK, Leinonen M: Fecundity and morbidity following acute pelvic inflammatory disease treated with doxycycline and metronidazole. Arch Gynecol Obstet 2003; 268:284-288.

Holdeman LV, Moore WEC: Anaerobe laboratory manual: by the staff of the Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University. 4th ed. 1977.

Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, *et al*.: Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1996;14:911-917.

Holmberg A, Lood R, Mörgelin M, Söderquist B, Holst E, Collin M, Christensson B, Rasmussen M: Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is a characteristic of invasive isolates. Clin Microbiol Infect 2009;15(8):787-795.

Hrabák J, Chudácková E, Walková R: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. Clin Microbiol Rev 2013;26(1):103-114.

http://www.bacterio.net/bacteroides.html

Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE: Antimicrobial resistance in *Clostridium difficile*. Int J Antimicrob Agents 2009;34:516-522.

Hundsberger T, Braun V, Weidmann M, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C: Transcription analysis of the genes *tcd*A-E of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*. Eur J Biochem 1997;244:735-742.

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 (*nim*J). Antimicrob Agents Chemother 2013;57(8):3767-3774.

Imwattana K, Wangroongsarb P, Riley TV: High prevalence and diversity of *tcd*A-negative and *tcd*B-positive, and non-toxigenic, *Clostridium difficile* in Thailand. Anaerobe 2019; 57:4-10.

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.

Ingham HR, Eaton S, Venables CW, Adams PC: *Bacteroides fragilis* resistant to metronidazole after long-term therapy. Lancet 1978;28:1(8057):214.

Jamal W, Al Hashem G, Rotimi VO: Antimicrobial resistance among anaerobes isolated from clinical specimens in Kuwait hospitals: comparative analysis of 11-year data. Anaerobe 2015;35:25-30.

Janoir C: Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. Anaerobe 2016;37:13-24.

Jeverica S, Kolenc U, Mueller-Premru M, Papst L: Evaluation of the routine antimicrobial susceptibility testing results of clinically significant anaerobic bacteria in a Slovenian tertiary-care hospital in 2015. Anaerobe 2017;47:64-69.

Jeverica S, Sóki J, Mueller Premru M, Nagy E, Papst L: High prevalence of division II (*cfiA* positive) isolates among blood stream *Bacteroides fragilis* in Slovenia as determined by MALDI-TOF MS. Anaerobe 2019;58:30-34.

Johansson Å, Nagy E, Sóki J: Detection of carbapenemase activities of *Bacteroides fragilis* strains with matrix-assisted laser desorption ionization -Time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Anaerobe 2014;26:49-52.

Johnson JL, Ault DA: Taxonomy of the *Bacteroides*. II. Correlation of phenotypic characteristics with deoxyribonucleic acid homology groupings for *Bacteroides fragilis* and other saccharolytic *Bacteroides* species. Int J Syst Bacteriol 1978;28:257-268.

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

Justesen US, Holm A, Knudsen E, Andersen LB, Jensen TG, Kemp M. *et al.*: Species identification of clinical isolates of anaerobic bacteria: a comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. J Clin Microbiol 2011;49(12):4314-4318.

Justesen US, Skov MN, Knudsen E, Holt HM, Søgaard P, Justesen T: 16S rRNA gene sequencing in routine identification of anaerobic bacteria isolated from blood cultures. J Clin Microbiol 2010;48(3):946-948.

Karlowsky JA, Walkty AJ, Adam HJ, Baxter MR, Hoban DJ, Zhanel GG: Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group in Canada in 2010-2011: CANWARD surveillance study. Antimicrob Agents Chemother 2012;56(3):1247-1252.

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 H, Senoh M, Honda H, Fukuda T, Yasuaki T, Horiuchi H. *et al.*: *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection burden in Japan: A multicenter prospective study. Anaerobe 2019; Mar 12:102011. doi: 10.1016/j.anaerobe.2019.03.007. [Epub ahead of print]

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.

Kato N, Kato H, Watanabe K, Ueno K: Association of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with bacteremia. Clin Infec Dis 1996;23(1):83-86.

Kato H, Kita H, Karasawa T, Maegawa T, Koino Y, Takakuwa H. *et al.*: Colonisation and transmission of *Clostridium difficile* in healthy individuals examined by PCR ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. J Med Microbiol 2001;50*:*720-727.

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.

Kierzkowska M, Majewska A, Szymanek-Majchrzak K, Sawicka-Grzelak A, Mlynarczyk A, Mlynarczyk G: The presence of antibiotic resistance genes and *bft* genes as well as antibiotic susceptibility testing of *Bacteroides fragilis* strains isolated from inpatients of the Infant Jesus Teaching Hospital, Warsaw during 2007-2012. Anaerobe 2019;56:109-115.

Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier JS, Kuijper EJ, Pepin J. *et al.*: Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. J Clin Microbiol 2008;46:431-437.

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.

Kleinkauf N, Weiss B, Jansen A, Eckmanns T, Bornhofen B, Küehnen E*, et al*: Confirmed cases and report of clusters of severe infections due to *Clostridioides difficile* PCR ribotype 027 in Germany. Euro Surveill. 2007Nov 15;12(11):E071115.2

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.

Könönen E, Conrads G, Nagy E: *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* and Other Anaerobic Gram-Negative Rods. *In:* Caroll KC: Manual of Clinical Microbiology. Twelfth Edition, American Society of Microbiology. 2019. ISBN 10: 1555819834

Krishnamurthy T, Ross PL, Rajamani U: Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1996;10:883-888.

Krutova M, Matejkova J, Tkadlec J, Nyc O: Antibiotic profiling of *Clostridium difficile* ribotype 176, a multidrug resistant relative to *C. difficile* ribotype 027. Anaerobe 2015;36:88-90.

Kuijper EJ, Coignard B, Tull P: Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect 2006;12(S6):2-18.

Kwon SS, Gim JL, Kim MS, Kim H, Choi JY, Yong D. *et al.*: Clinical and molecular characteristics of community-acquired *Clostridium difficile* infections in comparison with those of hospital-acquired *C. difficile.* Anaerobe 2017;48:42-46.

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

Lartigue MF, Kostrzewa M, Salloum M, Haguenoer E, Héry-Arnaud G, Domelier AS. *et al.*: Rapid detection of "highly virulent" Group B *Streptococcus* ST-17 and emerging ST-1 clones by MALDI-TOF mass spectrometry. J Microbiol Methods 2011;86(2):262-265.

Lau SK, Ng KH, Woo PC, Yip KT, Fung AM, Woo GK. *et al.*: Usefulness of the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system for identification of anaerobic Gram positive bacilli isolated from blood cultures. J Clin Pathol 2006;59(2):219-222.

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'Omics-A Genealogical Treasury of Words. The Scientist 2001;15(7):8.

Lee EH, Degener JE, Welling GW, Veloo AC: Evaluation of the Vitek 2 ANC card for identification of clinical isolates of anaerobic bacteria. J Clin Microbiol 2011;49(5):1745-1749.

Lees EA, Miyajima F, Pirmohamed M, Carrol ED: The role of *Clostridium difficile* in the paediatric and neonatal gut-a narrative review. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2016;35:1047-1057.

Liu Ch-Y, Huang YT, Liao ChH, Yen Li Ch, Lin HY, Hseuh PR: Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenem. Antimicrob Agents Chemother 2008;52(9):3161-3168.

Livermore DM, Woodford N: Carbapenemases: a problem in waiting? Curr Opin Microbiol 2000;3:489-495.

Löfmark S, Fang H, Hedberg M, Edlund C: Inducible metronidazole resistance and *nim* genes in clinical *Bacteroides fragilis* group isolates. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:1253-1256.

Long S, Fenelon L, Fitzgerald S, Nolan N, Burns K, Hannan M, et al: First isolation and report of clusters of *Clostridioides difficile* PCR 027 cases in Ireland. Euro Surveill. 2007 Apr 26;12(4):E070426.3

Lopes Cançado GG, Silveira Silva RO, Rupnik M, Nader AP, Starling de Carvalho J, Miana de Mattos Paixão G. *et al*: Clinical epidemiology of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with antibiotic-associated diarrhea in a university hospital of Brazil. Anaerobe 2018;54:65-71.

Luckey TD: Introduction to intestinal microecology. Am J Clin Nutr 1972;25:1292-1294.

Luczak M, Obuch-Woszczatyński P, Pituch H, Leszczyński P, Martirosian G, Patrick S. *et al.*: Search for enterotoxin gene in *Bacteroides fragilis* isolated from clinical specimens in Poland, Great Britain, the Netherlands and France. Med Sci Monit 2001;7:222-225.

Lynch T, Chong P, Zhang J, Hizon R, Du R, Graham MR. *et al.*: Characterization of a stable, metronidazole-resistant *Clostridium difficile* clinical isolate. PLOS One 2013;8:e53757.

Lyytikäinen O, Mentula S, Könönen E, Kotila S, Tarkka E, Anttila VJ. *et al*: First isolation of *Clostridioides difficile* PCR ribotype 027 in Finland. Euro Surveill 2007Nov8;12(11):E071108.2

Mani N, Dupuy B: Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:5844-5849.

Mani N, Lyras D, Barroso L, Howarth P, Wilkins T, Rood JI, *et al.*: Environmental response and autoregulation of *Clostridium difficile* TxeR, a sigma factor for toxin gene expression. J Bacteriol 2002;184:5971-5978.

Matamouros S, England P, Dupuy B: *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. Mol Microbiol 2007;64:1274-1288.

Mattila E, Arkkila P, Mattila PS, Tarkka E, Tissari P, Anttila VJ: Extraintestinal *Clostridium difficile* infections. Clin Infect Dis 2013;57(6):148-153.

McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, Owens RC Jr, Kazakova SV, Sambol SP. *et al.*: An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*. N Engl J Med 2005;353:2433-2441.

McDowell A, Barnard E, Nagy I, Gao A, Tomida S, Li H. *et al.*: An expanded multilocus sequence typing scheme for *Propionibacterium acnes*: Investigation of 'pathogenic', 'commensal' and antibiotic resistant strains. PLoS One 2012a;7:e41480.

McDowell A, Hunyadkürti J, Horváth B, Vörös A, Bernard E, Patrick S. *et al.*: Draft genome sequence of an antibiotic resistant *Propionibacterium acnes* strain PRP-38 from the novel type IC cluster. J Bacteriol 2012b;194:3260-3261.

McDowell A, Nagy I, Magyari M, Barnard E, Patrick S: The opportunistic pathogen *Propionibacterium acnes*: insights into typing, human disease, clonal diversification and CAMP factor evolution. PLoS One 2013;8:e70897.

McDowell A, Valanne S, Ramage G, Tunney MM, Glenn JV, McLorinan GC. *et al.*: *Propionibacterium acnes* types I and II represent phylogenetically distinct groups. J Clin Microbiol. 2005;43(1):326-334.

McFarland LV: Normal flora: diversity and functions. Microbial Ecology in Health and Disease 2000;12:193-207.

McLuskey K, Mottram JC: Comparative structural analysis of the caspase family with other clan CD cysteine peptidases. Biochem J 2015;466:219-232.

Meggersee R, Abratt V: The occurrence of antibiotic resistance genes in drug resistant *Bacteroides fragilis* isolates from Groote Schuur Hospital, South Africa. Anaerobe 2015;32:1-6.

Merchan C, Parajuli S, Justin Siegfried J, Scipione MR, Dubrovskaya Y, Rahimian J: Multidrug-Resistant *Bacteroides fragilis* bacteremia in a US resident: An Emerging Challenge. Case Rep Infect Dis 2016;3607125.

Miyamae S, Nikaido H, Tanaka Y, Yoshimura F: Active efflux of norfloxacin by *Bacteroides fragilis*. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:2119-2121.

Miyamae S, Ueda O, Yoshimura F, Hwang J, Tanaka Y, Nikaido H: A MATE family multidrug efflux transporter pumps out fluoroquinolones in *Bacteroides thetaiotaomicron*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:3341-3346.

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.

Moon K, Shoemaker NB, Gardner JF, Salyers AA: Regulation of excision genes of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. J Bacteriol 2005;187:5732-5741.

Mundy LM, Sears CL: Detection of toxin production by *Bacteroides fragilis*: assay development and screening of extraintestinal clinical isolates. Clin Infect Dis 1996;23:269.

Murray PR: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. Clin Microbiol Infect 2010;16:1626–1630.

Mutlu E, Wroe AJ, Sanchez-Hurtado K, Brazier JS, Poxton IR: Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitals in south-east Scotland. J Med Microbiol 2007;56:921-929.

Nagy E, Becker S, Sóki J, Urbán E, Kostrzewa M: Differentiation of division I (*cfi*A-negative) and division II (*cfi*A-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.

Nagy E, Szőke I, Gacs M, Csiszár K: Antibiotic susceptibility of *B. fragilis* group strains in Hungary. Anaerobe 1995;1:269-274.

Nagy E, Urbán E, Sóki J, Terhes G, Nagy K: The place of molecular genetic methods in the diagnostics of human pathogenetic anaerobic bacteria. Acta Microbiol Immunol Hung 2006;53(2):183-194.

Nagy I, Pivarcsi A, Kis K, Koreck A, Bodai L, McDowell A. *et al.*: *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. Microbes and Infection/Institut Pasteur. 2006;8(8):2195–2205.

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.

Niazi SA, Al Kharusi HA, Patel S, Bruce K, Beighton D, Foschi F, *et al.*: Isolation of *Propionibacterium acnes* among the microbiota of primary endodontic infections with and without intraoral communication. Clin Oral Investig 2016;20(8): 2149–2160.

Nie S, Tian B, Wang X, Pincus DH, Welker M, Gilhuley K. *et al.*: *Fusobacterium nucleatum* subspecies identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2015;53:1399-402.

Nitzan O, Kennes Y, Colodner R, Saliba W, Edelstein H, Raz R: Chloramphenicol use and susceptibility patterns in Israel: a national survey. Isr Med Assoc J 2015;17:27-31.

O'Connor JR, Galang MA, Sambol SP, Hecht DW, VedantamG, Gerding DN. *et al.*: Rifampin and rifaximin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile*. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2813-2817.

Oh H, El Amin N, Davies T, Appelbaum PC, Edlund C: *gyr*A mutations associated with quinolone resistance in *Bacteroides fragilis* group strains. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1977-1981.

Pantosi A, Menozzi MG, Frate A, Sanfilippo L, D'Ambrosio F, Malpeli M: Detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and its toxin in stool samples from adults in children from Italy. Clin Infect Dis 1997;24:12-16.

Pedersen RM, Marmolin ES, Justesen US: Species differentiation of *Bacteroides dorei* from *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides ovatus* from *Bacteroides xylanisolvens*-back to basic. Anaerobe 2013;24:1-3.

Peláez T, Alcalá L, Alonso R, Rodriguez-Creixems M, García-Lechuz J, Bouza E: Reassessment of *Clostridium difficile* susceptibility to metronidazole and vancomycin. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:1647-1650.

Peláez T, Cercenado E, Alcalá L, Marín M, Martín-López A, Martínez-Alarcón J. *et al.*: Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous. J Clin Microbiol 2008;46:3028-3032.

Perelle S, Gibert M, Bourlioux P, Corthier G, Popoff MR: Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *C. difficile* CD196. Infect Immun 1997;65:1402-1407.

Phillips I, King A, Nord CE, Hoffstedt B: Antibiotic sensitivity of *Bacteroides fragilis* group in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1992;11:292-304.

Piérard D, De Mexer A, Rosseel P, Van Cauwenbergh M, Struelens MJ, Delmee M. *et al.*: *In vitro* activity of amoxycillin plus clavulanic acid and ticarcillin plus clavulanic acid compared with that of other antibiotics against anaerobic bacteria: comparison with the results of the 1987 survey. Acta Clin Belg 1996;51:70-79.

Piérard D, De Meyer A, Rosseel P, Glupczynski Y, Struelens MJ, Delmee M. *et al.*: In vitro activity of amoxycillin plus clavulanic acid and ticarcillin plus clavulanic acid compared with that of other antibiotics against anaerobic bacteria. Acta Clin Belg 1989;44(4):228-236.

Pituch H, Obuch-Woszczatyński P, Lachowicz D, Wultańska D, Karpiński P, Młynarczyk G. *et al.*: Hospital-based *Clostridium difficile* infection surveillance reveals high proportions of PCR ribotypes 027 and 176 in different areas of Poland, 2011 to 2013. Euro Surveill 2015;20(38).

Podglajen I, Breuil J, Casin I, Collatz E: Genotypic identification of two groups within the species *Bacteroides fragilis* by ribotyping and by analysis of PCR-generated fragment patterns and insertion sequence content. J Bacteriol 1995;177:5270-5275.

Podglajen I, Breuil J, Collatz E: Insertion of a novel DNA sequence, IS*1186*, upstream of the silent carbapenemase gene *cfi*A, promotes expression of carbapenem resistance in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. Mol Microbiol. 1994;12:105-114.

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.

Pumbwe L, Skilbeck C, Wexler HM: Impact of anatomic site on growth, efflux pump expression, cell structure and stress responsiveness of *Bacteroides fragilis*. Curr Microbiol 2007;55(4):362-365.

Reid G: When microbe meets human. Clin Infect Dis 2004;39:827-830.

Ricci V, Peterson ML, Rotschafer JC, Wexler HM, Piddock LJ: Role of topoisomerase mutations and efflux in fluoroquinolone resistance of *Bacteroides fragilis* clinical isolates and laboratory mutants. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1344-1346.

Rizzardi K, Åkerlund T: High Molecular Weight Typing with MALDI-TOF MS - A Novel Method for Rapid Typing of *Clostridium difficile*. PLoS One 2015;10(4):e0122457.

Roberts MC: Acquired tetracycline and/or macrolide-lincosamides-streptogramin resistance in anaerobes. Anaerobe 2003;9:63-69.

Rogers MB, Parker AC, Smith CJ: Cloning and characterization of the endogenous cephalosporinase gene, *cepA*, from *Bacteroides fragilis* reveals a new subgroup of Ambler Class A *β*-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1993;37:2391-2400.

Rothen J, Pothier JF, Foucault F, Blom J, Nanayakkara D, Li C, *et al.*: Subspecies Typing of *Streptococcus agalactiae* Based on Ribosomal Subunit Protein MassVariation by MALDI-TOF MS. Front Microbiol 2019;10:471.

Rotimi VO, Jamal WY, Mokaddas EM, Brazier JS, Johny M, Duerden BI: Prevalent PCR ribotypes of clinical and environmental strains of *Clostridium difficile* isolated from intensive-therapy unit patients in Kuwait. J Med Microbiol 2003;52:705-709.

Rupnik M, Garbnar M, Geric B: Binary toxin producing *Clostridium difficile* strains. Anaerobe 2003;9:289-294.

Rupnik M, Janezic S: An update on *Clostridium difficile* toxinotyping. Journal Clin Microbiol 2016;54:13-18.

Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN: *Clostridium difficile* infection: New developments in epidemiology and pathogenesis. Nature Reviews Microbiology 2009;7(7):526-536.

Rupnik M: *Clostridium difficile* toxinotyping. Methods Mol Biol. 2010;646:67-76.

Rupnik M: How to detect *Clostridium difficile* variant strains in a routine laboratory. Clin Microbiol Infect 2001a; 7:417-420.

Rupnik M, Brazier JS, Duerden BI, Grabnar M, Stubbs SL: Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. Microbiology 2001b; 147:439-447.

Sampedro MF, Piper KE, McDowell A, Patrick S, Mandrekar JN, Rouse MS. *et al.*: Species of *Propionibacterium* and *Propionibacterium acnes* phylotypes associated with orthopedic implants. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;64(2):138-145.

Schubert S, Kostrzewa M: MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends. Curr Issues Mol Biol 2017;23:17-20.

Schwanbeck J, Riedel T, Laukien F, Schober I, Oehmig I, Zimmermann O. *et al.*: Characterization of a clinical *Clostridioides difficile* isolate with markedly reduced fidaxomicin susceptibility and a V1143D mutation in *rpo*B. J Antimicrob Chemother 2019;74(1):6-10.

Scotto d'Abusco A, del Grosso M, Censini S, Covacci A, Pantosti A: The alleles of the *bft* gene are distributed differently among enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains from human sources and can be present in double copies. J Clin Microbiol 2000;38:607-612.

Sears CL: The toxins of *Bacteroides fragilis*. Toxicon 2001;39:1737-1746.

Sender R, Fuchs S, Milo R: Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. Cell 2016;164:337-340.

Seng P, Abat C, Rolain JM, Colson P, Lagier JC, Gouriet F. *et al.*: Identification of rare pathogenic bacteria in clinical microbiology laboratory: impact of matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2013;51:2182-2194.

Senneville E, Savage C, Nallet I, Yazdanpanah Y, Giraud F, Migaud H. *et al.*: Improved aero-anaerobe recovery from infected prosthetic joint samples taken from 72 patients and collected intraoperatively in Rosenow's broth. Acta Orthop 2006;77:120-124.

Shah HN, Keys CJ, Schmid O, Gharbia SE: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and proteomics: a new era in anaerobic microbiology. Clin Infect Dis 2002;35(S1):58-64.

Sherwood JE, Fraser S, Citron DM, Wexler HM, Blakely G, Jobloing K. *et al.*: Multidrug resistant *Bacteroides fragilis* recovered from blood and severe leg wounds caused by an improvised explosive device (IED) in Afghanistan. Anaerobe 2011;17:152-155.

Shetab R, Cohen SH, Prindiville T, Tang YJ, Cantrell M, Rahmani D. *et al.*: Detection of *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene by PCR. J Clin Microbiol 1998;36:1729-1732.

Simmon KE, Mirrett S, Reller LB, Petti CA: Genotypic diversity of anaerobic isolates from bloodstream infections. J Clin Microbiol 2008;46(5):1596-1601.

Sloan LM, Duresko BJ, Gustafson DR, Rosenblatt JE: Comparison of real-time PCR for detection of the *tcdC* gene with four toxin immunoassays and culture in diagnosis of *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol 2008;46:1996-2001.

Smith LD, King EO: Occurrence of *Clostridium difficile* in infections of man. J Bacteriol 1962;84:65-67.

Smits WK, Lyras D, Lacy DB, Wilcox MH, Kuijper EJ: *Clostridium difficile* infection. Nat Rev Dis Primers 2016;7(2):16020.

Snydman DR, Jacobus BV, McDermott LA, Ruthazer R, Golan Y, Goldstein EJ. *et al.*: National survey on the susceptibility of *Bacteroides fragilis* group: report and analysis of trends in the United States from 1997 to 2004. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:1649-1655.

Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Supran S, Cuchural GJ, Finegold SM. *et al.*: Multi-centre study of *in vitro* susceptibility of the *Bacteroides fragilis* group. 1995-1996 with comparison of resistance trends from 1990-1996. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:2417-2422.

Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA, Goldstein EJ, Harrell L, Jenkins SG. *et al.*: Trends in antimicrobial resistance among *Bacteroides* species and *Parabacteroides* species in the United States from 2010-2012 with comparison to 2008-2009. Anaerobe 2017;43:21-26.

Sóki J, Edwards R, Hedberg M, Fang H, Nagy E, Nord CE: Examination of *cfiA*-mediated carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis* strains from a European antibiotic susceptibility survey. Int J Antimicrob Ag 2006;28:497-502.

Sóki J, Eitel Zs, Terhes G, Nagy E, Urbán E: Occurrence and analysis of rare *cfi*A-*bft* doubly positive *Bacteroides fragilis* strains. Anaerobe 2013/b;23:70-73.

Sóki J, Eitel Zs, Urbán E, Nagy E: Molecular analysis of the carbapenem and metronidazole resistance mechanisms of *Bacteroides* strains reported in a Europe-wide antibiotic resistance survey. Anaerobe 2013/c;41:122-125.

Sóki J, Urbán E, Szőke I, Fodor E, Nagy E: Prevalence of the carbapenemase gene (*cfi*A) among clinical and normal flora isolates in *Bacteroides* species in Hungary. J Med Microbiol 2004;53:413-430.

Sóki J: Extended role for insertion sequence elements in the antibiotic resistance of *Bacteroides*. World J Clin Infect Dis 2013/a;3(1):1-12.

Song Y: PCR-based diagnostics for anaerobic infections. Anaerobe 2005;11(1-2):79-91.

Spigaglia P, Barbanti F, Mastrantonio P: Multidrug resistance in European *Clostridium difficile* clinical isolates. J Antimicrob Chemother 2011;66:2227-2234.

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.

Stamper PD, Alcabasa R, Aird D, Babiker W, Wehrlin J, Ikpeama I, Carroll KC: Comparison of a commercial real-time PCR assay for *tcdB* detection to a cell culture cytotoxicity assay and toxigenic culture for direct detection of toxin-producing *Clostridium difficile* in clinical samples. J Clin Microbiol 2009;47:373-378.

Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN: Two-component signal transduction. Annu Rev Biochem 2000;69:183-215.

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.

Sun X, Savidge T, Feng H: The Enterotoxicity of *Clostridium difficile* Toxins. Toxins (Basel) 2010;2(7):1848–1880.

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.

Sydenham TV, Sóki J, Hasman H, Wang M, Justesen US: Identification of antimicrobial resistance genes in multidrug-resistant clinical *Bacteroides fragilis* isolates by whole genome shotgun sequencing. Anaerobe 2015;31:59-64.

Székely E, Eitel Z, Molnár S, Szász IÉ, Bilca D, Sóki J: Analysis of Romanian *Bacteroides* isolates for antibiotic resistance levels and the corresponding antibiotic resistance genes. Anaerobe 2015;31:11-14.

Szőke I, Dósa E, Nagy E: Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Hungary. Anaerobe 1997;3:87-89.

Takesue Y, Kusachi S, Mikamo H, Sato J, Watanabe A, Kiyota H. *et al.*: Antimicrobial susceptibility of pathogens isolated from surgical site infections in Japan: Comparison of data from nationwide surveillance studies conducted in 2010 and 2014-2015. J Infect Chemother 2017;23(6):339-348.

Tedesco FJ, Barton RW, Alpers DH: Clindamycin-associated colitis: a prospective study. Ann Intern Med 1974;81:429-433.

Thornton RF, Kagawa TF, O'Toole PW, Cooney JC: The dissemination of C10 cysteine protease genes in *Bacteroides fragilis* by mobile genetic elements. BMC Microbiol 2010;10:122-137.

Tickler IA, Obradovich AE, Goering RV, Fang FC, Tenover FC: Changes in molecular epidemiology and antimicrobial resistance profiles of *Clostridioides (Clostridium) difficile* strains in the United States between 2011 and 2017. Anaerobe *In Press* Available online 4 June 2019.

Toprak NU, Rajdendarm D, Yagci A, Gharbia S, Shah HN, Gulluoglu BM. *et al.*: The distribution of the *bft* alleles among enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from stool specimens and extraintestinal sites. Anaerobe 2006/b;12:71-74.

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/a;12:782-786.

Tran CM, Tanaka K, Watanabe K: PCR-based detection of resistance genes in anaerobic bacteria isolated from intra-abdominal infections. J Infect Chemother 2013;19:279-290.

Valiente E, Dawson LF, Cairns MD, Stabler RA, Wren BW: Emergence of new PCR ribotypes from the hypervirulent *Clostridium difficile* 027 lineage. J Med Microbiol 2012;61:49-56.

van den Berg RJ, Vaessen N, Endtz HP, Schülin T, van den Vorm ER, Kuijper EJ: Evaluation of real-time PCR and conventional diagnostic methods for the detection of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea in a prospective multicentre study. J Med Microbiol 2007;56:36-42.

van den Berg RJ, van Coppenraet LSB, Gerritsen HJ, Endtz HP, van der Vorm ER, Kuijper EJ: Prospective multicenter evaluation of a new immunoassay and real-time PCR for rapid diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in hospitalized patients. J Clin Microbiol 2005;43:5338-5340.

Veloo ACM, Erhard M, Welker M, Welling GW, Degener JE: Identification of Gram-positive anaerobic cocci by MALDI-TOF mass spectrometry. Syst Appl Microbiol 2011;34(1):58-62.

Veloo ACM, Jean-Pierre H, Justesen US, Morris T, Urbán E, Wybo I, Kostrzewa M. *et al.*: Validation of MALDI-TOF MS Biotyper database optimized for anaerobic bacteria: The ENRIA project. Anaerobe 2018;54:224-230.

Veloo ACM, Baas WH, Haan FJ, Coco J, Rossen JW: Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Bacteroides* spp. and *Prevotella* spp. Dutch clinical isolates. Clin Microbiol Infect 2019;25(9):1156.e9-1156.e13.

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.

Wang FD, Liao CH, Lin YT, Sheng WH, Hsueh PR: Trends in the susceptibility of commonly encountered clinically significant anaerobes and susceptibilities of blood isolates of anaerobes to 16 antimicrobial agents, including fidaxomicin and rifaximin, 2008-2012, northern Taiwan. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014 Nov;33(11):2041-52.

Wareham DW, Wilks M, Ahmed D, Brazier JS, Millar M: Anaerobic sepsis due to multidrug-resistant *Bacteroides fragilis*: microbiological cure and clinical response with linezolid therapy. Clin Infect Dis 2005;40(7):67-68.

Warny M, Pepin J, Fang A, Killgore G, Thompson A, Brazier J. *et al.*: Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet 2005;366:1079-1084.

Wattal C, Oberoi JK, Goel N, Raveendran R, Khanna S: Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2017;36(5):807-812.

Wexler AG, Goodman AL: An insider's perspective: *Bacteroides* as a window into the microbiome. Nat Microbiol 2017;2:17026.

Wexler HM: *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. Clin Microbiol Rev 2007; 20(4):593-621.

Wieser A, Schneider L, Jung J, Schubert S: MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). Appl Microbiol Biotechnol 2012;93:965-974.

Wu S, Lim KC, Huang J, Saidi RF, Sears CL: *Bacteroides fragilis* enterotoxin cleaves the zonula adherens protein, E-cadherin. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:14979-14984.

Wu S, Shin J, Zhang G, Cohen M, Franco A, Sears CL: The *Bacteroides fragilis* toxin binds to a specific intestinal epithelial cell receptor. Infect Immun 2006;74:5382-5390.

Wybo I, De Bel A, Soetens O, Echahidi F, Vandoorslaer K, Van Cauwenbergh M. *et al.*: Differentiation of *cfiA*-negative and *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol 2011;49:1961-1964.

Wybo I, Piérard D, Verschraegen I, Reynders M, Vandoorslaer K, Claeys G. *et al.*: Third Belgian multi-centre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. J Antimicrob Chemother 2007;59:132-139.

Wybo I, Soetens O, De Bel A, Echahidi F, Vancutsem E, Vandoorslaer K. *et al.*: Species identification of clinical *Prevotella* isolates by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2012;50:1415-1418.

Wybo I, Van den Bossche D, Soetens O, Vekens E, Vandoorslaer K, Claeys G, *et al.*: Fourth Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. J Antimicrob Chemother 2014;69(1):155-161.

Xu J, Gordon JI: Honor thy symbionts. Proc Natl Acad Sci 2003;100(18):10452-10459.

Yamazoe K, Kato N, Kato H, Tanaka K, Katagir Y, Watanabe K: Distribution of the *cfiA* gene among *Bacteroides fragilis* strains in Japan and relatedness of *cfiA* to imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother 1999;43(11):2808-2810.

Zhou Y, Mao L, Yu J, Lin Q, Luo Y, Zhu X. *et al.*: Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in hospitalized adults and the first isolation of *C. difficile* PCR ribotype 027 in central China. BMC Infect Dis. 2019;19(1):232.

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 *cfi*A 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 területen. 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, Hunyadkürti 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, Miszti 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, Miszti 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 *cfi*A-*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 *cfi*A 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. 2009b;15:885-886. IF: 4,014

Terhes G, **Urbán E**, Nagy E: *Clostridium difficile* törzsek isolálása, 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 2009a;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, Nacsa 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, Benczik 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 Az értekezés témaköreiben megjelent absztraktok, előadáskivonatok

Ádám A, Kajári Sz, Vályi P, **Urbán E:** Role of MALDI-TOF method to identify bacterial species from inflamed periodontal pockets. Acta Microbiol Immunol Hung 2015; 62:Suppl1:128.

Ágó K, Sóki J, Terhes G, **Urbán E,** Nagy E: Detection of *bft* and *cfi*A genes in *Bacteroides fragilis* isolates of different origin by PCR methods. Acta Microbiol Immunol Hung 2004;51:168-169.

Barbut F, Mastrantonio P, Delmée M, Ackermann G, Bouza E, Balmelli C, Drudy D, Kuijper E, Ladas H, Nagy E, Pituch H, Somolinos M, **Urbán E**, Wullt M, Yücesoy M, Rupnik M, Poxton I: European prospective study of *Clostridioides difficile* strains: phenotypic and genotypic characterization of the isolates from different clinical status: interim results for the European Study Group on *Clostridioides difficile* (ESGCD). In. 16th ECCMID, Nice, France, 2-4 April 2006.

Bartha NA, Ábrók M, **Urbán E,** Nagy E: Anaerob baktériumok identifikálása MALDI-TOF MS módszerrel. *In:* [Magyar, Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság] (szerk.) A Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 41. Kongresszusa Budapest, Magyarország 2013;33.

Eitel Z, Sóki J, Nagy E, Terhes G, **Urbán E:** Investigation of MICs of fidaxomycin against Hungarian *Clostridium difficile* clinical isolates *In:* The 12th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas 2014;PIII-27.

Eitel Zs, Sóki J, Nagy E, Terhes G, **Urbán E:** Investigation of the MICs of fidaxomicin against Hungarian *C. difficile* strains. Acta Microbiol Immunol Hung 2013;60S2:132-133.

Eitel Zs, Székely E, Molnár Sz, **Urbán E,** Lőrinczi L, Nagy E, Sóki J: Genetic analysis of *Bacteroides* strains isolated as Targu-Mures in 2010-2013. Acta Microbiol Immunol Hung 2013;60S2:133.

Eitel Zs, **Urbán E,** Justesen U, Nagy E: Evaluation of the EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group isolates *In:* 24th, European Congress of Clinical Microbiology - 24th ECCMID 2014;143. Paper: P028.

Feltóti Zs, Horváth B, **Urbán E,** McDowell A; Nagy I: High-throughput sequencing provides insights into genome variation, evolution and pathogenicity of *Propionibacterium acnes*. Acta Microbiol Immunol Hung 2009;56:148-149.

Hunyadkürti J, Vörös A, Horváth B, McDowell A, **Urbán E,** Nagy I: High-throughput sequencing provides insights into genomic plasticity and pathogenicity of *Propionibacterium acnes*. Acta Microbiol Immunol Hung 2011;58:159.

Nagy E, Backer S, Kostrzewa M, **Urbán E:** The value of MALDI-TOF MS in the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. Clin Microbiol Infect 2012;18S3:690-691.

Nagy E, Edwards R, **Urbán E**, Szőke I, Sóki J, Fodor E: Antibiotic resistance of human pathogenic anaerobic bacteria worldwide and among the Hungarian isolates. Acta Microbiol Immunol Hung 2003;50:197-198.

Nagy E, Friedrich A, Justesen U, Kostrzewa M, **Urbán E,** Veloo ACM, Wybo I: European experience with MALDI-TOF MS in the field of Anaerobes. *In:* ASA 2014 Anaerobe 2014;p:37.

Nagy E, Kostrzewa M, Maier T; **Urbán E,** Terhes G: Species determination of strains belonging to genus *Bacteroides* (senso stricto) by conventional and protein-based molecular techniques: changing taxonomy. Acta Microbiol Immunol Hung 2009;53:73-74.

Nagy E, Sóki J, Fodor E, **Urbán E,** Szőke I: Antimicrobial resistance in anaerobic bacteria. Acta Microbiol Immunol Hung 2000;47:391-392.

Nagy E, Sóki J, **Urbán E**, Edwards R, Fodor E, Ho P, Bolstrom A: Investigation carbapenem and metronidazole resistance in *Bacteroides* originating from different geographic era. Int J Antimicrob Agents 2001;17S1:164.

Nagy E, **Urbán E:** Antibiotic susceptibility of *Bacteroides* clinical isolates in Europe, 2007-2008. Clin Microbiol Infect 2009;15S4:150.

Redetzky A, **Urbán E:** *Bacteroides fragilis* csoportba tartozó törzsek antibiotikum érzékenységének vizsgálata. Klinikai Kísérl Laboratóriumi Medicina 2009;33S1:35-36.

Sárvári KP, Nagy E, Miszti C, Sóki J, **Urbán E:** Epidemiology of antibiotic resistance of clinically relevant *Bacteroides fragilis* group isolates in Hungary. *In:* Anaerobe Society of the Americas (szerk.) The 13th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas: Program & Abstract Book Nashville (TN), Amerikai Egyesült Államok: Anaerobe Society of the Americas 2016;256.

Sárvári KP, Sóki J, Kristóf K, Iván M, Miszti C, Latkóczy K, Melegh Sz, **Urbán E**: Molecular characterization of multidrug resistant *Bacteroides fragilis* group isolates from human clinical samples in Hungary. Acta Microbiol Immunol Hung 2017;64S1:164-165.

Sárvári KP, Sóki J, Kristóf K, Juhász E, Iván M, Miszti C, Latkóczy K, Melegh Sz, **Urbán E**: Distribution of *bft* gene and its subtypes among *Bacteroides fragilis* isolates from Hungarian clinical samples. Acta Microbiol Immunol Hung 2017;64:S1:78.

Sárvári KP, Sóki J, Miszti C, Iván M, Melegh Sz, Latkóczy K, **Urbán E**: Klinikai *Bacteroides* izolátumok magyarországi antibiotikum érzékenységi vizsgálata. *In:* Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 45. Kongresszusa 2017;58.

Sárvári KP, Sóki J, Miszti C, Iván M, Melegh Sz, Latkóczy K, **Urbán E**: Distribution of *bft* gene and its subtypes among *Bacteroides fragilis* isolates from Hungarian clinical samples *In*: ECCMID 2017: 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2017;128.

Sárvári KP, Sóki J, Miszti C, Latkóczy K, **Urbán E:** Investigation of antibiotic susceptibility data of Hungarian clinically relevant *Bacteroides isolates*. Clin Chem Lab Med 2016;54:10. eA177-eA178. Paper: SE9.2.

Sóki J, Eitel Zs, Székely E, **Urbán E**, Nagy E: Marosvásárhelyi klinikai *Bacteroides* izolátumok antibiotikum rezisztencia gén tartalma. Bulletin of Medical Sciences/ Orvostudományi Értesítő 2013;86:51.

Sóki J, Eitel Zs, Terhes G, **Urbán E,** Nagy E: Analysis of metallo-beta-lactamase and enterotoxin producing *Bacteroides* strains. Acta Microbiol Immunol Hung 2009;56:242.

Sóki J, Eitel Zs, **Urbán E,** Terhes G, Nagy E: Investigation of the prevalence of major antibiotic resistance and enterotoxin genes among clinical *Bacteroides* strains from a European antibiotic susceptibility survey. Clin Microbiol Infect 2009;16S2:106.

Sóki J, Gal V, Brazier JS, Rotimi VO, **Urbán E,** Nagy E, Duerden BI: Investigation of *nim* gene carrying genetic elements of metronidazole-resistant *Bacteroides* spp. isolated in the UK, Kuwait and Hungary. Anaerobe 2003;9:268.

Sóki J, Göcző I, **Urbán E,** Nagy E: Examination of the expression and copy of the *cfx*A cefoxitinase gene as determinants for cefoxitin resistance of *Bacteroides.* Acta Microbiol Immunol Hung 2013;60S2:232.

Sóki J, Hedberg M, Nagy E, **Urbán E:** Molecular characterization of an international clone of multi-resistant *Bacteroides fragilis* isolates *In:* Drancourt M, Didier R. (szerk.) 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2014; P1796.

Sóki J, Hedberg M, Patrick S, Nagy I, Hecht DW, Nagy E, **Urbán E:** Molecular analysis of members of an international clone of multi-resistant *Bacteroides fragilis* isolates. Acta Microbiol Immunol Hung 2015;(62):Suppl1:100.

Sóki J, Hedberg M, Patrick S, Nagy I, Hecht DW, Nagy E, **Urbán E:** Emergence and evolution an international clone of multiresistant *Bacteroides fragilis* isolates *In*: The 12th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas 2014;SXI-3.

Sóki J, Hedberg M, **Urbán E,** Terhes G, Nagy E: Investigation of the carbapenem and cefoxitin resistance mechanism of *Bacteroides:* detection and analysis of heteroresistant strains an antibiotic susceptibility survey. Acta Microbiol Immunol Hung 2009;56:89-90.

Sóki J, Jeverica S, Thierney D, Hajdú E, Perry J, Nagy E, **Urbán E:** An analysis of the antibiotic resistance gene content of intestinal *Bacteroides* isolated using a novel chromogenic agar. In: ESCMID (szerk.) ECCMID 2016: 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2016;P0686.

Sóki J, Jeverica S, Tierney D, Perry J, Nagy E, **Urbán E**: Investigation of the antibiotic resistance gene content of intestinal normal flora *Bacteroides* using a novel chromogenic agar for the isolation. *In:* Anaerobe Society of the Americas (szerk.) The 13th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas: Program & Abstract Book

Sóki J, Nagy E, Fodor E, Edwards R, **Urbán E,** Boltrsröm A: Examination of *nim* gene carrying genetic elements of metronidazole resistant *Bacteroides* spp. isolated in the UK, Kuwait and Hungary. Acta Microbiol Immunol Hung 2003;50:202.

Sóki J, Nagy E, **Urbán E:** Detection and preliminary characterization of a novel mobilizable transposon, MTnBf8, haboring a chromosomal *nim*B gene. *In*: Anaerobe Society of the Americas (szerk.) The 13th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas: Program & Abstract Book Nashville (TN), Amerikai Egyesült Államok: Anaerobe Society of the Americas, 2016;98: PI-10.

Sóki J, Nagy E, **Urbán E**: Investigation on the *cep*A-mediated beta-lactam resistance mechanism of *Bacteroides*. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, 2015. 09. 17-21., Megjelenés: Amerikai Egyesült Államok

Sóki J, Nagy E, **Urbán E:** Molecular detection and analysis of a chromosomal element of the nimB metronidazole resistance gene of *Bacteroides* spp. Acta Microbiol Immunol Hung 2017;S1:78-79.

Sóki J, Ördög K, Wybo I, Tierney D, Jerevica S, Ulger N, Stingu CS, Hajdú E, Perry J, **Urbán E**: Assessing the antibiotic resistance levels of human intestinal *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains isolated in european countries. Acta Microbiol Immunol Hung 2017;64:166-167.

Sóki J, Terhes G, Rotimi VO, **Urbán E,** Nagy E: Estimation of potential risk of emerging carbapenem and metronidazole resistant *Bacteroides*. Anaerobe 2005;11:52.

Sóki J, **Urbán E**, Nagy E: Examination of the content of main antibiotic resistance genes of intestinal *Bacteroides* strains isolated in Hungary In: 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (28th ECCMID) 2018;P0345.

Sóki J, **Urbán E,** Terhes G, Nagy E: Molecular analysis of recent cephamycin and carbapenem resistant *Bacteroides* isolates. Clin Microbiol Infect 2009;15S4:150.

Terhes G, Maruyama A, Latkóczy K, Szikra L, Konkoly-Thege M, Princz Gy, Nagy E, **Urbán E:** Magyarországi *Clostridium difficile* törzsek antibiotikum érzékenységének változása. Bulletin Of Medical Sciences/Orvostudományi Értesítő 2013;86:58.

Terhes G, Sóki J, Ágó K, **Urbán E,** Nagy E: Detection of *bft* and *cfi*A genes in *Bacteroides fragilis* isolates of different origin by PCR methods. 3rd. World Congress on Anaerobic Bacteria and Infections. 2003. 7-9. May Glasgow, Scotland, UK

Terhes G, Sóki J, Ágó K, **Urbán E**, Nagy E: Detection of *bft* and *cfi*A genes in *Bacteroides fragilis* isolates of different origin by PCR methods. Anaerobe 2003;9:269.

Terhes G, Sóki J, Ágó K, **Urbán E,** Nagy E: Detection of *bft*, the isoforms of the enterotoxin gene and *cfi*A gene in *Bacteroides fragilis* isolates of different origins. Clin Microbiol Infect 2004;10S3:253.

Terhes G, Sóki J, Latkóczi K, Szikra L, Konkoly-Thege M, Princz Gy, Nagy T, Osztie H, **Urbán E:** Antibiotic susceptibility pattern of nosocomial and community-acquired *Clostridium difficile* in Hungary. Clin Microbiol Infect 2011;17S4:291.

Terhes G, Sóki J, Latkóczi K, Szikra L, Konkoly-Thege M, Princz Gy, Nagy T, Osztie H, **Urbán E:** Emergence and distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Hungarian hospitals. Clin Microbiol Infect 2011;17S4:228-229.

Terhes G, Sóki J, Latkóczy K, Szikra L, Konkoly-Thege M, Princz Gy, Nagy T, Osztie H, Nagy E, **Urbán E**: Changes in the epidemiology and antibiotic susceptibility pattern of nosocomial and community- acquired *Clostrium difficile* in Hungary. In: 4th *International Clostridium difficile* Symposium, Abstract book: ISBN 978-961-90895-6-9 pp. 166. 20-22. September 2012. Bled, Slovenia.

Terhes G, Sóki J, **Urbán E,** Nagy E: Prevalence of *bft* isoforms in *Bacteroides fragilis* strains of different origins in Hungary. Anaerobe 2005;(11):14.

Terhes G, **Urbán E,** Brazier JS, Sóki J, Nagy E: Epidemiological examination of *Clostridium difficile* isolates from different parts of Hungary. Clin Microbiol Infect 2005;11:487.

Terhes G, **Urbán E**, Nagy E: Prevalence of gastrointestinal disease and clinical features of *Clostrium difficile*-associated infections: results of a retrospective study, 2000- 2001 in a university hospital in Hungary. In: 4th International *Clostridium difficile* Symposium, Abstract book: ISBN 978-961-90895-6-9 pp. 165. 20-22. September 2012. Bled, Slovenia.

Terhes G, **Urbán E**, Sóki J, Nagy E: Detection of binary toxin genes (*cdt*A, *cdt*B) of *Clostridium difficile* isolates from different parts of Hungary by PCR methods. May 5-7. 2004. Kranjska Gora, Slovenia Abstract book P.13. pp. 55.

Terhes G, **Urbán E,** Sóki J, Szikra L, Konkoly-Thege M, Vollain M, Barna Zs, Nagy E: Molecular epidemiology of community-acquired and nosocomial *Clostridium difficile* infections in Hungary. Acta Microbiol Immunol Hung 2009;56:101-102.

Tóth J, Fekete E, Terhes G, Indra A, Pecavar V, **Urbán E**, Osztie H, Nagy E: Capillary gel electrophoresis-based PCR-ribotyping of *Clostridium difficile* strains collected at two sites of Hungary in 2014. Acta Microbiol Immunol Hung 2015;62S1:233-234.

Tusnádi A, **Urbán E,** Bakró I, Nagy E: *Clostridium difficile*, mint az infektív eredetű nosocomiális hasmenések leggyakoribb oka. Infekt Klin Mikrobiol 2000;7:9.

Urbán E, Brazier JS, Sóki J, Nagy E, Duerden BI: PCR ribotyping of clinically important *Clostridium difficile* strains from Hungary. Acta Microbiol Immunol Hung 2003;50:202.

Urbán E, Brazier JS, Sóki J, Nagy E, Duerden BI: PCR-ribotyping of clinically important *Clostridum difficile* strains from Hungary. Clin Microbiol Infect 2002;8S1:363.

Urbán E, Hunyadkürti J, Barzó P, Nagy I: The role of MALDI-TOF to discover "new" pathogens: *Propionibacterium kocii*, a human pathogen anaerobic bacterium. *In:* 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2015;EV0828.

Urbán E, Hunyadkürti J, Nagy I: *Propionibacterium kocii* a new human pathogen anaerobic bacteria. *In:* Anaerobe, Society of the Americas (szerk.) Anaerobe 2014: The 12th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas, The 37th Congress of the Society for Microbial Ecology and Disease 2014;151.

Urbán E, Kostrzewa M, Maier T, Terhes G, Nagy E: Identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. Clin Microbiol Infect 2009;15S4:225-226.

Urbán E, Kostrzewa M, Nagy I, Nagy E: Typing of *Propionibacterium acnes* by MALDI-TOF MS. Clin Microbiol Infect 2012;8S3:790.

Urbán E, Nagy E, Hortobágyi A, Szentpáli K: The first Hungarian *Bilophila wadsworthia* isolates (case reports). Anaerobe 2003;9:269.

Urbán E, Nagy E, Sóki J, Kristóf K, Juhász E, Miszti C, Latkóczy K, Melegh Sz, Sárvári KP: Epidemiology of moxifloxacin susceptibilities and the carriage of multidrug efflux pump gene of Hungarian *Bacteroides* isolates. *In:* The 14th Biennial Congress of the Anaerobe Society of the Americas: Anaerobe Society of the Americas (szerk.): Program & Abstract Book. 2018; p126.

Urbán E, Sóki J, Kristóf K, Miszti C, Latkóczy K, Melegh Sz, Sárvári KP: Investigation of moxifloxacin susceptibilities and the carriage of the MATE multidrug efflux pump gene, *bex*A, of clinical *Bacteroides fragilis* group isolates In: 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (28th ECCMID) 2018; Paper: P0344.

Urbán E, Terhes G, Markotics A, Nagy E: Toxintermelő *C. diffcile* okozta extraintestinális infekció ritka esete. Infekt Klin Mikrobiol 2008;15S1:18.

Urbán E, Terhes G, Nagy E, Brazier JS, Duerden BI: Epidemiology and molecular characterization of *Clostridium difficile* strains from inpatients with diarrhoea. First International Clostridium difficile Symposium. May 5-7. 2004. Kranjska Gora, Slovenia Abstract book P.3. pp. 45.

Urbán E, Terhes G, Nagy E: Felkészültek-e a hazai mikrobiológiai laboratóriumok a *C. difficile* okozta infekciók diagnosztizálására? Infekt Klin Mikrobiol 2008;15S1:13.

Urbán E, Terhes G, Sóki J, Nagy E: Preliminary results of the third study on the antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group strains in Europe. Acta Microbiol Immunol Hung 2009;56:104-105.

Urbán E, Terhes G: Prevalence of gastrointestinal disease and clinical features of *Clostridium difficile*-associated infections. Clin Chem Lab Med 2016;(54):eA177-eA177. Paper:SE9.1.

Urbán E: A toxintermelő *C. difficile* törzsek epidemiológiája a SZTE ÁOK 10 éves klinikai beteganyagában. Bulletin Of Medical Sciences/Orvostudományi Értesítő 2013;86:60-61.

Urbán E: Anaerob baktériumok kimutatása, identifikálása, tipizálása molekuláris módszerekkel. *In:* Deák, Judit (szerk.) II. Molekuláris genetikai tanfolyam Szeged, Magyarország: Szegedi Orvostudományi Egyetem 2010;1-30.

Urbán E: Antibiotikum rezisztencia alakulása az anaerob baktériumok között itthon és a nagyvilágban. Infekt Klin Mikrobiol 2004;31:4.

Urbán E: *C. difficile* infections: epidemiology, diagnostics and therapy. Anaerobic Bacteria: Next Generation Technology Meets Anaerobic Diagnostics, Groeningen, 2014. szeptember 26-30. Megjelenés: Hollandia

Urbán E: MALDI-TOF alkalmazása a klinikai mikrobiológiai diagnosztikában - irodalom és saját tapasztalatok. OMICS Napok 2.0, Budapest, 2014. április 25-26., Megjelenés: Magyarország

9.3. Az értekezés témakörében megjelent "*in extenso*" közlemények

Ábrók M, Arcson Á, Lázár A, **Urbán E**, Deák J: Combination of selective enrichment and MALDI-TOF MS for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* colonisation of pregnant women. J Microbiol Methods 2015;114:23-25.

Bálint A, Molnár T, Szűcs M, Farkas K, **Urbán E**, Nagy F, Szepes Z, Wittmann T: *Clostridium difficile*-infekció előfordulási gyakorisága a gyulladásos bélbetegségek relapszusa során - előzetes tanulmány. Magy Belorv Arch 2013;6:80-86.

Bartha NA, Sóki J, **Urbán E**, Nagy E: Investigation of the prevalence of *tet*Q, *tet*X and *tet*X1 genes in *Bacteroides* strains with elevated tigecycline minimum inhibitory concentrations. Int J Antimicrob Agents 2011;38:522-525.

Bogdan M, Peric L, Ördög K, Vukovic D, **Urbán E,** Sóki J: The first characterized carbapenem-resistant *Bacteroides fragilis* strain from Croatia and the case study for it. Acta Microbiol Immunol Hung 2018;65:317-323.

Brodszky V, Gulácsi L, Ludwig E, Prinz G, Banai J, Reményi P, Strbak B, Kertész A, Kopcsóné Németh I, Zsoldiné **Urbán E**, *et al.*: A *Clostridium difficile*-fertőzések antibiotikum-terápiája: A tudományos bizonyítékok szisztematikus áttekintése és metaanalízise. Orv Hetil 2013;154:23:890-899.

Eitel Z, Sóki J, **Urbán E**, Nagy E: The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. Anaerobe 2013;21:43-49.

Fodor D, Ume KL, Matkó M, Nacsa E, **Urbán E**, Hajdú E: *Clostridium difficile* okozta akut gastroenteritis fertőzőosztályon. Orv Hetil 2012;153:1992-1997.

Gajdács M, **Urbán E**: Epidemiology and species distribution of anaerobic Gram-negative cocci: a 10-year retrospective survey (2008-2017). Acta Pharm Hung 2019;89:84-87.

Gajdács M, **Urbán E**: The relevance of anaerobic bacteria in brain abscesses: a ten-year retrospective analysis (2008-2017). Infect Dis 2019;10:779-781.

Gulácsi L, Kertész A; Kopcsóné Németh I, Banai J, Ludwig E, Prinz G, Reményi P, Strbák B, Zsoldiné **Urbán E**, Baji P. *et al.*: A *Clostridium difficile*-fertőzések epidemiológiája, betegségterhe és terápiája. Orv Hetil 2013;541188-1193.

Horváth B, Hunyadkürti J, Vörös A, Fekete Cs, **Urbán E**, Kemény L, Nagy I: Genome sequence of *Propionibacterium acnes* Type II Strain ATCC 11828. J Bacteriol 2012;194:202-203.

Hunyadkürti J, Feltóti Zs, Horváth B, Nagymihály M, Vörös A, McDowell A, Patrick S, **Urbán E**, Nagy I: Complete genome sequence of *Propionibacterium acnes* Type IB strain 6609. J Bacteriol 2011;193:4561-4562.

Leitsch D, Sóki J, Kolarich D, **Urbán E**, Nagy E: A study on nim expression in *Bacteroides fragilis*. Microbiology-SGM 2014;160:616-622.

Nagy E, Becker S, Sóki J, **Urbán E**, Kostrzewa M: Differentiation of division I (*cfi*A-negative) and division II (*cfi*A-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time of-flight mass spectrometry. J Med Microbiol 2011;60:1584-1590.

Nagy E, Justesen US, Eitel Zs, **Urbán E:** Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group isolates. Anaerobe 2015;31:65-71.

Nagy E, Sóki J, Edwards R, **Urbán E,** Lajos Z, Szabó B: Az első hazai carbapenemase termelésen alapuló imipenem rezisztens *Bacteroides fragilis* törzsek genetikai vizsgálata. Infektológia És Klinikai Mikrobiológia 2000;7:65-66.

Nagy E, Sóki J, **Urbán E**, Szőke I, Fodor E, Edwards R: Occurrence of metronidazole and imipenem resistance among *Bacteroides fragilis* group clinical isolates in Hungary. Acta Biol Hung 2001;52:271-280.

Nagy E, **Urbán E,** Jakab G, Szikra L, Miszti C, Szabó J: Humán patogén anaerob baktériumok in vitro érzékenysége tigecyclinre és a komparátor antibiotikumokra Magyarországon. Lege Artis Med 2009;19:593-601.

Nagy E, **Urbán E**, Sóki J, Terhes G, Nagy K: The place of molecular genetic methods in the diagnostics of human pathogenic anaerobic bacteria. Acta Microbiol Immunol Hung 2006;53:183-194.

Nagy E, **Urbán E**, Terhes G: *Clostridium difficile* által okozott hasmenés klinikai jelentősége, diagnosztikája, terápiája és megelőzése. Infekt Klin Mikrobiol 2007;14:7-12.

Nagy I, Pivarcsi A, Koreck A, Széll M, **Urbán E**, Kemény L: Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induces selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through Toll-like receptors. J Invest Dermatol 2005;124:931-938.

Ördögh L, Hunyadkürti J, Vörös A, Horváth B, Szűcs A, **Urbán E**, Kereszt A, Kondorosi É, Nagy I: Complete genome sequence of *Propionibacterium avidum* strain 44067, isolated from a human skin abscess. Genome Announc 2013;1(3):e00337-13.

Sóki J, Eitel Z, **Urbán E**, Nagy E: Molecular analysis of the carbapenem and metronidazole resistance mechanisms of *Bacteroides* strains reported in a Europe-wide antibiotic resistance survey. Int J Antimicrob Agents 2013;41:122-125.

Sóki J, Gonzalez SM, **Urbán E**, Nagy E, Ayala JA: Molecular analysis of the effector mechanisms of cefoxitin resistance among *Bacteroides* strains. J Antimicrob Chemother 2011;66:2492-2500.

Sóki J, Hedberg M, Patrick S, Bálint B, Herczeg R, Nagy I, Hecht DW, Nagy E, **Urbán E:** Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates J Antimicrob Chemother 2016;71:2441-2448.

Sóki J, Wareham DW, Rátkai Cs, Aduse-Opoku J, **Urbán E**, Nagy E: Prevalence, nucleotide sequence and expression studies of two proteins of a 5.6kb, Class III, *Bacteroides* plasmid frequently found in clinical isolates from European countries. Plasmid 2010;63:86-97.

Sóki J, Edwards R, **Urbán E**, Fodor E, Beer Z, Nagy E: Screening of isolates from faeces for carbapenem-resistant *Bacteroides* strains; existence of strains with novel types of resistance mechanisms. Int J Antimicrob Agents 2004;24:450-454.

Sóki J, Edwards R, Lajos Z, Vrabely T, Fodor E, **Urbán E**, Nagy E: Isolation and characterization of an imipenem-resistant *Bacteroides fragilis* strain from a prostate abscess in a dog. Vet Microbiol 2002;84:187-190.

Sóki J, Edwards R, **Urbán E**, Fodor E, Nagy E: A clinical isolate of *Bacteroides fragilis* from Hungary with high-level resistance to imipenem. J Med Microbiol 2001;(50):107.

Sóki J, Eitel Zs, **Urbán E,** Nagy E: Molecular analysis of the carbapenem and metronidazole resistance mechanisms of *Bacteroides* strains reported in a Europe-wide antibiotic resistance survey. Int J Antimicrob Agents 2013;41:122-125.

Sóki J, Fodor E, Hecht DW, Edwards R, Rotimi VO, Kerekes I, **Urbán E**, Nagy E: Molecular characterization of imipenem-resistant, *cfi*A-positive *Bacteroides fragilis* isolates from the USA, Hungary and Kuwait. J Med Microbiol 2004;53:413-419.

Sóki J, Gal M, Brazier JS, Rotimi VO, **Urbán E**, Nagy E, Duerden BI: Molecular investigation of genetic elements contributing to metronidazole resistance in *Bacteroides* strains. J Antimicrob Chemother 2006;57:212-220.

Sóki J, **Urbán E**, Szőke I, Fodor E, Nagy E: Prevalence of the carbapenemase gene (*cfi*A) among clinical and normal flora isolates of *Bacteroides* species in Hungary. J Med Microbiol 2000;49:427-430.

Toprak NU, Alida CMV, **Urbán E**, Wybo I, Justesen US, Jean-Pierre H, Morris T, Akgul O, Kulekci G, Soyletir G, Nagy E: Performance of mass spectrometric identification of clinical *Prevotella* species using the VITEK MS system: A prospective multi-center study. Anaerobe 2018;54:205-209.

Toprak NU, Veloo ACM, **Urbán E**, Wybo I, Justesen US, Jean-Pierre H, Morris T, Akgul O, Kulekci G, Soyletir G. *et al.:* A multicenter survey of antimicrobial susceptibility of *Prevotella* species as determined by Etest methodology. Anaerobe 2018;52:9-15.

Toprak NU, Veloo ACM, **Urbán E**, Wybo I, Jean-Pierre H, Morris T, Justesen US, Tripkovic V, Jeverica S, Soyletir G, Nagy E; ESCMID Study Group for Anaerobic Infections (ESGAI): Comparing identification of clinically relevant *Prevotella* species by VITEK MS and MALDI biotyper. Acta Microbiol Immunol Hung. 2019 Dec 9:1-8. doi: 10.1556/030.66.2019.022. [Epub ahead of print]

Urbán E, Nagy E, Pál T, Sonnevend Á, Conlon JM: Activities of four frog skin-derived antimicrobial peptides (temporin-1DRa, temporin-1Va and the melittin-related peptides AR-23 and RV-23) against anaerobic bacteria. Int J Antimicrob Agents 2007;29:317-321.

Urbán E: Five-year retrospective epidemiological survey of anaerobic bacteraemia in a university hospital and rewiew of the literature. Eur J Microbiol Immunol 2012;2:140-147.

Veloo ACM, Jean-Pierre H, Justesen US, Morris T, **Urbán E**, Wybo I, Kostrzewa M, Friedrich AW: Validation of a for anaerobic bacteria optimized MALDI-TOF MS biotyper database: The ENRIA project. Anaerobe 2018;54:224-230.

Veloo ACM, Jean-Pierre H, Justesen US, Morris T, **Urbán E**, Wybo I, Kostrzewa M, Friedrich AW: An overview of the data obtained during the validation of an optimized MALDI-TOF MS Biotyper database for the identification of anaerobic bacteria. Data brief 2018;18:1484–1496.

Veloo ACM, de Vries ED, Jean-Pierre H, Justesen US, Morris T, **Urbán E**, Wybo I, van Winkelhoff AJ: The optimization and validation of the Biotyper MALDI-TOF MS database for the identification of gram positive anaerobic cocci. Clin Microbiol Infect 2016;22:793-798.

Veloo ACM, Jean-Pierre H, Justesen US, Morris T, **Urbán E**, Wybo I, Shah HN, Friedrich AW: A multi-center ring trial for the identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. Anaerobe 2017;48:94-97.

9.4. Tudománymetriai összefoglaló táblázat

Tudományos és oktatási közlemények	Száma		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 tudomáyos 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 segítsége, 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 töltöttek 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 kísértek 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……..