

# Multirezisztens Gram-negatív kórokozók vizsgálata az Arab-félsziget országában

*Dr. Sonnevend Ágnes*

*Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ  
Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet*



## 1. BEVEZETÉS

### **Az antibiotikum-, elsősorban béta-laktám rezisztencia alakulása az ezredforduló tájékán**

Az ezredfordulóra már nyilvánvalóvá vált, hogy a modern orvostudomány egyik legnagyobb kihívása az antibiotikumokkal szemben egyre rezisztensebbé váló kórokozók által okozott, sokszor járványosan jelentkező fertőzések kezelése, terjedésük kontroll alatt tartása. Nem tagadva a Gram-pozitív törzsek esetén is jelenlévő rezisztencia-problémák súlyos voltán (lásd pl. MRSA, VRE), esetükben mégis viszonylag ritkán jutunk el az alternatív kezelési lehetőségek teljes hiányához, a pánrezisztenciához (PDR). Ezzel szemben a Gram negatív kórokozók esetén az alkalmazható szerek száma nagyon könnyen drámai szintre csökkenhet, amint azt az elmúlt években legalábbis egyes fajok esetén megszorodó PDR törzsek jelzik. Az egyszerű penicillinekkal, aminopenicillinekkal szemben terjedő rezisztencia vezetett el a széles spektrumú cefalosporinok fokozott használatához, aminek logikus következménye volt a 80-as évektől az ellenük megjelenő, elsősorban széles spektrumú béta-laktamáz (ESBL) termelésen alapuló, gyakran globálisan elterjedt klónokhoz köthető rezisztencia.

Miután e törzsek már nagyon gyakran az egyéb antibiotikum osztályok tagjaival szemben is ellenállók voltak, a következő lépés a legfejlettebb béta-laktám csoport, a karbapenemek növekvő használata volt. Nem meglepő módon hamarosan, az ezredforduló utáni első évtized végére, ez el is vezetett a megfelelő rezisztencia mechanizmusokat kifejezni képes törzsek terjedéséhez. Ebben az esetben is, a leghatékonyabb mechanizmus általában dedikált kaprbapenemázok (pl. KPC, NDM, IMP, VIM, OXA) termelésén alapult. Külön problémát jelentett, hogy úgy az ESBL enzimek, mint a karbapenemázok génjei gyakran plazmidokon helyezkednek el, így lehetőség volt a gének, és így a rezisztencia, horizontális terjedésére is.

A karbapenem rezisztencia (és az egyre gyakrabban vele együtt járó aminoglikozid-, fluoroquinolon-, és egyéb szerekkel szemben mutatott rezisztencia) már oly drámaian leszűkítette a terápiás palettát, hogy toxikus, nehezen adagolható, korábban a szisztémás alkalmazásból már kivont antibiotikumokat voltunk kénytelenek újra használni, mint pl. a kolisztint. Sokáig az ez ellen kialakuló, néha valódi pánrezisztenciához (PDR) vezető rezisztencia terjedésére sem kellett várni, melyet kezdetben kromozómálisam, majd 2015 után konjugatív plazmidokon is terjedni képes mechanizmusok okoztak.

A világ egyetlen országa sem volt teljesen védett a rezisztens törzsek terjedése ellen, de az antibiotikumok ésszerű felhasználása, a modern módszerekkel végzett surveillance, és a határozott infekció kontroll egyes régiókban (pl. Skandináv

országok) figyelemre méltó eredményeket tudott felmutatni, míg más területek egészségügyi rendszerét súlyos próbának teszi ki ez a pandémia. Ilyen területet jelentenek az Arab-félsziget országai is.

### **Az Arab-félsziget országai és a regionális antibiotikum rezisztencia probléma**

Az Arab-félsziget országai, Jemen kivételével, egy politikai szövetséget, a Gulf Cooperation Council-t (GCC) alkotják. Mindegyikük monarchikus államberendezkedésű, és bár eltérő mértékben, de jelentős szénhidrogén kincssel rendelkeznek, ami a világ leggazdagabb országai közé sorolja őket. Bár egyes projektek során minden GCC országból kaptunk mintákat, vizsgálataink döntő részét az Egyesült Arab Emírátsokban (EAE) végeztük.

Az EAE hét emírátus (Abu Dhabi, Dubai, Sharjah, Umm al Quwain, Ajman, Fujairah és Ras al Khaimah) föderális szövetségéből áll, fővárosa Abu Dhabi, ami a hasonló nevű, leggazdagabb emírátsban található. Az egyes emírátsok között gazdaság és fejlettség tekintetében jelentős különbségek találhatók.

Bár a GCC országok egészségügyi rendszere sok tekintetben különböző, de köztük számos olyan hasonlóság van, mely potenciálisan jelentős hatással bír az antibiotikum rezisztencia helyi alakulására. A Félsziget közelében számos olyan, többnyire fejlődő ország található, melyek nagyon súlyos antibiotikum rezisztencia gondokkal küzdenek. Tekintve, hogy a GCC országokban rendkívül magas az ezen országokból érkezett vendégmunkások aránya (a két szélső érték: Szaúd-Arábia 32,7%, az EAE 88,5%) és a legtöbb GCC ország ráadásul igen jelentős áruforgalommal, az EAE globálisan is jelentős turista forgalommal rendelkezik, a régió a kórokozók terjedésének nagymértékben kitett.

Az egészségügyi ellátás színvonala rendkívül heterogén a világszínvonalú kórházaktól a néha a harmadik világ szintjét alig meghaladó ellátó egységekig. Ennek részben oka az orvosok és egészségügyi személyzet változatos szakmai háttere, képzettsége. Mindez jól tetten érhető a különböző intézmények között az infekció kontroll és antibiotikum stewardship tartalmában és színvonalában meglévő különbségekben. Ezt csak részben kompenzálja az egészségügyi irányítási rendszer, mely bonyolult, sok szintű, gyakran változó szervezeti viszonyokkal terhelt.

A közelmúltig a gyógyszerárakban számos antibiotikum, ha hivatalosan nem is, de gyakorlatilag szabadon hozzáférhető volt.

Az antibiotikum surveillance kiterjedtsége, módszerei, az adatok interpretálása, ahol az eredmények hozzáférhetőek, jelentősen eltérnek a GCC országok között, így adataik alig összehasonlíthatóak. Az EAE-ban az évek során kialakult egy, a kórházak által nyert rezisztencia adatokat összesítő rendszer, de ezt árnyalja, hogy az egyes intézményekben generált adatok minősége eltérhet.

Az EAE-ban, ahol vizsgálataink döntő többségét végeztük, munkánk idején tipizáláson, különösen molekuláris tipizáláson alapuló járványtani vizsgálatokat végző állami rendszer nem létezett. A 2000-es évek elején a teljes GCC régiót tekintve, az antibiotikum rezisztencia genetikai hátterének vizsgálata egy-egy helyben gyűjtött, de külföldön tanulmányozott törzs vizsgálatára korlátozódott.

A fentiek alapján nem meglepő, hogy a 2000-es évek elejére a régióban is jelentkeztek az antibiotikum rezisztencia által okozott problémák: kezdetben a széles spektrumú rezisztencia ESBL enzimek okozta terjedése, az első évtized végére a karbapenem rezisztencia terjedése, melyet a karbapenem rezisztens törzsek között egyre terjedő kolisztin rezisztencia még tovább súlyosbított. Ugyanakkor a kétezres évek elején, egy-egy kis mintaszámot feldolgozó cikktől eltekintve, az antibiotikum rezisztens törzsek genetikai hátterének feltárása, az általuk okozott járványok molekuláris tipizáláson alapuló követése, a helyi klónok nemzetközi „kapcsolatai” mind megoldandó feladatokat, megválaszolendő kérdéseket jelentettek.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk az volt, hogy jellemezzük az Egyesült Arab Emírátságokban, esetenként a teljes régióban, az *Enterobacterales* család, kisebb mértékben az *Acinetobacter* és *Stenotrophomonas* genusok antibiotikum érzékenységét, az antibiotikum rezisztencia mechanizmusokat, és annak genetikai hátterét, az izolátumok között előforduló járványtani kapcsolatokat, a klonalitás esetleges jelenlétét, és a helyi klónok kapcsolatát azok globális képviselőivel.

**SPECIFIKUS CÉLOK** (A vastag római számok a doktori mű alapját képező cikkekre utalnak - lásd 32. oldal)

- **Multirezisztens, elsősorban ESBL termelő Enterobacterales vizsgálata**
  - Célunk volt az EAE-ban izolált enteroaggregatív *E. coli* törzsek egyes izolátumaiban tapasztalt 3. generációs cefalosporin rezisztencia genetikai hátterének tisztázása (I)
  - Vizsgálni kívántuk a különböző enterális kórokozók között terjedő multirezisztencia, elsősorban az ESBL enzimek termelésének gyakoriságát (III-V)
  - Egy neonatális intenzív osztályon zajló ESBL termelő *K. pneumoniae* járvány esetén célunk volt a járványtani összefüggések tisztázása - az ország történetében először - molekuláris tipizáló módszerek alkalmazásával (VII)
  - Vizsgálni kívántuk az ST131 ESBL termelő globális, ún. „high risk” *E. coli* klón LPS mag (core) szerkezetének genetikai hátterét (VIII, XXI)
- **Kórházi fertőzéseket okozó, nem fermentáló multi-rezisztens Gram-negatív kórokozók vizsgálata**
  - Vizsgálni kívántuk egy hármast, azaz a legmagasabb ellátási szintű kórházban előforduló *S. maltophilia* törzsek járványtani kapcsolatait (II)
  - Vizsgálni kívántuk az Emírátságokban izolált *A. baumannii* törzsekben felbukkanó, szokatlan mechanizmusú ceftazidim (VI) és karbapenem rezisztencia (IX) genetikai hátterét
  - Célunk volt az Abu Dhabi kórházaiban előforduló *A. baumannii* törzsek lehetséges járványtani kapcsolatainak feltárása (XI)
  - Szaúd-Arábia egy regionális kórházában azt vizsgáltuk, hogy a karbapenem rezisztens *A. baumannii* törzsekkel szennyezett kórházi környezet szolgálhat-e humán fertőzések forrásául (XXV)

- **Karbapenem rezisztens *Enterobacterales* vizsgálata**
  - A karbapenem rezisztens *Enterobacterales* járvány kezdetekor célunk volt az országban és/vagy a régióban korábban még elő nem fordult karbapenemázok azonosítása, genetikai hátterük tisztázása (**X, XII, XIV, XVII, XXII**)
  - Különböző időpontokban vizsgáltuk a karbapenem rezisztenciáért felelős gének, és egyes esetekben a széles körű aminoglikozid rezisztenciáért felelős 16S metiláz gének előfordulásának gyakoriságát az EAE-ban, illetve a régióban (**XIII, XV, XXIII, XXVI, XXVIII, XXX**)
  - Különböző időpontokban vizsgáltuk a karbapenem rezisztens bélbaktérium (CRE) törzsek antibiotikum rezisztenciáját, illetve multirezisztens (MDR) törzsek kezelésére esetleg bevethető, még kevésbé elterjedt, vagy kísérletes szerek hatékonyságát (**XIII, XV, XXIII, XXVI, XXVIII, XXX**)
  - Célunk volt annak tisztázása, hogy melyek az EAE-ban keringő legfontosabb CRE klónok és ezek milyen jellegzetes tulajdonságokkal rendelkeznek (**XIII, XV, XXII, XXIII, XXVIII, XXX**)
  - Vizsgáltuk az EAE-ban legerjedtebb CRE klón, a *K. pneumoniae* ST14 helyi és globális heterogenitását (**XXVII**)
  - Célunk volt a gyakran különböző karbapenemáz géneket hordozó, a régióban elterjedt IncX3 típusú plazmidok helyi és globális változatosságának vizsgálata (**XXIV**)
  - Egy kuvaiti, több kórházat érintő járvány kapcsán vizsgáltuk a plazmidok és egyéb mobilis genetikai elemek átvitelének szerepét a karbapenem rezisztencia helyi és regionális terjedésében (**XX**)
- **A kolisztin rezisztencia vizsgálata**
  - Megkíséreltük felderíteni az országban először izolált pán-rezisztens (PDR) *K. pneumoniae* törzs karbapenem és kolisztin rezisztenciájának genetikai hátterét (**XIX**)
  - Megvizsgáltuk, jelen van-e a régióban izolált humán CRE törzsekben a plazmid-kódolt kolisztin rezisztencia gén (*mcr*) (**XVI, XVIII**)
  - Tisztázni kívántuk, hogy a régióban izolált karbapenem rezisztens *K. pneumoniae* törzsek között talált magas kolisztin rezisztenciának mi a genetikai háttere (**XXVII, XXVIII**)
  - Célunk volt annak feltárása, hogy a humán mintákból származó kolisztin rezisztens CRE izolátumokban megfigyelt *mcr*-kódolt kolisztin rezisztencia alacsony prevalenciája összefüggést mutat-e az emberi fogyasztásra kerülő broiler csirkékből izolált törzsek *mcr* hordozásával (**XXIX**)

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

**Baktérium törzsek.** A kizárólag a rutin klinikai vagy higiénés vizsgálatok során izolált baktérium törzseket a régió klinikai laboratóriumai bocsájtották rendelkezésünkre, vizsgálataink céljára mintavétel nem történt. Kétséges kórházi fajmeghatározás esetén azt a 16S riboszomális gén szekvenálásával tisztáztuk.

**Környezeti mintavétel.** Kórházi tárgyak felszínéről (**XXV**) fiziológiás sóoldattal nedvesített kendőkkel vettünk mintát. Brojercsirkék székletmintáit vizsgálva a madárházak padozatáról cikk-cakk mintában haladva gyűjtöttünk kompozit mintákat.

**Antibiotikum érzékenység vizsgálata.** Az antibiotikum érzékenységet *leveshígításos*, esetenként *korongdiffúziós*, illetve *gradiens diffúziós* módszerrel végeztük a Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) útmutatásai szerint. Az eredmények értékelésekor a CLSI klinikai határértékeit vettük figyelembe, míg tigecklin esetében az EUCAST útmutatásait követtük. Extrém drog rezisztensnek (XDR) tekintettünk egy törzset, ha az csak egyetlen antibiotikum család tagjaival szemben mutatott érzékenységet.

**Antibiotikum rezisztencia mechanizmusok vizsgálata.** Az ESBL termelést a klavulánsav gátlás alapján, a karbapenemáz termelést a Hodge, CIM, mCIM és CarbaNP tesztekkel vizsgáltuk.

**Külső membrán fehérjék vizsgálata.** A detergens kezelésnek ellenálló membrán frakció komponenseit SDS-PAGE módszerrel választottuk el.

**Gén detektálás.** A rezisztencia-, virulencia faktor-, és egyéb géneket *polimeráz láncreakcióval (PCR)* detektáltuk.

**Plazmidok vizsgálata.** Kimutatásukra a sejtek lúgos oldást követő agaróz gél elektroforézisét, esetenként a teljes genom *S1 nukleáz emésztését* követő pulzáló mezejű elektroforézist alkalmaztunk. A plazmidokat *konjugációval*, ennek sikertelensége esetén *transzformációval*, esetenként *elektroporációval* vittük át megfelelő recipiensbe. A plazmidok *inkompatibilitását* vagy PCR-ral, vagy teljes szekvenciájukból következtetve állapítottuk meg. A plazmidok *restrikciós fragmentum polimorfizmusát (RFLP)* különböző restrikciós enzimekkel történt emésztést követő agaróz gél elektroforézissel vizsgáltuk. A *teljes plazmid szekvencia* megállapításához a plazmidokat kooperációban (*454 Genome Sequencer FLX procedure*) vagy kereskedelmi szolgáltatásként (*Illumina MiSeq*) szekvenáltattuk. A readok contigokká történő összeállítását (amennyiben nem volt része a szolgáltatásnak), mi magunk végeztük (*CLC Genomic Workbench v20.0*). A contigok sorrendjének megállapítása *gap-closing PCR*-okkal történt.

**Klónozás.** A klónozendó fragmentum megfelelő végződését vagy restriktációs emésztéssel vagy amplifikáció révén a megfelelő „overhang” létrehozásával alakítottuk ki. Vektorként általában a pUC19, esetenként a pDG106 (*mer*) vektorokat használtuk.

**DNS-DNS hibridizáció.** Az agaróz gél elektroforézissel szétválasztott plazmidok Hybond-N+ membránra történő blotolása után azokat digoxigeninnel jelölt próbákkal hibridizáltattuk majd annak létrejöttét alkalikus foszfatázzal jelölt anti-digoxigeninnel detektáltuk.

**Hagyományos (Sanger) szekvenálás.** A PCR amplikonokat vagy közvetlenül, vagy agaróz gélből visszanyerve mindkét szálát, mindkét irányban szekvenáltuk *Big Dye Cycle Terminator V.3.1* (Applied Biosystems) kittel, a futtatást *3130X Genetic Analyzer* apparátuson végezve (Applied Biosystems). A szekvenciákat a *MEGA* program különböző verzióival, illetve a *CloneManager* programmal analizáltuk. A szekvenciák annotálása és GenBankba történő feltöltésükre a *Sequin* programot használtuk.

**Teljes genom szekvenálás (WGS) és analízis.** A általunk kivont genomiális DNS-t vagy kooperációban (*Illumina MiSeq*, 250 bp paired-end) vagy kereskedelmi szolgáltatásként (*Illumina HiSeq* 150 bp paired-end) szekvenáltattuk. A readek contigokká történő összerakását a *CLC Genomic Workbench v20.0* segítségével végeztük. A contigokat a *PathogenWatch*, *ResFinder*, *PlasmidFinder* és *Kleborate* programokkal vizsgáltuk

**A törzsek tipizálása.** A törzsek tipizálását makro-restriktációs emésztést követő pulzáló mezejű gél elektroforézissel (*PFGE*), PCR-on alapuló vagy a teljes genom szekvenciából származtatott multi-lókusz szekvencia tipizálással (*MLST*), a WGS adatokból a *SeqSphere+* programmal létrehozott core genom *MLST*-vel (*cgMLST*), *rep-PCR*-ral, illetve egyes *E. coli* törzsek esetén *PCR-alapú filogenetikai típusokba* sorolással végeztük.

**Statisztikai analízis.** Kategórikus változók két független csoport közötti arányának összehasonlítására, a csoportok mintaszámától függően a *Pearson Chi négyzet*, illetve *Fisher's exact* tesztet alkalmaztuk. Két csoport közötti folyamatos változók összehasonlítására *Student-féle kétmintás t tesztet*, nem normális eloszlás esetén a *Mann-Whitney U tesztet* használtuk. A betegek különböző paramétereinek az izolált törzsek fajával, illetve szekvencia típusával mutatott összefüggéseit egyváltozós és többváltozós logisztikai regressziós modellel analizáltuk.

**Etikai engedélyek.** A különböző projektek minden esetben a résztvevő intézmények etikai bizottságainak engedélyével, vagy az engedélykötelezettség alóli írásbeli felmentés esetén kerültek megvalósításra.



## 4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

### 4.1. MULTIREZISZTENS ÉS ESBL TERMELŐ BÉLBAKTÉRIUMOK VIZSGÁLATA

#### 4.1.1. Az ESBL termelés első részletes leírása enteroaggregatív *E. coli* törzsekben (I)

Egy, a jelen disszertációtól független, nem publikált vizsgálatunk során 2003 áprilisa és 2004 májusa között Al Ain városában 116 négy év alatti hasmenéses gyermek, továbbá 100 hasmenéses és 100 egészséges felnőtt székletét vizsgáltuk EAEC jelenlétére a virulencia plazmidjukra specifikus PCR segítségével. A 44 azonosított EAEC törzs közül 5 MDR, négy szerotípust reprezentáló, eltérő PFGE mintát mutató törzs legalább egy 3. generációs cefalosporinnal szemben rezisztens volt és E-teszttel vizsgálva mindegyikük ESBL termelőnek bizonyult. Mind az öt izolátum hordozta a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gént. Egy törzsből sikerült konjugációval egy 95 kb plazmidot recipiens törzsbe átvinni, mely a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gén mellett egy *bla*<sub>TEM</sub> gént is hordozott. Az *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gén előtt elhelyezkedő 201 bp hosszú régió azonos volt a legelső ilyen allél esetén publikálttal, azaz megtalálható volt az ISEcp1 3' vége egy jobb invertált ismétlődő szekvenciával (IRR) és egy tentatív -10 és -35 TATA box-szal. Tudomásunk szerint, ez az első, a genetikai hátteret is feltáró leírása az ESBL termelésnek az enteroaggregatív *E. coli* patotípusban, és egyben az első beszámoló a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> allél előfordulásáról az Arab- félszigeten.

#### 4.1.2. Multirezisztens és ESBL termelő *salmonella* és *shigella* törzsek vizsgálata (III – V)

Több projekt kapcsán Kuvaitban és az EAE-ben hasmenéses betegek székletéből izolált törzseket vizsgáltunk. A kuvaiti származó *salmonella* törzsek 9,8%-a (az invazív típusok 30%-a), az EAE-ből származók 4,1%-a bizonyult MDR-nek, ahol csak egy MDR *S. Typhit* találtunk. Bár az akkor (2005) érvényben lévő CLSI határérték alapján mindössze a kuvaiti törzsek 1,6%-a, az EAE törzsek 0,8% volt nem érzékeny ciprofloxacinra, az előző országban az izolátumok 14,2 (az invazív törzsek 52,5%-a), az EAE-ben a törzsek 7,4% tartozott abba MIC tartományba (0,125 – 0,5 mg/L), ahol egyre gyakrabban jelentettek terápiás sikertelenséget fluorokinolonok használata esetén.

Száztizenhat salmonella törzs esetén, melyek bármely 3. generációs cefalosprinnal szemben MIC  $\geq 1$  mg/L értéket mutattak, és melyeket ESBL termelésre vizsgáltunk, 69 esetben sikerült ilyen típusú enzim kifejeződését igazolni. Ezek közül 14-ben detektáltunk *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gént, és amelyekben az *ISEcp1* szekvencia jelenléte is kimutatható volt. Ezek közül 5 S. Typhimurium, illetve B csoportú izolátum PFGE vizsgálattal >80% hasonlóságot mutatott. Az ESBL termelés arány elsősorban Kuvaitban, nemzetközi összehasonlításban is kiemelkedően magas volt. Bár korábban salmonellák esetén különböző CTX-M allélokat világszerte, így Magyarországon is detektáltak, úgy tudjuk, vizsgálataink idejéig CTX-M-15 allélt a fajban csak néhány, sporadikus esetben írták le, míg a mi esetünkben öt törzs (mind vendégmunkásokból, akik min. 6 hónapja nem hagyták el az országot) járványtani kapcsolatra utaló hasonlóságot mutatott egymással. A csökkent ciprofloxacín érzékenységet mutató, illetve ESBL termelő törzsek magas aránya hozzájárulhat ahhoz, hogy nemzetközi összehasonlításban a Közel-Keletről hazatérő utazók gyakran kolonizáltak ilyen salmonellákkal.

Kuvaitban a shigella törzsek 50, míg az Emirátusokban 39%-a volt MDR. Jóllehet az alkalmazott határértékek (MIC  $\leq 8$  mg/L) szerint egyetlen törzs sem volt 3. generációs cefalosporinokkal szemben rezisztens, azok között, melyek  $\geq 1$  mg/L értéket mutattak négy törzs (1, 1,5, 2 és 2 mg/L cefotaxim MIC értékekkel) mutatott fenotípusosan ESBL termelésre utaló mintát. PCR-rel egyikük esetén sem sikerült TEM, SHV vagy CTX-M típusú ESBL gént kimutatni.

Shigella törzsek esetén a hagyományos első vonalbeli szerekkel, elsősorban ampicillinnel és trimetoprim-sulfametoxazzal szemben mutatott magas fokú rezisztenciát találtunk. Ugyanakkor a ciprofloxacín, a 3. generációs cefalosporinok és az akkori közelmúltban mindkét országban bevezetésre került tigeciklin esetén teljes in vitro hatékonyságot észleltünk. Egy esetleges A osztályú ESBL jelenlétére utaló, az enzim gátolhatóságán alapuló tesztekkel néhány olyan törzs esetén kaptunk pozitív reakciót, melyek az akkori határértékek alapján még 3. generációs cefalosporinokkal szemben egyértelműen érzékenyek minősültek és ezekben a törzsekben nem tudtuk kimutatni a leggyakoribb ESBL gének jelenlétét sem. Megjegyzendő, hogy a törzsek némelyikénél mért 2 mg/L-es cefotaxim MIC érték a jelenlegi CLSI rendszerben már „intermedier”, míg EUCAST -nál már rezisztens tartományba esik, hangsúlyozva a régióban a 3. generációs szerek korlátozott használhatóságát vérhas esetén.

#### 4.1.3. ESBL termelő *K. pneumoniae* járvány egy újszülött intenzív osztályon (VII)

2011 tavaszán két újszülött halt meg az Abu Dhabi Corniche Hospital (235 ágyas szülészeti-nőgyógyászati-neonatólogiai intézmény, 42 ágyas Újszülött Intenzív osztályal, mely a Johns Hopkins International szakmai irányítása alatt állt) Újszülött Intenzív osztályán szepszis tünetei között. A kórházhigiénés és mikrobiológiai vizsgálatok során a vizsgált 13 hetes periódusban 26 betegből izoláltak ESBL termelő *K. pneumoniae* törzset. A korábbi mikrobiológiai leleteket végig nézve az első izolátumot megelőző négy hónapban még 5 további esetet sikerült azonosítani a hasonló rezisztencia minta alapján. Az izolátumok közötti kapcsolatot kiderítendő 26 ESBL termelő törzset és további három, azonos időperiódusban izolált nem ESBL termelő törzset vizsgáltunk PFGE módszerrel. Ez alapján 22 izolátum járványtani kapcsolata valószínűsíthető volt. Egy törzs esetén igazoltuk, hogy az hordozta a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gént. A csoport tagjai az ST348 szekvencia típusba tartoztak. Jóllehet a fertőzés forrását nem sikerült felderíteni, a kiterjedt infekció kontroll intézkedéseknek köszönhetően az első eset felismerését követő 13. hét után ESBL termelő *K. pneumoniae* nem került izolálásra. Az általunk vizsgált járvány rendkívül agresszív volt, a csak kolonizált:beteg arány 21:10 volt. Vizsgálatainkkal igazolni tudtuk, hogy az esetek döntő többsége (22 izolátum, minden beteg és 12 kolonizált) egy CTX-M-15-öt termelő MDR *K. pneumoniae* törzs által okozott fertőzésnek volt tulajdonítható. Ismereteink szerint ez volt az első eset az Emirátusokban, hogy egy bakteriális járvány követésére molekuláris tipizáló eljárást használtak.

#### 4.1.4. ESBL termelő *E. coli* ST131 globális klón LPS mag (core) régiójának vizsgálata (VIII, XXI)

2008 májusa és 2009 áprilisa között az Al Ain-i Tawam kórházban izolált 121 ESBL termelő és 109 ESBL-t nem termelő *E. coli* vizelet izolátumot vizsgáltunk a különböző core típusokra fajlagos PCR módszerrel. Míg az ESBL-t nem termelők között a mag-típus megoszlás megegyezett a korábbi irodalmi adatokkal, az ESBL termelők között a korábban ritka K-12 mag típus mintegy tízszeres (44,6%) megszaporodását észleltük. Az 54 K-12 maggal rendelkező törzs közül 52 O25 szerocsoportúnak bizonyult. Hasonló eredményt kaptunk az emirátusi törzsekhez hasonlóan változatos PFGE mintát mutató 10 magyar törzset vizsgálva is. Összesen 24 törzs esetén igazoltuk, hogy mind a legelterjedtebb extraintesztinális fertőzést okozó ST131 szekvencia típus tagjai. Kiterjedt genetikai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a típus *waa* régiója gyakorlatilag

megegyezik a hasonló mag típusú egyéb izolátumokéval és egy törzs esetén (#81009) a teljes genom *de novo* összeállítása során igazoltuk, hogy az valóban az ExPEC törzsekre jellemző rezisztencia-, és virulencia gén profillal rendelkezik.

További vizsgálatok szükségesek annak eldöntéséhez, hogy a globálisan kiemelkedően sikeres *E. coli* ST131 klón korábban csak elvétve előforduló mag típusa hozzájárulhatott-e annak világméretű elterjedéséhez.

## 4.2. MULTIREZISZTENS NEM FERMENTÁLÓ GRAM NEGATÍV BAKTÉRIUMOK VIZSGÁLATA

### 4.2.1. Véráram fertőzést okozó *Stenotrophomonas maltophilia* törzsek vizsgálata egy hármás ellátási szintű kórházban (II)

Az elsősorban kórházakban előforduló invazív *S. maltophilia* fertőzések az utóbbi néhány évtized során jelentkező, a faj nagyfokú természetes rezisztenciája miatt egyre fokozódó kihívást jelentenek világszerte. 2000 és 2003 között a Tawam kórházban (Al Ain, EAE) összesen 25 *S. maltophilia* véráram fertőzésből izolált 21 törzs állt rendelkezésre annak eldöntésére, hogy elsősorban sporadikus vagy járványosan terjedő fertőzésekről van-e szó. PFGE vizsgálattal a törzsek 16 PFGE mintát mutattak és köztük három cluster volt azonosítható. Ezek közül kettő azonos betegből származó 2, illetve 4 törzset tartalmazott, míg a harmadik csoportba két, 8 hónap különbséggel izolált törzs volt található. Adataink egyértelműen igazolták, hogy jóllehet a faj esetén jól ismert a kórházi járványok formájában történő előfordulás, ebben az esetben járványtani kapcsolat csak az utóbbi pár esetén volt igazolható, a fertőzések döntő többsége egymástól független, sporadikus eset.

### 4.2.2. Plazmidon elhelyezkedő *bla*<sub>PER-7</sub> gén ceftazidim rezisztens *A. baumannii*-ban (VI)

Egy 6 éves gyermek légcső mintájából 4 hónap időeltéréssel izolált, azonos PFGE mintát mutató két, karbapenemekre rezisztens *A. baumannii* törzs (NM55 és NM128) közül ceftazidimmal szemben csak az előbbi volt rezisztens. Míg mindkét törzs hordozta a *bla*<sub>OXA-51-szerű</sub>, *bla*<sub>ADC-26</sub>, és egy *ISAbal* elem után elhelyezkedve a *bla*<sub>OXA-23</sub> géneket, a *bla*<sub>PER-7</sub> gén csak az NM55-ben volt kimutatható. Jóllehet ezt a gént a közelmúltban kromoszómális lokalizációval már leírták a fajban, esetünkben azt tudtuk hibridizációval igazolni, hogy az egy nagy plazmidon helyezkedik el. S1 nukleáz emésztést követően kimutattuk, hogy

a plazmid >200 kb nagyságú, és a ceftazidim érzékeny törzsben (NM128) egy jelentős méretű, a *bla*<sub>PER-7</sub> gént is érintő deléció szenvedett. A plazmidot *in vitro* nem sikerült konjugációval átvinnünk recipiensbe. A *bla*<sub>PER-7</sub> gén egy 1. osztályú integronon belül helyezkedett el, mely variábilis részén tartalmazta a rifampicin és kloramfenikol rezisztenciáért felelős *arr-2* és *cmlA7* géneket és szintén hordozta a *qacEΔ1*, *sul1*, és a *bla*<sub>PER-7</sub> gént követően a *gst* gént, majd egy *abc* transzporter és egy transzpozáz gén részeit, hiányzott viszont a kromozómális verzióban jelenlévő, ott a *bla*<sub>PER-7</sub> gén kifejeződését biztosító IS elem.

Eredményeink alapján nem állíthatjuk biztosan, hogy a *bla*<sub>PER-7</sub> gén lett volna felelős az NM55 törzs ceftazidim rezisztenciájáért, de ismereteink szerint ez az első leírása a *bla*<sub>PER-7</sub> gén plazmid lokalizációjának, melyet azóta néhány esetben már szintén megerősítettek, elsősorban a régió országaiból.

#### 4.2.3. NDM-2 termelő *Acinetobacter baumannii* az Egyesült Arab Emírségekben (IX)

2008 és 2010 között 155, különböző Abu Dhabi Emírátságon belüli kórházban izolált karbapenem rezisztens *A. baumannii* törzset vizsgáltunk a *bla*<sub>NDM</sub> gén jelenlétére. Ugyanazon beteg két különböző, 2009-ben vett vizelet mintájából izolált pozitív törzset találtunk. A 2004 óta áttétes vastagbél tumor miatt operált, fém húgyvezeték stenttel rendelkező nőbeteget Egyiptomban, Libanonban és az EAE különböző kórházaiban változatos, szélesspektrumú szerekkel, többek között karbapenemekkel is kezelték. A két ST253 törzs azonos PFGE és plazmid profil mintát mutatott és a *bla*<sub>OXA-70</sub> gént. Bár hordoztak *ISAbA1* elemet, de nem a *bla*<sub>OXA-70</sub> gént közvetlenül megelőző pozícióban. A *bla*<sub>NDM</sub> gént konjugációval nem sikerült mobilizálni.

A genom *Hind* III emésztését követően klónoztunk egy ~10 kb nagyságú, a *bla*<sub>NDM</sub> gént tartalmazó fragmentet, mely a recipiens meropenem MIC értékét ≤0,125 mg/L-ről 2 mg/L-re növelte. A gén az NDM-2 allélt kódolta, de nem tartalmazta a korábban Izraelben leírt, 468-as pozícióban lévő A→G szinonim szubsztitúciót. A *bla*<sub>NDM-2</sub> gén előtt megtalálható volt a *ISAb125* inzerció szekvencia.

A régióban NDM-2-t termelő *A. baumannii* törzset korábban (igaz, a mi törzsünkénél későbbi izolátumból) Izraelben írtak el. A két helyszín földrajzi közelsége, illetve az a tény, hogy a *bla*<sub>NDM-2</sub> gén az *ISAb125* szekvencia alatt helyezkedett el, nyitva hagyja akár a klonális terjedés, akár az IS-mediált gén-disszemináció, akár a két mechanizmus együttes meglétének lehetőségét is. Egy későbbi, e disszertációban nem szereplő analízis igazolta, hogy a saját és az izraeli törzsek, továbbá egy korábban Egyiptomban hospitalizált betegből Németországban izolált törzsek mind az ST103 típusba tartoztak és PFGE

mintázatuk alapján közeli rokonai voltak egymásnak azt mutatva, hogy a típus klonálisan terjed a a Közel-Keleten, hordozva az interkontinentális terjedés lehetőségét is.

#### 4.2.4. Járványos és sporadikus *Acinetobacter baumannii* törzsek eloszlása Abu Dhabi Emírátus kórházaiban (XI)

2008 márciusa és novembere között 5 Abu Dhabi kórházban izolált 110 klinikailag releváns, nem ismétlődő *A. baumannii* izolátumot vetettünk részletes vizsgálat alá. *bla*<sub>OXA-51-szerű</sub> génjeik allél típusát és PFGE mintázatukat meghatározva akkor tekintettünk egy törzset „járványosnak”, ha mindkét paraméter tekintetében legalább egy másik izolátummal azonosak voltak, míg a törzseket, melyek legalább az egyik fenti tulajdonságot illetően különböztek a többitől, sporadikusnak tekintettük.

A törzsek 72.7% bizonyult járványosnak, melyek a két fenti paraméter alapján 11 altípust (A-K) képeztek. Ezek három nagy, a *bla*<sub>OXA-51-szerű</sub> allél alapján meghatározott klónba (AD1-3) csoportosultak. Az AD1 klón tagjai az „Oxford séma” szerinti CC109-es klonális komplexbe tartoztak. A klónon belül a B és C altípus ST109, a D és E altípus ennek egyetlen lókuszban különböző variánsa ST95 volt, az A altípus pedig ST434 (az ST109-hez viszonyított két lókuszból különbözőséggel). Az AD2 klón tagjai egységesen ST110 típusúak voltak, míg az AD3 törzsek változatosabb szekvencia típusokat mutattak. Legtöbbjük a CC92 része volt, azaz a J és K altípus ST189, és a H altípus ST92, azonban az I altípus egy ezekről eltérő szekvencia típust (ST254) képviselt. Mindhárom klón tagjait több kórházban is sikerült kimutatni, sőt, amennyiben egy altípust legalább 3 törzs képviselt, akkor az legalább két intézményben megtalálható volt. A járványos törzsek kétszer annyi béta-laktám és aminoglikozid gént hordoztak (átlagosan 7,9 gén/törzs), mint a sporadikus izolátumok (3,8 gén/törzs).

A sporadikus törzsek sokkal heterogénebbek voltak és két csoportra voltak oszthatóak. Az A csoport 7 törzset tartalmazott, melyek olyan *bla*<sub>OXA-51-szerű</sub> allélt hordoztak, amik a három nagy klón valamelyikével megegyeztek, azaz a klónoktól csak PFGE mintájuk alapján különböztek, míg a B csoport 22 törzse a *bla*<sub>OXA-51-szerű</sub> gén 15 különböző allélját hordozta. Az A csoportú sporadikus törzsek sokkal gyakrabban hordoztak különböző rezisztencia géneket, mint a B csoportú sporadikus izolátumok.

A legfontosabb megfigyelés az volt, hogy a legalább 3 törzset magukba foglaló járványos altípusok több kórházban is jelen voltak, rámutatva a régióban eddig nem igazolt, kiterjedt kórházak közötti átvitel lehetőségére. Ugyanakkor a globális epidemiológia szempontjából fontos, hogy az Abu Dhabi kórházakban elterjedt három nagyobb klón mind ismert nemzetközi típus volt.

#### 4.2.5. Klinikai és környezeti karbapenem rezisztens *Acinetobacter baumannii* (CRAb) izolátumok összehasonlítása egy szaúdi kórházban (XXV)

A Szaúd-Arábia Keleti Régiójában, Qatif városában lévő 335 ágyas, általános ellátást nyújtó kórház osztályain 2014 januárja során gyűjtöttünk környezeti és klinikai mintákat. A vizsgálat ideje alatt 21 klinikai mintából (3 vér, 2 testfolyadék, 1 liquor folyadék, 7 légúti, 4 seb és 4 vizeletmintából) izoláltunk CRAb-t, míg a 208 környezeti minta 74 CRAb törzset eredményezett. Ötvenegy törzs (minden klinikai és 30 környezeti mintából származó izolátum) esetén vizsgáltuk a PFGE mintát és a *bla*<sub>OXA-51</sub>-szerű gén allélját is meghatároztuk.

Minden vizsgált osztályon jelen volt a CRAb környezeti szennyezőként és a betegektől származó mintákban egyaránt. A legnagyobb számban előforduló, a *bla*<sub>OXA-66</sub> allélt hordozó típus a CC2 globális klón (korábbi jelölés szerint WW2) volt, mely világszerte az egyik legelterjedtebb klón, és korábban már elfordult a régióban is. Noha a rendelkezésre álló adatok nem tették lehetővé a tényleges fertőzés és kolonizáció elkülönítését, a vizsgálati anyagok többsége fiziológiásan baktérium-mentes mintákból származott. A betegekből és a környezetből általában azonos típusú törzsek kerültek izolálásra, ami felveti annak lehetőségét, hogy a kontaminált környezet szolgálhatott, legalábbis egyes fertőzések esetén, forrásként.

### 4.3. KARBAPENEM REZISZTENS BÉLBAKTÉRIUMOK VIZSGÁLATA

#### 4.3.1. Egyes karbapenemázok országosan vagy regionálisan első leírása, illetve génjeik regionálisan első részletes jellemzése (X, XII, XIV, XVII)

##### NDM-1 (XII)

2009 és 2011 között négy Abu Dhabi Emírátsági kórházból érkezett 28 karbapenem rezisztens *Enterobacteriales* között PCR-ral hét NDM pozitív törzset (3 *K. pneumoniae*, 2 *E. coli*, 1 *E. cloacae* és 1 *C. freundii*) azonosítottunk, melyek mind *bla*<sub>NDM-1</sub> gént hordozták. Mind a hét törzsből sikerült csak a *bla*<sub>NDM-1</sub>-t hordozó plazmidot tartalmazó származékot előállítani. Az NDM plazmiddal minden esetben ko-transzferálódott legalább egy ESBL-t kódoló gén, de az ABC83 és ABC85 törzsek esetén számos további rezisztencia gén is, ideértve az olyan 16S metiláz géneket, mint az *armA* vagy *rmtC*. A *bla*<sub>NDM-1</sub> gént határoló régiók a plazmidok inkompatibilitási csoportja szerint (IncX3 vagy nem tipizálható 50 kb, IncHI1b 170 kb és IncA/C 150 kb) különbözött egymástól. Két *K. pneumoniae* törzs azonos szekvencia típusba (ST11) tartozott. Azonos IncX3

plazmid három fajban (*K. pneumoniae*, *E. cloacae* és *E. coli*) is előfordult. Ezen adatok, az NDM EAE-ben történt első leírása kapcsán az igazolják, hogy a *bla*<sub>NDM-1</sub> gén terjedésében a klonális terjedés és a horizontális átvitel egyaránt szerepet játszik.

#### NDM-7 (XVII)

Két Emirátusok-béli és 1-1 kuvaiti és ománi törzset azonosítottunk, melyek az imipenemmel szemben fokozott ellenállást biztosító NDM-7-es allélt fejezeték ki. A törzsek PFGE mintája különböző volt, az egyik emirátusi és az ománi törzs szekvenciái típusai azonos klonális komplexbe (CC10) tartoztak. Három törzsből az IncX3 pNDM-7-et konjugációval, egy törzsből csak transzformációval sikerült átvinnünk recipiensbe. Míg a *bla*<sub>NDM-7</sub> géntől, a gén átírási irányát tekintve lefelé, a szekvenciák megegyeztek, upstream különböző méretű deléciók voltak. A régióban először általunk kimutatott NDM-7 allél tovább hangsúlyozza az IncX3 plazmidok jelentőségét a karbapenemáz gének, jelen esetben egy fokozott rezisztenciát biztosító allél, terjesztésében.

#### VIM-4 (X)

Harmincnégy, karbapenemekre nem érzékeny, különböző Abu Dhabi kórházakból származó *Enterobacterales* izolátum között egy *bla*<sub>VIM</sub> gént, a régióban korábban részletesen nem leírt karbapenemáz gént hordozó *E. cloacae* törzset (ABC104) azonosítottunk. A gént konjugációval nem sikerült recipiensbe átvinni. S1 nukleáz emésztést követő hibridizációval, illetve a megfelelő PCR amplikonok szekvenálásával igazoltuk, hogy a *bla*<sub>VIM-4</sub> gén a törzs egy kb. 175 kb-os IncA/C plazmidján helyezkedik el együtt a *bla*<sub>CMY-4</sub> és egy *bla*<sub>TEM</sub> génnel, míg utóbbi szintén megtalálható volt a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> génnel együtt egy közel 300 kp plazmidon is. A *bla*<sub>VIM-4</sub>, egy I. osztályú integron része volt. A közelmúltban Olaszországban az általunk a régióban először detektálthoz hasonló méretű, a *bla*<sub>VIM-4</sub> gén a *bla*<sub>CMY-4</sub> gént szintén hordozó IncA/C típusú konjugatív plazmidot azonosítottak, mely ugyanazon betegből izolált két fajban is megtalálható volt, ami felveti annak lehetőségét, hogy a plazmid, legalábbis potenciálisan ebben a régióban is terjedhet, akár külön fajok között is, horizontális géntvitel révén.



## KPC-2 (XIV)

Az Al-Rashid kórházban (Dubai) 2012 márciusa és 2014 februárja között izolált 34 karbapenemekkel szemben nem érzékeny *Enterobacterales* törzs között 2  $bla_{KPC}$  pozitív, egymáshoz >95% PFGE minta hasonlóságot mutató *K. pneumoniae* ST14 törzset (ABC220 és ABC224) azonosítottunk. A törzsek számos virulencia faktor génen kívül több rezisztencia gént ( $bla_{TEM-1}$ ,  $bla_{SHV-1}$ ,  $bla_{CTX-M-15}$  és  $aac-6'-1b-cr$ ) is hordoztak. Konjugációval sikerült a 45 kb IncX3 pKPC-t mobilizálnunk. A plazmidon a  $bla_{KPC-2}$  allélt az *umuD* génbe inzertálódott Tn4401b transzpozon tartalmazta, mely, néhány korábban leírt pKPC-2-höz képest fordított módon illeszkedett a plazmid szerkezetébe. Egy korábbi kongresszusi beszámólótól, mely csak a KPC előfordulását jelentette a gén részletes analízise nélkül, ez volt az első alkalom ezen karbapenemáz génnek az Arab-félsziget országaiban való előfordulásáról és tovább hangsúlyozza az IncX3 plazmidok szerepét a helyi karbapenem rezisztencia terjesztésében.

### 4.3.2. Karbapenemázokat kódoló IncX3 plazmidok összehasonlító vizsgálata (XXIV)

2009 és 2014 között 12 emirátusi kórházban izolált 295 karbapenemáz termelő törzs között 30 olyan izolátumot azonosítottunk, melyek valamilyen karbapenemáz gént IncX3 típusú plazmidon hordoztak. Az öt faj az NDM gén négy-, az OXA-48-szerű és a KPC egyféle allélját hordozta. A 13 *E. coli* törzs csak korlátozott hasonlóságot mutatott egymáshoz, 8 különböző szekvencia típusba tartoztak. Az ugyancsak 13 *K. pneumoniae* izolátum közül 5  $bla_{NDM-1}$  hordozó, ≥90% PFGE minta hasonlóságot mutató ST11 típus volt. Kisebb, de hasonlóan szoros csoportokat képezett a 3 NDM-1-et és OXA-48-at egyaránt termelő ST1318 törzs (ezekben a  $bla_{NDM-1}$  helyezkedett el az IncX3 plazmidon) és a két ST14 típusú, KPC-2-t termelő törzs.

Huszonegy plazmid teljes szekvenciáját határoztuk meg és hasonlítottuk két, szintén az EAE-ban izolált, NDM-7-et kódoló plazmid már ismert szekvenciájához (XVII). A plazmidok gerincei hasonlóak voltak, de a mobilis elemeket felvevő, „loading” régiókban jelentős, részben a kódolt karbapenemázzal, illetve azok alléljaival összefüggő változatosságot észleltünk. A KPC-2-t kódoló gén egy Tn4401b transzpozonon helyezkedett el és a plazmid más rezisztencia gént nem hordozott. A hat OXA-181-et kódoló plazmid nagyon hasonló volt, rajtuk a karbapenemáz gén a *qnrS1* génnel együtt egy IS26 által határolt kompozit transzpozon részeként volt megtalálható. Az NDM-1-et kódoló plazmidok

karbapenemázt kódoló, egy ISCR27 és egy részleges ISAb125 között elhelyezkedő régiói azonosak voltak, csakúgy, mint a *bla<sub>NDM-4</sub>*, *bla<sub>NDM-5</sub>*, és *bla<sub>NDM-7</sub>* géneket keretező IS26 és IS5 közötti szakaszok.

Az emirátusi plazmidoknak egy 24905 bp hosszú, a plazmid replikációjáért, leány sejtek közti megosztásáért és az átvitelért felelős gerinc szakaszát összehasonlítottuk a világ különböző pontjairól származó 35 IncX3 plazmid hasonló régióival. Három jól elkülönülő csoport (*clade*) volt azonosítható. Az első az NDM-1, NDM-4 és NDM-7 és egy SHV-12- t kódoló plazmidokat tartalmazta, míg a második az NDM-5-öt, a harmadik az OXA-181 plazmidokat foglalta magába egy Olaszországban talált OXA-181 plazmid kivételével. Az emirátusi KPC-2 plazmid jelentősen eltért a Hong Kong-ban, illetve Franciországbán izolált, azonos karbapenemázt kódoló plazmidoktól. Mindhárom nagy *clade* egyaránt tartalmazott az EAE-ből, és a világ változatos régióiból származó plazmidokat.

Eredményeink azt mutatják, hogy az EAE-ban tapasztalt magas IncX3 prevalencia egyrészt a klonális terjedés következménye (lásd 5, nagyon hasonló plazmidot hordozó ST11 K. *pneumoniae* törzs jelenléte). Ugyanakkor több NDM allél (NDM-1, -4, -7) helyezkedett el hasonló szerkezetű plazmidokban, mely a gén a plazmidba való bejutását követő evolúciójának lehetőségét támogatja. Az viszont, hogy az NDM-5-ös allél eltérő gerincű plazmidban foglal helyet, a gén IncX3 plazmidokba történt többszörös felvételét valószínűsíti. A tény, hogy gyakorlatilag minden, az EAE-ban előforduló IncX3 plazmid típus más földrajzi régiókban is megtalálható volt azonos géneket, illetve allélokat hordozva azt igazolja, hogy a hordozó törzsek klonális terjedése mellett nem elsősorban e plazmidok helyi evolúciója, hanem azok importja, esetleg ezt követő helyi horizontális átvitele felelős az IncX3 plazmidok magas prevalenciájáért.

#### 4.3.3. *Karbapenemáz és 16S RNS metiláz aminoglikozid rezisztencia gének gyakoriságának vizsgálata (XIII, XV, XXIII, XXVI és XXVIII)*

Vizsgálataink előtt a régióban a CRE vizsgálatok általában egy-egy kórházra korlátozódtak és kevés számú törzset tanulmányoztak, így az egyes rezisztencia mechanizmusok prevalenciájáról nem álltak megbízható információk rendelkezésre. A legfontosabb karbapenemázok előfordulását, regionális, illetve országos szinten több időpontban, eltérő törzsszámon (13 – 1192) vizsgáltuk.

Összességében azt tapasztaltuk, hogy a regionális CRE törzsek mintegy 85-90%-a karbapenemáz termelő. Az leggyakoribbak az OXA-48-szerű enzimek különböző alléljai (~40%) voltak, melyeket szorosan követtek az NDM típusú enzimek (~30%). Különösen az EAE-ra volt jellemző az NDM+OXA termelők magas arány (>10%). Ez, a néhány %-ban előforduló VIM típusú enzimmel együtt

az MBL enzimek rendkívüli gyakoriságát (>40%) jelzi, míg a globálisan elterjedt KPC enzimek eddig csak néhány esetben fordultak elő a régióban.

A legtöbb esetben nem volt információnk arról, hogy a vizsgálatra küldött törzsek az izolált CRE törzsek milyen arányát jelentették. Ez alól az egyetlen, a régióban első, globálisan is az elsők között végzett országos szintű vizsgálat volt (XXVIII), melynek során az adott periódusban izolált törzsek 45,9%-át tanulmányozhattuk (504 izolátum), így azt mindenképpen reprezentatívnak tekintettük. Ez a vizsgálat derített fényt arra, hogy noha a regionális trendek az EAE mindhárom régiójában megfigyelhetők voltak, egyes kórházak között jelentős különbségek voltak észlelhetőek.

Egy projekt esetén (XV) volt alkalmunk azt vizsgálni, hogy az egyes enzim típusokat hordozó törzsekkel való fertőzöttség mutat-e összefüggést a megelőző egy évben történt külföldi utazással, esetleg EAE-béli, vagy külföldi hospitalizációval. Azt találtuk, hogy sem a külföldi utazás, sem a hospitalizáció önmagában nem mutatott szignifikáns összefüggést az egyes karbapenemáz típusok jelenlétével. Jóllehet az előzőleg külföldön (elsősorban Indiában) hospitalizált betegek törzseinek közel 80%-a NDM termelő volt, ezek mindösszesen az összes NDM termelő törzsnek csak 25,6%-át jelentették. Ezek alapján megállapíthatjuk, hogy szemben az általános vélekedéssel, már ebben az időben is (2009-2013) a régióban történő fertőzések többsége nem behurcolt, hanem helyi átvitel eredménye volt.

A gyakorlatilag általános aminoglikozid rezisztenciát okozó 16S metiláz gének esetén, bár az egyes országok, sőt, az EAE-n belül egyes területek, kórházak között is jelentős eltérésekkel, de jellemző volt az ezeket hordozó CRE törzsek magas (40-50% os) aránya. Míg a szaúdi törzsek között az *rmtC*, a régió többi országában az *armA* és *rmtF* dominált, de gyakori volt a több 16S metiláz gén hordozása is. A régiókra, sőt kórházakra jellemző mintázat felvetette a különböző géneket hordozó klónok jelenlétének lehetőségét (lásd 4.3.6.).

#### 4.3.4. Kettős karbapenemázt termelő törzsek vizsgálata (XXII)

Tekintve az ilyen CRE törzsek regionálisan, de különösen az EAE-ban megfigyelt gyakoriságát, öt az EAE-ban, egy Szaúd-Arábiában és egy Ománban izolált NDM+OXA-48-szerű karbapenemázt termelő *K. pneumoniae* törzset vettünk részletes vizsgálat alá. Az emirátusi törzsek közül 3, melyek különböző időpontokban ugyan, de azonos kórházból származtak, ST14 szekvencia típusba tartoztak. Mind a 7 törzsből a pNDM konjugatív volt, míg ez csak egy pOXA plazmid esetén volt így. Ennek ellenére, egy törzs kivételével, mely a *bla<sub>OXA</sub>* gént kromoszómálisan hordozta (OMABC109), a többiből transzformációval sikerült előállítanunk csak pOXA plazmidot hordozó származékot. A pNDM plazmidok

>160 kb IncHI1b, 50 kb nagyságú IncX3 illetve 110 kb méretű IncFib/FII típusú plazmidok voltak, melyek 60 kb nagyságú IncL/M és 6 kb méretű IncColE pOXA plazmidokkal kombinálódtak. A pNDM plazmidok mindegyike egyéb ESBL és 16S metiláz géneket is hordozott. A három ST14 törzsben mindkét plazmidon a karbapenemáz gének környezete azonos volt, a többi pNDM-en a *bla*<sub>NDM</sub> gént megelőző szakaszok, illetve a pOXA-kon a *bla*<sub>OXA</sub> gén mindkét oldala általában kisebb-nagyobb változatosságot mutatott.

Mindezek az eredmények azt mutatják, hogy a kettős karbapenemáz termelés magas helyi prevalenciája komplex, szimultán folyamatok eredménye, melyek között megtalálható a helyi klonális expanzió (ST14), csakúgy, mint a plazmid-kódolt karbapenemáz gének helyi, illetve regionális átvitele is.

#### 4.3.5. A CRE törzsek antibiotikum rezisztenciája (XXVI, XXVIII)

A törzsek antibiotikum érzékenységét két különböző időpontban és területen gyűjtött nagyobb tanulmányban vizsgáltuk: 2009 és 2017 között a régió országaiban izolált 1192 törzsön (XXVI) és 2018-19 9 hónapja során a EAE három régiójában (XXVIII). Mindkét alkalommal jellemző volt az általános rezisztencia magas foka, a kolisztin (20,2 és 23,6%), tigecliklin (40,1 és 41,5%) és ceftazidim-avibaktám rezisztens törzsek magas (46,7 és 44,6%), és az aztreonam-avibaktám rezisztencia alacsony (4,5 – 6,2%) aránya. Utóbbi, *in vitro*, az egyébként XDR-nek vagy PDR-nek bizonyuló törzsek esetén is több, mint 95% -ban is hatásos volt. A karbapenemáz termelők között szignifikánsan több volt a meropenem, imipenem, ciprofloxacín és aminoglikozid rezisztens. A nem karbapenemáz termelőkhöz viszonyítva a két karbapenemáz termelő esetén ez gyakorlatilag minden antibiotikumra vonatkoztatva igaz volt. Az MBL termelő törzsek mind rezisztensek voltak ceftazidim-avibaktámra. Viszont szemben a teljes gyűjtemény általános, és minden egyéb rezisztencia csoporton belüli fajmegoszlással, a nem MBL-alapú ceftazidim-avibaktám rezisztens, és az aztreonám avibaktám rezisztens törzsek között a *K. pneumoniae*-val szemben domináltak az *E. coli* izolátumok. Ezen utóbbi két csoport tagjai sporadikus, azaz egymással rokonságot nem mutató törzsek voltak.

Az EAE-n belül végzett országos felmérés során jelentős különbségeket találtunk egyes kórházak között. A kórházak szintjén vizsgálva az eloszlásokat, mindhárom régióban tudtunk olyan kórházakat azonosítani, amelyek az adott területen belül a legtöbb rezisztenciával összefüggő paraméter esetén a legmagasabb regionális értékkel rendelkeztek.

Adataink egyértelműen mutatják, hogy egyrészt a régióban a CRE törzsek között a nem béta-laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia is nagyon

kiterjedt. Az XDR törzsek esetén, bár a rezisztencia szintjük jóval meghaladja a biztonságos empirikus alkalmazáshoz szükséges alacsony értéket, még mindig elsősorban a kolisztin és foszfomicin jöhetnek szóba. Figyelemre méltó, hogy néhány esetben, elsősorban *E. coli* törzsek között, a ceftazidim-avibaktám rezisztencia nem volt MBL termeléshez köthető. Noha kereskedelmi forgalomban standard kombinációban még nem hozzáférhető, az aztreonam-avibaktám még az itteni, magas MBL prevalenciájú területen is hatékonynak bizonyult *in vitro*.

#### 4.3.6. Klonalitás a CRE törzsek között (XXIII, XXVIII)

Az első vizsgálatban (XXIII) 2015 júniusa és 2016 júniusa között 5 Dubai kórházban izolált 89 CRE törzset (az össze CRE 14,9%-át), míg a második projektben (XXVIII) 504, az EAE-ben 2018 júliusa és 2019 márciusa között izolált, az összes CRE 45,9%-át, elsősorban a döntő többséget jelentő *K. pneumoniae* törzs klonalitását vizsgáltuk. Az első tanulmányban a 70 *K. pneumoniae* törzs tagjai közül 35 (50%) egy szekvencia típust (ST14) képviselt, mely szignifikánsan gyakrabban volt XDR ( $P=0,0273$ ), két karbapenemázt termelő ( $P=0,0001$ ) és került izolálásra emirátusi betegekből, mint a sporadikus törzsek.

E helyi eredményeket (XXIII) az országos vizsgálat (XXVIII) is megerősítette. Míg az *E. coli* törzsek változatos szekvencia típusokat mutattak, a sporadikus izolátumok mellett a *K. pneumoniae* törzsek három nagy klónba voltak sorolhatóak: CC14, ST231 és CC147, melyek a faj törzseinek 40,6%-át, 12,7%-át és 11,3%-át, együtt a *K. pneumoniae* izolátumok 64,6%-át, míg az összes helyi CRE törzs 48,6%-át tették ki. Az utóbbi tanulmány is megerősítette, hogy a három klón, de elsősorban a CC14 tagjai sokkal rezisztensebbek voltak a sporadikus izolátumoknál. Bár eltérések voltak az egyes régiók és jelentős eltérések a régiókn belül egyes kórházak között a jelenlévő klónok aránya tekintetében, az figyelemre méltó volt, hogy még a legalacsonyabb CC14 prevalenciájú kórházakban is a *K. pneumoniae* törzsek minimum 16,7%-a ennek a klónnak volt a tagja.

Részletes WGS vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a CC14 klón tagjai nem voltak egységesek: a két legmagasabb prevalenciájú, azonos régióba tartozó kórház (SNE-A és SNE-B) törzsei különböző szubklónok tagjai voltak eltérő genotípussal. Mindez azt mutatja, hogy a jelentős régiók-, és kórházak közötti terjedés mellett a klónok helyi terjedésének is jelentős szerepe van.

Mindezek fényében különösen fontos volt, hogy e nagy törzsszámon végzett vizsgálat is igazolta, hogy a CC14 törzsek, tehát a legrezisztensebb

izolátumok, szignifikánsan gyakrabban fordultak elő emirátusi betegek mintáiban: egyváltozós modellben vizsgálva az emirátusi betegeknek 2,257-szer (95% C.I. 1,455–3,501,  $p < 0,001$ ), több változós modellben 2,088-szor (95% C.I. 1,296–3,364,  $p=0,002$ ) volt nagyobb esély CC14 fertőzésre, mint a nem emirátusiaknak. A másik két gyakori klón esetén ilyen összefüggést nem találtunk. A rendelkezésre álló adatok nem tették lehetővé e különbség okainak vizsgálatát, de úgy gondoljuk, a megfigyelés mindenképpen felhívja a figyelmet egy létező, részleteiben tovább vizsgálendő problémára.

#### 4.3.7. *A jelen CRE helyzet kialakulásának dinamikája Abu Dhabiban (XXX)*

Vizsgálataink során Abu Dhabi emirátus 5 nagy állami és egy, a katonasághoz tartozó kórházából 2009 és 2015 között izolált törzseket három időszakra osztva (2009-11 (N=12), 2012-13 (N=47), 2014-15 (N=265)) hasonlítottuk a **XXVIII** projekt során 2018-19 nyolc hónapja alatt ugyanebben az emirátusban izolált törzsekhez. Eredményeink egyértelműen mutatják, hogy a 2018-19-ben az országban domináló klónok közül kettő (ST14 és CC147) már a korai években is jelen volt a vizsgált Abu Dhabi kórházak törzsei között, míg az ST231 törzsek 2014-ben jelentek meg. A legnagyobb arányú folyamatos növekedés a legrezisztensebb ST14 törzsek esetén volt megfigyelhető. Ezek alapján kimondhatjuk, hogy a 2018-19-re országosan kialakult súlyos helyzet egy folyamatos fejlődés eredménye volt, és nem néhány klón hirtelen, robbanásszerű megjelenése vezetett idáig. Egy időben elkezdett, széleskörű, kiterjedt, molekuláris tipizáláson alapuló surveillance jó eséllyel, már a járvány korábbi időszakában felfedhette volna ezeket a trendeket.

#### 4.3.8. *Az országban domináló K. pneumoniae ST14 klón törzseinek változatossága (XXVII)*

2011 és 2016 júniusa között a Fél-sziget 5 országának 33 kórházából származó 761 CRE törzsből random kiválasztottunk 70 ST14 törzset, melyeket a hordozott karbapenemáz allélok és az azokat hordozó plazmidok alapján 13 alcsoportra (A-M) tudtuk osztani. Minden alcsoportból több (maximum 5), összesen 39 a régióban izolált ST14 törzset teljes genom szekvenálásnak vetettünk alá. A törzsek 3 csoportot (cluster) és 7 szingletont alkottak. Az első két cluster izolátumai több kórházból származtak, míg a harmadikban találhatóak mind egyetlen szaúdi kórházban kerültek izolálásra. Minden izolátum számos szerzett rezisztencia gént hordozott a karbapenemáz gének mellett, mely magyarázta az e klónra általában jellemző MDR/XDR jelleget. Az EAE-ban, és

részben annak környezetében izolált törzsek között három karbapenemáz öt allélját azonosítottuk az azokat egyesével vagy kombinációkban termelő törzsek között. Ez mindenképpen azt sugallja, hogy a klón törzsei kiemelten alkalmasak horizontális plazmid terjedés során recipiensként viselkedni.

A plazmid-kódolt karbapenemázok tekintetében még az egyébként egymáshoz nagyon hasonló törzsekből álló 1. és 2. clusteren belül is jelentős heterogenitás volt megfigyelhető. Ugyanakkor az a tény, hogy azonos clusterben lévő, azonos enzimet termelő törzsek több kórházból is izolálásra kerültek, a klonális terjedés szerepére utal, az ST14 törzsek komplex járványtani dinamikáját igazolva.

A 39 regionális ST14 törzs gerinc-genomját 173 hasonló típusú, a világ különböző pontjairól származó, nyilvános adatbázisokból letöltött genomi szekvenciáihoz hasonlítottuk. Az ST14 törzsekre általában jellemző KL2 tok lókuszt hordozó törzsek több csoportot képeztek, míg a többi (KL16, KL64, KL107, KL133) világosan elvált ezektől. Az EAE-ből és Bahreinből származó KL64 lokuszú törzsek közös csoportot alkottak az NDM-1-et, NDM-5-öt és vagy OXA-232-t termelő, a világ különböző pontjairól (Hollandia, Ausztrália, India, USA) származó törzsekkel. Ez felveti a lehetőségét annak, hogy a KL64 törzsek az ST14 klónnak egy jelenleg kialakuló és terjedő szubtypusát jelentenek. Hogy a KL64 tok előnyt jelenthet a törzsek számára, a jelen gyűjtés ideje után (2018-19-ben) izolált törzsek későbbi vizsgálata is megerősítette (lásd **XXVIII**): addigra már az EAE-ban izolált ST14 törzsek 90.6%-a a KL64 típust hordozta.

#### 4.3.9. Egy kuvaiti VIM-4 plazmid/integron járvány vizsgálata (XX)

2009 és 2011 között Kuvaitban a *bla*<sub>VIM</sub> gént hordozó, de többségükben egymástól különböző törzsek elszaporodását észlelték. Vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy a jelenség megmagyarázható-e a *bla*<sub>VIM</sub> gént hordozó mobilis genetikai elemek terjedésével. Hat Kuvaitban izolált *K. pneumoniae*, egy *E. cloacae* és egy *E. coli* törzset vizsgáltunk, és hasonlítottuk őket két Ománban, egy az EAE-ben és egy Szaúd-Arábiában izolált VIM termelő *E. cloacae* törzshöz.

A kuvaiti törzsek közül csak kettőnek (KKp1 és KKp2) volt azonos a PFGE mintája, ezek szekvencia típusa (ST1399) is megegyezett. Az *E. cloacae* törzsek közül a két ománi törzs azonos PFGE mintát mutatott, de a velük azonos szekvencia típusú (ST182), az EAE-ből származó törzs makrorestrikciós mintájában eltért tőlük. A két, gyakorlatilag azonos kuvaiti *K. pneumoniae* törzs mellett további 3 független *K. pneumoniae* törzs és az *E. coli* izolátum is egy IncA/C típusú, ~165 kb nagyságú konjugatív plazmidon hordozta - a *bla*<sub>CMY-4</sub> mellett - a *bla*<sub>VIM-4</sub> gént. A *bla*<sub>VIM-4</sub> és egy a *bla*<sub>TEM</sub> mellett a *bla*<sub>CMY-4</sub> is egy hasonló méretű IncA/C plazmidon volt lokalizálható az ABC104 törzsből is.

Az egyik kuvaiti *K. pneumoniae* törzs (KKp4 törzs) plazmidjának teljes szekvenciáját meghatároztuk. A plazmid három rezisztencia szigetet (RI-1, -2, -3) tartalmazott számos rezisztencia génnel. A harmadik rezisztencia szigeten foglaltak helyet egy In416 szerkezeten belül a *bla<sub>VIM-4</sub>*, *aacA7*, *dfrA1*, *ΔaadA1* gének, ezenfelül egy *smr* kazetta, egy In-*t4-like*, és egy higany rezisztencia operon is.

Meghatároztuk a vizsgálatba bevont összes törzs esetén a *bla<sub>VIM-4</sub>* gént tartalmazó integron szerkezetét. Fajtól és plazmidtól függetlenül az összes kuvaiti izolátum azonos típusú integronon hordozta a VIM karbapenemáz génjét. Ettől eltért a két, egyébként egymással azonos ománi törzs integronja, míg a harmadik integron típus a két különböző plazmidot hordozó szaúdi és emirátusi törzsrre volt jellemző.

Eredményeink azt mutatják, hogy a 2009 és 2011 között Kuvaitban tapasztalt magas VIM prevalencia jelentős mértékben nem klonális terjedéssel, hanem a *bla<sub>VIM-4</sub>*-et magában foglaló In416 integron horizontális átvitelével volt magyarázható. Mindennek alapja döntően egy konjugatív IncA/C típusú plazmidnak a faj-határokat nem respektáló terjedése volt, de hozzájárult ugyanennek az integronnak más, részben szintén IncA/C típusú, részben nem tipizálható plazmidokba történt átugrása.

#### 4.4. KOLISZTIN REZISZTENS BÉLBAKTÉRIUMOK VIZSGÁLATA

##### 4.4.1. Az *mcr* gén első leírása az Arab-félsziget országaiban (XVI, XVIII)

Hetvenöt, a törzsgyűjteményünkéből random kiválasztott kolisztin rezisztens bélbaktérium törzset *mcr-1*-re specifikus PCR-ral szűrve 4 pozitív *E. coli* törzset azonosítottunk: kettő Bahreinből, egy Szaúd-Arábiából, egy az EAE-ből származott (XVI). A törzsek különböző ST-be tartoztak, mind multirezisztensek voltak, karbapenemekkel szemben egy (BA76) mutatott csökkent érzékenységet, és egy (SA26), mely NDM-1 karbapenemázt termelt, volt rezisztens. Három pMCR plazmid konjugatív volt. Mind négy törzsből származó pMCR teljes szekvenciáját meghatároztuk. A két bahreni és az emirátusi törzsek plazmidjai közel azonos méretű, IncI2 típusú plazmidok voltak, melyek közül csak a pBA76-MCR-1 hordozott az *mcr-1*-en kívül más rezisztencia gént: egy, az *mcr-1* géntől függetlenül inzerálódott, *ISEcp1* által promótált *bla<sub>CTX-M-64</sub>* gént. E plazmidok gerince nagyfokú hasonlóságot mutatott az első leírt *mcr* plazmid szerkezetéhez. Bennük az *mcr-1* gént követő szakasz szintén azonos volt az első *mcr* plazmidéval, míg a gént megelőző szakasz egyéb, korábban leírt plazmidokban is megtalálható



volt. A negyedik plazmidban (pSA26mcr-1) az *mcr-1* -et megelőző szakasz megegyezett a ABC149 törzs plazmidjában találtéval, de utóbbi a gén után is tartalmazott egy IS*ApI1* inzerció szekvenciát, így itt az *mcr-1* egy komplett kompozit transzpozon részeként helyezkedett el.

Az ST68 típusú, számos virulencia faktort hordozó szaúdi törzsben (SA26) talált IncH12 pMCR annak teljes szerkezetében is különbözött a másik három plazmidtól. Rezisztencia szigete, 13 (aminoglikozid, beta-laktám, fenikol, tetraciklin, szulfonamid, trimetoprim és makrolid) antibiotikum rezisztencia gént tartalmazott.

Ezt követően megvizsgáltunk 2014 és 2016 júniusa között Ománban egy, az ellátás teljes spektrumát nyújtó kórházban kolisztin rezisztensnek talált 21 *K. pneumoniae* és egy *E. coli* törzset az *mcr-1* és -2 gén jelenlétére. Az egyetlen *mcr-1* pozitív törzs egy *E. coli* ST10-es szekvencia típusú törzs (OM97) volt. A törzs egy 63722 bp nagyságú IncI2 pMCR-t hordozott. Az *mcr-1* gént közvetlenül körülvevő szekvenciák megegyeztek a korábban (XXVI) a Bahreimból izolált törzsben kimutatott pBA76-mcr-1 és pBA77-mcr-1 plazmidokéval

Fenti vizsgálataink során elsőként jelentettünk az Arab Fél-szigetről *mcr* gént hordozó plazmidokat igazolva, hogy e plazmidok a régió országaiban is megjelentek a helyi törzsek között.

#### 4.4.2. CRE törzsek kolisztin rezisztenciája és annak genetikai háttere (XXVI, XXVII, XXVIII)

Három tanulmány (XXIII, XXVI, XXVIII) során összesen 384 kolisztin rezisztens CRE törzs esetén vizsgáltuk a fenotípus genetikai hátterét. A plazmid-kódolt kolisztin rezisztencia aránya 0 és 0,82% között változott. 49 *K. pneumoniae* törzs esetén (XXVII, XXVIII) WGS vizsgálat történt és vizsgáltuk, hogy az irodalomban a kolisztin rezisztenciáért leggyakrabban felelősnek talált, az *mgrB*, *PhoP*, *PhoQ*, *pmrA*, *pmrB* géneket érintő mutációk közül a régió törzseiben melyek fordulnak elő. Az első tanulmányban vizsgált 13 törzs 94,9%-a, a másodikban tanulmányozott 36 izolátum 80,6%-a esetében tudunk olyan kromoszómális mutációt kimutatni, mely magyarázta a kolisztin rezisztens fenotípust.

Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy a humán fertőzésekéből származó CR *K. pneumoniae* törzsek között megfigyelt magas kolisztin rezisztencia elsősorban kromoszómális mutációkkal magyarázható.

#### 4.4.3. Az első panrezisztens járvány az EAE-ben, - egy kolisztin rezisztenciát okozó ritka mutáció (XIX)

2013 májusában egy Abu Dhabi kórházból (ABD-A) 4, azonos betegből származó PDR *K. pneumoniae* törzset kaptunk tipizálásra. A betegnek peritonitise volt és egy Umm Al Qwain emirátusban lévő kórházból (UAQ-A) került, feltehetően egy Dubai kórházon keresztül, átvételre az ABD-A kórházba. Szintén anekdotikus adatok szerint a beteget korábban Indiában kezelték. Egy héttel később, szintén az ABD-A kórházból egy másik betegről is érkezett egy PDR *K. pneumoniae* törzs, majd nem sokkal később az első betegről érkezett még további két izolátum. Augusztusban, az UAQ-A kórházból érkezett egy pánrezisztens izolátum. Laboratóriumunk ezeket az izolátumokat vetette részletes vizsgálat alá és hasonlított egy, időközben egy másik Umm Al Qwain-i kórházban (UAQ-B) izolált pánrezisztens törzshöz (MS6671), melyről ismert volt, hogy OXA-181 enzimet termel, és ST147 szekvencia típusú. PFGE-vel a friss törzsek >90%-ban hasonlóak voltak, az MS6671 törzs 80%-ban volt hasonló hozzájuk. A törzsek mind ST147 típusúak voltak, kromoszómálisan hordozták a *bla*<sub>OXA-181</sub> gént, és az egy betegből származó 5 törzsből egy, és a MS6671 kivételével mind hordozta a *bla*<sub>NDM-5</sub> gént is. A törzsek mindegyikében a *bla*<sub>OXA-181</sub> az *mgrB* génbe volt inzertálódva.

Az *mgrB::bla*<sub>OXA-181</sub> struktúrát klónozva igazoltuk, hogy az inzertálódott *bla*<sub>OXA-181</sub> funkcionális, azaz önmagában képes karbapenem rezisztenciát okozni. A vad törzsben vad típusú *mgrB* gént klónozva, az inzerciós mutánszt komplementálva igazoltuk, hogy ez az inzerció okozta a törzsek kolisztin rezisztenciáját.

A *bla*<sub>NDM-5</sub> gént hordozó plazmid teljes szekvenciáját meghatároztuk. Ez egy 96549 bp méretű IncFII plazmid volt, melynek 66915 bp hosszú gerince és egy 26364 bp rezisztencia szigete volt. Utóbbin az *ermB*, *mph(A)*, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *rmtB*, *bla*<sub>NDM-5</sub>, *sul1*, *aadA2* és *dfrA12* rezisztencia gének helyezkedtek el. A plazmid nagyfokú hasonlóságot mutatott az MS6671-ban található plazmiddal, jóllehet abból egy nagyméretű deléción miatt hiányzott a karbapenemáz gén.

Jelentős hasonlóság volt kimutatható két Dél-Koreában, Szöulban izolált, szintén ST147 *K. pneumoniae* törzsből származó, szintén NDM-5-et kódoló hasonló plazmid szekvenciájával is. Ezen törzsek egyike egy olyan betegből származott, akit korábban egy Abu Dhabi kórházban kezeltek. Ezek alapján, túl azon, hogy a vizsgálataink az első EAE-ben zajló pánrezisztens járványra derítettek fényt és igazolták egy ritka inzerciós mutáció funkcionalitását, egy PDR klón kontinens határokon átívelő terjedését is sikerült valószínűsíteniük.

#### 4.4.4. Az *mcr* gén brojlercsirkék ürülékéből izolált törzsekben (XXIX)

Négy, Al Ain városától 15-70 km, egymástól 30-90 km távolságra lévő, egymástól független tulajdonban lévő brojler farmról 2018 március-áprilisában gyűjtöttünk 10-10, egyenként 3-3 széklet mintát tartalmazó kompozit mintát. Ezek vegyes tenyészetének kivonatán végzett *mcr*-1, -2, -3, -4 és -5 specifikus PCR 36 (90%) esetén adott pozitív eredményt. Telep PCR-ok segítségével 216 *mcr*-1 pozitív törzset azonosítottunk, melyek közül faj, telep morfológia és plazmid mintázat alapján végül 39 törzset (34 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae*, 2 *E. albertii* és 1 *S. Minnesota*) választottunk ki, melyeknek meghatároztuk antibiotikum érzékenységét és teljes genom szekvenciáját.

A törzsek mindegyike számos virulencia faktort hordozott. Figyelemre méltó volt, hogy az izolátumok több mint 50%-ában jelen voltak olyan gének (*hlyF*, *iron*, *iutA*, *sitA*, *traT*), melyek egyaránt gyakoriak az madár-kórokozó (APEC) és humán extraintesztinális kórokozó *E. coli* (ExPEC) törzsekben. A 39 törzsből 9 hordozott valamilyen 3. generációs cefalosporin rezisztencia gént (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub>), egyharmaduk plazmid-kódolt fluorkinolon rezisztencia gént (*qnr*) és kettő pedig 16S riboszómális RNS metiláz kódoló gént (*rmtB*). A törzsek antibiotikum rezisztenciája genotípusuknak megfelelő volt, CRE törzset nem találtunk köztük.

A két *K. pneumoniae* törzs ST340 típusú volt és azonos cgMLST csoportba tartoztak, csakúgy, mint a két *E. albertii* izolátum. A 34 *E. coli* törzs 16 ST-t reprezentált, melyek közül nyolcat több törzs is képviselt, hármat közülük (ST101, ST354, ST1196) több farmon is megtaláltunk. cgMLST clustereket 7 ST típuson belül találtunk. Az 5. clustertől eltekintve minden cluster azonos farmról származó törzseket tartalmazott, de gyakori volt, hogy a cluster közvetlen közelében azonos ST típusú, egyéb farmról származó törzseket találtunk.

A 39-ből 20 esetben sikerült az *mcr* gént hordozó plazmidot konjugációval, hat esetben több plazmid együttes konjugációval és ezt követő transzformációval átvinni, míg 9 esetben csak transzformációval sikerült pMCR-t tartalmazó származékot nyernünk.

A törzsekben, melyekből mobilizáltuk az MCR plazmidokat, azok mérete 35, 60 és >150 kb volt. Minden 60 kb plazmid IncI2, a >150 kb plazmidok IncHI2, míg a 35 kb plazmidok IncX4 típusúak voltak. Az *mcr*-1 gén környezete a plazmidok Inc típusa szerint változott.

Figyelembe véve az izolált törzsek fajtát, szekvencia típusát, és MCR plazmidjaikat, az 39 izolátum 19 csoportra volt osztható.

Szemben az *mcr* gének a korábban vizsgált humán CRE törzsekben talált ritkaságával, a brojlercsirkék székletmintáiban a fajok, szekvencia típusok és az *mcr*-1 gént hordozó plazmidok jelentős változatosságát találtuk. Jóllehet több

törzs hordozott különböző rezisztencia géneket, CRE törzset nem találtunk közöttük. Lévé, hogy a kolisztin szisztémás humán felhasználása csak karbapenem rezisztens törzsek esetén jön szóba, humán eredetű nem CRE törzsek izolálásakor kolisztin érzékenység vizsgálatára általában nem kerül sor. Ahhoz azonban, hogy megértsük az *mcr* hordozó törzsek állat-élelmiszer-ember tengelyen történő esetleges terjedését, a kolisztin érzékenység vizsgálatot emberi izolátumok esetén azok antibiotikum rezisztenciájától függetlenül is el kell végezni.

## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK, TÉZISEK

1. Elsőként szolgáltatottuk az ESBL termelés genetikai hátterének részletes leírását enteroaggregatív *E. coli* törzsekben. E munka kapcsán először jelentettük a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gén előfordulását az Arab-félszigetről. **(I)**
2. Elsőként mutattunk rá a régióban a salmonella és shigella törzsek között meglévő gyakori MDR fenotípusra és az előbbi kórokozó csoport esetén a gyakori ESBL termelésre és az abban az időben még érzékenynek tekintett, de gyakran sikertelen kezelést eredményező ciprofloxacín MIC tartomány elterjedtségére. **(III-V)**
3. Elsőként írtuk le a salmonellák esetén nem sporadikus törzsek között észlelt CTX-M-15 termelést 5, egymáshoz nagyon hasonló makrorestrikciós mintát mutató B csoportú salmonella törzs kapcsán. **(IV)**
4. Egy neonatológiai intenzív osztályon több csecsemő halálához vezető járvány kapcsán az EAE-ban elsőként alkalmaztunk a járvány felderítését és kontrollját segítő molekuláris tipizáló eljárásokat és igazoltuk, hogy a kórokozó egy CTX-M-15-öt termelő *K. pneumoniae* ST348 törzs volt. **(VII)**
5. Elsőként igazoltuk, hogy az ESBL-t termelő húgyúti *E. coli* izolátumok között az LPS mag-típus megoszlás jelentősen eltér a korábban ilyen forrásból származó törzsek között leírtaktól és elsőként írtuk le ennek okaként, hogy a globálisan elterjedt *E. coli* ST131 törzsek LPS mag szerkezetét kódoló szakasz a korábban klinikai izolátumok között ritka K-12 típusnak felel meg. **(VIII, XXI)**
6. A régióban először alkalmazva molekuláris tipizáló eljárást egy kórház *S. maltophilia* izolátumainak vizsgálatára megállapítottuk, hogy a vizsgálat idején az elsősorban immunkompromittált betegekből izolált törzsek, a viszonylag jelentős prevalencia ellenére, döntően sporadikusak. **(II)**
7. Elsőként mutattuk ki, hogy *A. baumannii* -ban az eredetileg kromoszómális lokalizációban leírt *bla*<sub>PER-7</sub> gén plazmidon is előfordulhat egy komplex, 1. osztályú integronon belül. **(VI)**
8. Elsőként írtuk le az Emirátusokban, és az első között a régióban *A. baumannii* NDM-2 termelését. **(IX)**
9. Elsőként igazoltuk, hogy az Abu Dhabi kórházakban előforduló *A. baumannii* törzsek a gyakorlatilag minden kórházban előforduló 3 nagy globális klón, a *bla*<sub>OXA-69</sub>-et termelő WW1, a *bla*<sub>OXA-64</sub>-et termelő WW7 és a *bla*<sub>OXA-66</sub>-ot termelő WW2 tagjai voltak, és először mutattunk rá a helyi kórházak közötti törzsvitel valószínűségére. **(XI)**
10. Egy Szaúdi kórház osztályait vizsgálva igazoltuk, hogy a kórházi környezeti és klinikai mintákból származó karbapenem rezisztens *A. baumannii* törzsek

között (többnyire globális „*high risk*” klónok tagjaként) olyan mértékű volt az átfedés, mely valószínűsíti a szennyezett környezet szerepét a fertőzések kialakulásában. **(XXV)**

11. Elsőként igazoltuk az Emirátusokban NDM típusú karbapenemáz (NDM-1) jelenlétét egyszerre több, különböző fajba tartozó bélbaktérium esetén és adtuk az azt hordozó plazmidok és a gént keretező szekvenciák részletes leírását. **(XII)**
12. A régióban elsőként írtuk le az általában magas fokú karbapenem rezisztenciát eredményező NDM-7-es allél jelenlétét több országban és adtuk meg a gént hordozó plazmidok részletes molekuláris jellemzését. **(XVII)**
13. Az Arab-félsziget országaiban elsőként írtuk le VIM típusú karbapenemáz gén (VIM-4-es allél) részletes genetikai környezetét rámutatva annak a világ más pontjain talált izolátumokban találtakkal szemben mutatott jellegzetességeire. **(X)**
14. Az Arab-félsziget országaiban elsőként adtuk egy KPC típusú karbapenemáz gén (KPC-2-es allél) leírását, genetikai környezetének összehasonlító vizsgálatát, és igazoltuk plazmidon kódolt mobilis voltát. **(XIV)**
15. Igazoltuk, hogy az IncX3 plazmidok „*load*” régióiban tapasztalt variabilitás többnyire a hordozott karbapenemáz gén/allél-től függ. Igazoltuk, hogy az IncX3 plazmidok terjedéséért úgy az őket hordozó klónok, mint ezzel párhuzamosan a plazmidok horizontális átvitele a felelős. Igazoltuk, hogy az *bla*<sub>NDM</sub> gén különböző alléljainak változatossága e plazmidokban részben a gén plazmidba történt inzertálódása utáni evolúció (pl. NDM-1, -4, -7), részben független inzerciók események következménye (NDM-5). **(XXIV)**
16. Elsőként igazoltuk nagy törzsszámok vizsgálatával a régióra jellemző karbapenemáz-típus eloszlást, azaz, hogy az OXA típusú enzimek gyakoriságát az NDM enzimek követik, hogy jellemzően gyakoriak a kettős karbapenemáz termelők, hogy ritka a VIM, és hogy a KPC enzimek, meglepő módon, csak elvétve fordulnak elő, ami összességében az MBL enzimek empirikus kezelést is befolyásoló nagyon magas arányát (>40%) eredményezi **(XIII, XV, XXIII, XXVI, XXVIII)**
17. Elsőként igazoltuk, hogy – szemben az általánosan elterjedt vélekedéssel – a régió vizsgált országaiban a helyi CRE esetek többsége nem volt külföldi utazáshoz, külföldi hospitalizációhoz köthető, rámutatva a terjedésben a helyi, autochton átvitel jelentőségére. **(XV)**
18. Elsőként írtuk le nagy törzsszám vizsgálatán alapulva a 16S aminoglikozid metiláz gének kiemelkedően gyakori előfordulását a régióban, azonosítva a

leggyakoribb típusokat (*armA*, *rmtC* és *rmtF*) és leírva az ezek regionális eloszlásában fellelhető különbségeket. (XV, XXVI, XXVIII)

19. Elsőként tanulmányoztuk a régióban a kettős karbapenemázt termelő törzsek tulajdonságait és bemutattuk, hogy azok kiugróan magas helyi prevalenciájának kialakulásában egyaránt szerepet játszik a géneket hordozó törzsek klonális terjedése, másrészt a kódoló plazmidok és mobilis genetikai elemek horizontális átvitele. (XXII)
20. Két, méretében a régióban egyedülálló tanulmányban írtuk le a helyi CRE törzsek jellegzetes antibiotikum rezisztencia mintáit megállapítva a globális összehasonlításban is magas kolisztin, ceftazidim-avibaktám rezisztencia szintet és a klinikai gyakorlatban még nem elterjedt aztreonám-avibaktám kombináció *in vitro* hatásosságát. Ugyanakkor elsőként mutattunk rá, hogy egyrészt az MBL termeléstől független ceftazidim-avibaktám rezisztencia, másrészt a ritka aztreonám-avibaktám rezisztencia elsősorban nem a CRE törzsek között domináló *K. pneumoniae*, hanem az *E. coli* törzsek között várható. (XXVI, XXVIII)
21. Az EAE-ban és a teljes régióban először, és globálisan is az elsők között végeztünk egy országot lefedő, molekuláris tipizáló vizsgálatot a CRE törzsek vonatkozásában és rámutattunk az egyes kórházak között fellelhető jelentős különbségek mellett a törzsek kórházak közötti átvitelének valószínűségére. (XXVIII)
22. Elsőként mutattuk ki, hogy az EAE-ban a CRE törzsek epidemiológiáját alapvetően három nagy *K. pneumoniae* klón (ST14, ST231 és ST147) jelenléte határozza meg, melyek, általában, de különösen a legnagyobb (ST14) szignifikánsan rezisztensebb, mint a sporadikus izolátumok, és melyek megtalálhatóak az ország legtöbb, az ST14 esetén gyakorlatilag minden nagy kórházában (XXIII, XXVIII)
23. Jóllehet, a rendelkezésünkre álló adatok alapján a jelenség okát nem tudtuk feltárni, elsőként igazoltuk, hogy az EAE-ban leggyakoribb, egyben legrezisztensebb klón (*K. pneumoniae* ST14) szignifikánsan gyakrabban fordul elő emirátusi betegekben, mint nem emirátusiakban (XXIII, XXVIII)
24. Igazoltuk, hogy Abu Dhabiban a jelenlegi súlyos CRE endémiás helyzet nem néhány klón robbanás szerű elterjedésével magyarázható, hanem azok már a járvány első éveitől jelen voltak és arányukat tekintve folyamatosan növekedtek, rámutatva, hogy a helyzet kialakulását vélhetően egy időben megkezdett és folyamatosan végzett molekuláris tipizáláson alapuló surveillance kedvezően befolyásolhatta volna (XXX)

25. A helyi *K. pneumoniae* ST14 izolátumok plazmidjainak és teljese genom szekvenciáinak vizsgálatával és az utóbbiak 173, a világ különböző pontjairól származó törzs genomjához történő hasonlításával igazoltuk
- a típus kiemelkedő képességét különféle antibiotikum rezisztenciát kódoló plazmidok felvételére
  - hogy a típuson belül a feltehetően újlag terjedő, az EAE-ban a korábbi KL2 toktípust fokozatosan kiszorító KL64-es törzsek az izolálás földrajzi helyétől függetlenül összefüggő csoportot alkotnak **(XXVII)**
26. Igazoltuk, hogy Kuvaitban a magas VIM prevalencia oka elsősorban egy, a *bla<sub>VIM</sub>* gént hordozó Inca/C típusú plazmid, illetve részben egy, a gént tartalmazó In416 integron faji határokat átlépő terjedése volt.
27. Elsőként írtuk le az Arab-félsziget országaiban *mcr* gén jelenlétét kolisztin rezisztens törzsekben és adtuk az azokat hordozó plazmidok részletes szerkezeti leírását. **(XVI, XVIII)**
28. Igazoltuk, hogy bár a régióban humán izolátumokban megtalálhatóak az *mcr* gének, a *K. pneumoniae* CRE törzsek magas arányú kolisztin rezisztenciájáért elsősorban néhány kormoszómális gén mutációi a felelősek **(XXIII, XXVI-XXVIII)**
29. Igazoltuk, hogy az első EAE-béli panrezisztens *K. pneumoniae* járványt okozó törzsben talált *mcrB::bla<sub>OXA-181</sub>* inzerció kolisztin rezisztenciát okoz, és egyszersmind funkcionális karbapenemáz gént tartalmaz. A törzsek részletes molekuláris vizsgálata révén felvetettük a törzs nemzetközi terjedésének lehetőségét. **(XIX)**
30. Elsőként igazoltuk, hogy szemben a régió béli humán eredetű CRE törzsekben megfigyelt ritkaságukkal, az itt tenyésztett brojlercsirkékben az *mcr-1* gént hordozó törzsek és plazmidok elterjedtek és a törzsek rendkívül nagy változatosságot mutatnak. **(XXIX)**



## 6. A DOKTORI MŰ ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

(levezető szerző)

- I. **Sonnevend, Á.**, Al-Dhaheeri, K., Mag, T., Herpay, M., Kolodziejek J, Nowotny, N., Usmani, A., Sheikh, A.F., Pál, T.: 2006. CTX-M-15-producing multi-drug resistant enteroaggregative *Escherichia coli* in the United Arab Emirates. *Clin Microbiol Infect*, **12**:582-585 (Q1, IF: 3.254)
- II. Jumaa, P.A., **Sonnevend, Á.**, Pál, T., El Hag, M., Amith, R., Trad, O.: 2006. The molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia in a tertiary referral hospital in the United Arab Emirates 2000-2004 *Annals of Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2006, **5**:32-37. (Q1)
- III. Rotimi, V.O., Jamal, W., Pál, T., **Sonnevend, Á.**, Dimitrov, T.S., Albert, M.J. 2008. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella* spp. and isolates with reduced susceptibility to ciprofloxacin in Kuwait and the United Arab Emirates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **60**:71-7. (D1, IF: 2.553)
- IV. Rotimi, V.O., Jamal, W., Pál, T., **Sonnevend, Á.**, Dimitrov, T.S., Albert, M.J. 2008. Emergence of CTX-M-15 type ESBL producing *Salmonella* spp. in Kuwait and the United Arab Emirates. *J Med Microbiol* **57**:881-886 (Q1, IF: 2,18)
- V. Jamal, W., Rotimi, V.O., Pál, T., **Sonnevend, Á.**, Dimitrov, T.S.: 2010. Comparative in vitro activity of tigecycline and other antimicrobial agents against *Shigella* species from Kuwait and the United Arab of Emirates. *J. Infect Public Health* **3**:35—42 (Q3)
- VI. Opazo, A., **Sonnevend, Á.**, Lopes, B., Hamouda, A., Ghazawi, A., Pál, T., Amyes, S.G.B. 2012. Plasmid-encoded PER-7 beta-lactamase responsible for ceftazidime resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated in the United Arab Emirates. *J Antimicrob Chemother* **67**:1619-22 (D1, IF: 5.068)
- VII. Tamma, P.D., Savard, P., Meeks, A., Lee, J.M., Pál, T., **Sonnevend, Á.**, Perl, T.M. Milstone, A.M. 2012. An outbreak of Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit. *Inf Control Hosp Epidemiol* **33**:631-634 (D1, IF: 3.669)
- VIII. Szijártó, V., Pál, T., Nagy, G., Nagy, E., Ghazawi, A., Al-Haj, M,m El Kurdi S., **Sonnevend Á.**: 2012. The rapidly emerging ESBL-producing *Escherichia coli* O25-ST131 clone carries LPS-core synthesis genes of the K-12 type. *FEMS Microb Lett*. **332**:131-136 (Q2, IF: 2.044)
- IX. Ghazawi, A., **Sonnevend, Á.**, Bonnin, R.A., Poiriel, L., Nordmann, P., Hashmey, R., Tizvi, T.A., Hamadeh, M.B., Pál, T. 2012. NDM-2 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in the United Arab Emirates *Clin Microbiol Infect* **18**:E34-6. (D1, IF: 4.54)
- X. **Sonnevend, Á.**, Ghazawi, A., Yahfoufi, N., Al-Baloushi, A., Hashmey, R., Mathew, M., Tariq, W., Pál, T. 2012. VIM-4 carbapenemase-producing

- Enterobacter cloacae* in the United Arab Emirates. *Clin Microbiol Infect* **18**:E494-6 (D1, IF: 4.54)
- XI. **Sonnevend, Á.**, Ghazawi, A., Al Munthari, N., Pitout, M., Hamadeh, M.B., Hashmey, R., Girgis, S., Sheikh, F.A., Al Haj, M., Nagelkerke, N., Pál, T. 2013. Characteristics of epidemic and sporadic strains of *Acinetobacter baumannii* isolated in Abu Dhabi hospitals. *J Med Microbiol.* **62**:582-590 (Q1, IF: 2.502)
- XII. **Sonnevend, Á.**, Al Baloushi, A., Ghazawi, A., Hashmey, R., Girgis, S., Hamadeh, M.B., Al Haj, M., Pál, T. 2013. Emergence and spread of NDM-1 producer *Enterobacteriaceae* with contribution of IncX3 plasmids in the United Arab Emirates. *J Med Microbiol.* **62**:1044-1050 (Q1, IF: 2.502)
- XIII. Dash, N., Panigrahi, D., Al Zarouni, M., Darwish, D., Ghazawi, A., **Sonnevend, Á.**, Pál, T., Yasin, F., Al Hadi, S. 2014. High Incidence of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Sharjah, United Arab Emirates. *Microb Drug Res.* **20**:52-56 (Q1, IF: 2.490)
- XIV. **Sonnevend, Á.**, Ghazawi, A., Darwish, D., AlDeesi, Z., Kadhum, A.F., Pál, T. 2015. Characterization of KPC-type carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in the Arabian Peninsula. *J Antimicrob Chemother.* **70**:1592-3 (D1, F: 4.919)
- XV. **Sonnevend, Á.**, Ghazawi, A., Hashmey, R., Jamal, W., Rotimi, W.O., Shibl, A., Al-Jardani, A., Al-Abri, S.S., Tariq, W.U.Z., Weber, S., Pál, T. 2015. Characterization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* with high rate of autochthonous transmission in the Arabian Peninsula *PLOS One*, **10(6)**: e0131372. ( Q1, IF:3.057)
- XVI. **Sonnevend, Á.**, Ghazawi, A., Alqahtani, M., Shibl, A., Jamal, W., Hashmey, R., Pál, T.: 2016. Plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* from the Arabian Peninsula. *Int J Inf Dis.* **50**:85-90 (Q1, IF: 2.532)
- XVII. Pál, T., Ghazawi, A., Darwish, D., Villa, L., Carattoli, A., Hashmey, A., Aldeesi, Z., Jamal, W., Rotimi, V., Al-Jardani, A., Al-Abri, S., **Sonnevend, Á.** 2017. Characterization of NDM-7 Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolates in the Arabian Peninsula *Microbiol Drug Res* **23(7)**:871-878 (Q1, IF: 2.306)
- XVIII. Mohsin, J., Pál, T., Petersen, J.E., Darwish, D., Ghazawi, A., Ashraf, T., **Sonnevend, Á.** 2018. Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-1* in an *Escherichia coli* ST10 Bloodstream Isolate in the Sultanate of Oman. *Microbiol Drug Res* **24(3)**:278-282. (Q1, IF: 2.306)
- XIX. **Sonnevend, Á.**, Ghazawi, A., Hashmey, R., Haidermota, A., Girgis, S., Alfaresi, M., Omar, M., Paterson, D.L., Zowawi, H.M., Pál, T. 2017. Multi-hospital occurrence of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST147 with an ISEcp1-directed *bla*<sub>OXA-181</sub> insertion into the *mgrB* gene in the United Arab Emirates *Antimicrob Agents Chemother* **61**:e00418-17. (D1, IF: 4.302)
- XX. **Sonnevend, Á.**, Yahfoufi, N., Ghazawi, A., Jamal, W., Rotimi, V., Pál, T. 2017. Contribution of horizontal gene transfer to the emergence of VIM-4

- carbapenemase producer *Enterobacteriaceae* in Kuwait *Infect Drug Res.* **10**:469-478 (D1, IF: 3.779)
- XXI.** Mutti, M., **Sonnevend, Á.**, Pál, T., Junttila, S., Ekker, H., Galik, B., Gyenesei, A., Nagy, G., Nagy, E., and Szijártó, V. 2018. Complete genome sequence of *Escherichia coli* 81009, a representative of the sequence type 131 C1-M27 clade with multi-drug resistance phenotype. *Genome* **6(8)**:e00056-18. (Q3)
- XXII.** Al-Baloushi, A.E., Pál, T., Ghazawi, A., **Sonnevend Á.** 2017. Genetic support of carbapenemases in double carbapenemase producer *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Arabian Peninsula *Acta Microbiol hung* **65(2)**:135-150 (Q3, IF:0.921)
- XXIII.** Moubareck, C.A., Mouftah, A.F., Pál, T., Ghazawi, A., Halat, D.H., Nabi, A., AlSharhan, M.A., AlDeesi, Z.O., Peters, C.C., Celioglu, H., Sannegowda, M., Sarkis, D.K., **Sonnevend, Á.** 2018. Clonal emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST14 co-producing OXA-48-type and NDM carbapenemases with high rate of colistin resistance in Dubai, United Arab Emirates. *Int. J. Antimicrob Agents.* **52(1)**:90-95 (D1, IF: 4.307)
- XXIV.** Moufthah, S.F., Pál, T., Drawish, D., Ghazawi, A., Villa, L., Carattoli, A., **Sonnevend, Á.** 2019. Epidemic IncX3 plasmids spreading carbapenemase genes in the United Arab Emirates and worldwide. *Infect Drug Res* **12**:1729–1742 (Q1, IF: 3.443)
- XXV.** Al-Hamad, A., Pál, T., Leskafi, H., Abbas, H., Hejles, H., Alsubikhy, F., Darwish, D., Ghazawi, A., **Sonnevend, Á.** 2020 Molecular characterization of clinical and environmental carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a hospital of the Eastern Region of Saudi Arabia. *J Infect Publ Health* **13(4)**:632-636 (Q1, IF: 2.487)
- XXVI.** **Sonnevend, Á.**, Ghazawi, A., Darwish, D., Barathan, G., Hashmey, R., Ashraf, Tanveer, A., Rizvi, T., Pál, T. 2020 In vitro efficacy of ceftazidime-avibactam, aztreonam-avibactam and other rescue antibiotics against carbapenem resistant *Enterobacteriales* from the Arabian Peninsula. *Int J Inf Dis* **99**:253-259 (Q1, IF: 3.202)
- XXVII.** Mouftah, S.F., Pál, T., Higgins, P.G., Ghazawi, A., Idaghdour, Y., Alqahtani, M., Omrani, A.S., Rizvi, T.A., **Sonnevend, Á.** 2021. Diversity of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* ST14 and emergence of a subgroup with KL64 capsular locus in the Arabian Peninsula. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04384-2> (Q1, IF: 5.103)
- XXVIII.** **Sonnevend, Á.**, Abdulrazzaq. N., Ghazawi, A., Thomsen, J., Bharathan, G., Makszin, L., Rizvi, T.A., Pál, T. 2022. The first nation-wide surveillance of carbapenem resistant Enterobacteriales in the United Arab Emirates – increased association of *Klebsiella pneumoniae* CC14 clone with Emirati patients *Int J Infect Dis* – **120**:103–112 (D1, IF: 8.4)
- XXIX.** **Sonnevend, Á.**, Alali, W.Q., Mahmoud, S.A., Ghazawi, A., Bharathan, G., Melegh, Sz., Rizvi, T.A., Pál, T. 2022. Molecular Characterization of MCR-

- 1 Producing *Enterobacterales* Isolated in Poultry Farms in the United Arab Emirates *Antibiotics (Basel)* **11(3)**: 305. (Q1, IF: 4.8)
- XXX.** Pál, T., Butt, A.B., Ghazawi, A., Thomsen, J., Rizvi, T.A., **Sonnevend, Á.** 2022. Early Years of Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* Epidemic in Abu Dhabi *Antibiotics (Basel)* 2022 **11(10)**: 1435 (Q1, IF: 4.8)

## 7. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

### **A PhD DISSZERTÁCIÓBAN FELDOLGOZOTT KÖZLEMÉNYEK**

1. Suerbaum S, Lohrengel M, **Sonnevend A**, Ruberg F, Beuerle B, Kist M. 2001. Allelic diversity and recombination in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* **183**:2553-2559
2. **Sonnevend A**, Pál T. 2006. Heterogeneity of non-serotypable *Campylobacter jejuni* isolates *Acta Microbiol. Immunol. Hun.* **53**:171-181
3. **Sonnevend A**, Rotimi VO, Kolodziejek J, Usmani A, Nowotny N, Pál T. 2006. High level of ciprofloxacin resistance and its molecular background among *Campylobacter jejuni* strains isolated in the United Arab Emirates. *J Med Microbiol.* **55**:1533-8.

### **EGYÉB KÖZLEMÉNYEK**

1. Conlon JM, **Sonnevend A**, Patel M, Camasamudram V, Nowotny N, Zilahi E, Iwamuro S, Nielsen PF, Pal T. 2003. A melittin-related peptide from the skin of the Japanese frog, *Rana tagoi*, with antimicrobial and cytolytic properties. *Biochem Biophys Res Commun.* **306**:496-500.
2. Conlon JM, **Sonnevend A**, Patel M, Davidson C, Nielsen PF, Pal T, Rollins-Smith LA. 2003. Isolation of peptides of the brevinin-1 family with potent candidacidal activity from the skin secretions of the frog *Rana boylii*. *J Pept Res.* **62**:207-13.
3. **Sonnevend A**, Knoop FC, Patel M, Pal T, Soto AM, Conlon JM. 2004. Antimicrobial properties of the frog skin peptide, ranatuerin-1 and its [Lys-8]-substituted analog. *Peptides* **25**:29-36.
4. Conlon JM, **Sonnevend A**, Patel M, Al-Dhaheeri K, Nielsen PF, Kolodziejek J, Nowotny N, Iwamuro S, Pal T. 2004. A family of brevinin-2 peptides with potent activity against *Pseudomonas aeruginosa* from the skin of the Hokkaido frog, *Rana pirica*. *Regul Pept.* **118**:135-41.
5. Conlon JM, **Sonnevend A**, Davidson C, Smith DD, Nielsen PF. 2004. The ascaphins: a family of antimicrobial peptides from the skin secretions of the most primitive extant frog, *Ascaphus truei*. *Biochem Biophys Res Commun.* **320**:170-5.
6. Bevier CR, **Sonnevend A**, Kolodziejek J, Nowotny N, Nielsen PF, Conlon JM. 2004. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the mink frog (*Rana septentrionalis*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **139**:31-8.
7. Conlon JM, **Sonnevend A**, Davidson C, Demandt A, Jouenne T. 2005. Host-defense peptides isolated from the skin secretions of the Northern red-legged frog *Rana aurora aurora*. *Dev Comp Immunol.* **29**:83-90.

8. Rollins-Smith LA, King JD, Nielsen PF, **Sonnevend A**, Conlon JM. 2005. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura:Leptodactylidae). *Regul Pept.* **124**:173-8.
9. Conlon JM, **Sonnevend A**, Jouenne T, Coquet L, Cosquer D, Vaudry H, Iwamuro S. 2005. A family of acyclic brevinin-1 peptides from the skin of the Ryukyu brown frog *Rana okinavana*. *Peptides* **26**:285-90.
10. Kerényi, M., Allison, H.E., Bártai, I., Sonnevend, A, Emődy, L., Plavetzczy, N., Pál, T. 2005. Occurrence of *hlyA* and *sheA* genes in extraintestinal *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol.* **43**:2965-8.
11. Pál, T, Sonnevend, A, Galadari, S., and Conlon, J.M. 2005. Design of potent, non-toxic antimicrobial agents based upon the structure of the frog skin peptide, pseudin-2. *Regul Pept.* **129**:85-91.
12. Szabó, E., Skedsmo, A., Sonnevend. Á., Al-Dhaferi, K., Emődy, L., Usmani, A., Pál, T. 2005. Curli expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* *Folia Microbiologica* **50**:40-6.
13. Conlon JM, Abraham B, Galadari S, Knoop FC, **Sonnevend A**, Pal T. 2005. Antimicrobial and cytolytic properties of the frog skin peptide, kassinatuerin-1 and its l- and d-lysine-substituted derivatives. *Peptides.* **26**:2104-10.
14. Conlon JM, Abraham B, **Sonnevend A**, Jouenne T, Cosette P, Leprince J, Vaudry H, Bevier CR. 2005. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the skin secretions of the carpenter frog *Rana virgatipes* (*Ranidae, Aquarana*) *Regul Pept.* **131**:38-45.
15. King JD, Al-Ghaferi, Abraham B, **Sonnevend A**, Leprince J, Nielsen PF, Conlon JM. 2005. Pentadactylin: an antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **141**:393-7.
16. **Sonnevend A**, Czirók É, Pál T. 2005. Yersinia Yop-specific IgA antibodies in Hungarian blood donors *Folia Microbiologica* **50**:269-272
17. Conlon JM, Al-Ghaferi N, Abraham B, **Sonnevend A**, Coquet L, Leprince J, Jouenne T, Vaudry H, Iwamuro S. 2006. Antimicrobial peptides from the skin of the *Tsushima* brown frog *Rana tsushimensis*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **143**:42-49
18. Pál T, Abraham B, **Sonnevend A**, Jumaa P and Conlon JM. 2006. Brevinin-1BYa: a naturally occurring peptide from frog skin with broad spectrum anti-bacterial and anti-fungal properties. *Int.J.Antimicrob.Agents* **27**:525-529
19. Conlon JM, Al-Ghaferi N, Abraham B, **Sonnevend A**, King JD, Nielsen PF. 2006. Purification and properties of laticeptin, an antimicrobial peptide from skin secretions of the Santa Fe frog *Leptodactylus laticeps* . *Protein and Peptide Letters* **13**:355-359.
20. Urban E, Nagy E, Pal T, **Sonnevend A**, Conlon JM. 2007. 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.* **29**:317-21.

21. Conlon JM, **Sonnevend A**. 2010. Antimicrobial peptides in frog skin secretions. *Methods Mol Biol.* **618**:3-14.
22. Conlon JM, Ahmed E, Pal T, **Sonnevend A**. 2010. Potent and rapid bactericidal action of alyteserin-1c and its [E4K] analog against multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Peptides.* **31**:1806-10.
23. Hossain MA, Guilhaudis L, **Sonnevend A**, Attoub S, van Lierop BJ, Robinson AJ, Wade JD, Conlon JM. 2011. Synthesis, conformational analysis and biological properties of a dicarba derivative of the antimicrobial peptide, brevinin-1BYa. *Eur Biophys J.* **40**:555-64.
24. Conlon JM, **Sonnevend A**. 2011. Clinical applications of amphibian antimicrobial peptides *J Medical Sciences* **4**:40-46
25. **Sonnevend A**, Kovács J, Pál T, Akawi N, Nagelkerke N, Schneider G. 2011. Lack of correlation between the C257-to-T mutation in the *gyrA* gene and clinical severity of *Campylobacter jejuni* infection in a region of high incidence of ciprofloxacin resistance *Scand J Infect Dis.* **43**:905-11.
26. **Sonnevend A**, Blair I, Alkaabi M, Jumaa P, al Haj M, Ghazawi A, Akawi N, Jouhar FS, Hamadeh MB, Pál T. 2012. The change in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones at a tertiary care hospital in the United Arab Emirates over a five-year period *J Clinical Pathology* **65**:178-82
27. Conlon JM, **Sonnevend A**, Pal T, Vila-Fares X. 2012. Efficacy of six frog skin-derived antimicrobial peptides against colistin-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agent* **39**:317-20.
28. Conlon JM, Mechkarska M, Arafat K, Attoub S, **Sonnevend A**. 2012. Analogues of the frog skin peptide alyteserin-2a with enhanced antimicrobial activities *J Pept Science* **18**(4):270-5.
29. Conlon JM, Mechkarska M, Prajeep M, **Sonnevend A**, Coquet L, Leprince J, Jouenne T, Vaudry H, King JD. 2012. Host-defense peptides in skin secretions of the tetraploid frog *Silurana epittropicalis* with potent activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) *Peptides* **37**:113-9.
30. Attoub S, Mechkarska M, **Sonnevend A**, Radosavljevic G, Jovanovic I, Lukic ML, Conlon JM. 2013. Esculentin-2CHa: a host-defense peptide with differential cytotoxicity against bacteria, erythrocytes and tumor cells *Peptides* **39**:95-102.
31. Mechkarska M, Prajeep M, Radosavljevic GD, Jovanovic IP, Al-Baloushi A, **Sonnevend A**, Lukic ML, Conlon JM. 2013. An analog of the host-defense peptide hymenochirin-1B with potent broad-spectrum activity against multidrug-resistant bacteria and immunomodulatory properties *Peptides* **50**:153-9.
32. Stulik L, Malafa S, Hudcova J, Rouha H, Henics BZ, Craven DE, **Sonnevend A**, Nagy E. 2014.  $\alpha$ -Hemolysin Activity of Methicillin-Susceptible *S. aureus* Predicts Ventilator-Associated Pneumonia. *Am J Resp Critical Care Medicine* **190**:1139-48.

33. Guachalla LM, Ramoni K, Varga C, Mutti M, Ghazawi A, Pál T, Nagy E, **Sonnevend Á**, Nagy G, Szijártó V. 2018. Retained activity of an O25b specific monoclonal antibody against Mcr-1 producing *Escherichia coli* ST13. *Antimicrob Agents Chemother.* **62(7)**. pii: e00046-18
34. Al Alkeem F, Loney T, Aziz F, Blair I, **Sonnevend Á**, Sheek-Hussein M. 2019. Prevalence and factors associated with infectious intestinal diseases in Ras Al Khaimah, United Arab Emirates, 2017: A population-based cross-sectional study *Int J Infect Dis* **85**:188-194.
35. Mutuku C, Melegh S, Kovacs K, Urban P, Virág E, Heninger R, Herczeg R, **Sonnevend Á**, Gyenesei A, Fekete C, Gazdag Z. 2022. Characterization of  $\beta$ -Lactamases and Multidrug Resistance Mechanisms in *Enterobacterales* from Hospital Effluents and Wastewater Treatment Plant. *Antibiotics* (Basel). **11(6)**:776. doi:10.3390/antibiotics11060776. PMID: 35740182
36. Kovács K, Nyul A, Lutz Z, Mestyán G, Gajdács M, Urbán E, **Sonnevend Á**. 2022. Incidence and Clinical Characteristics of Anaerobic Bacteremia at a University Hospital in Hungary: A 5-Year Retrospective Observational Study. *Antibiotics* (Basel). **11(10)**:1326. doi: 10.3390/antibiotics11101326. PMID:36289984



## 8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban is hálás köszönetem Dr. Czírók Évának, aki a klinikai mikrobiológián túl elindított kutatói pályámon.

Mélységesen hálás vagyok Prof. Miodrag Lukic-nak, aki munkatársnak alkalmazott az Egyesült Arab Emírátságok Egyetemén. Az ő kezdeti támogatása elengedhetetlen volt a dolgozathoz vezető kutatásokhoz.

Köszönöm az emírátsági, kuvaiti, ománi, bahreini és szaúd-arábiai, valamint a bécsi, baltimore-i, római, kölni, firenzei, edinbourgh-i, pécsi és budapesti kutató és klinikus kollégáknak: Prof. Michael Conlon-nak, Prof. Norbert Nowotny-nak, Dr. Pauline Jumaa-nak, Dr. Martin Pitout-nak, Dr. Rayhan Hashmey-nak, Dr. Jens Thompsen-nak, Dr. Stefan Weber-nak, Dr. Nihar Dash-nak, Dr. Najiba Abdulrazack-nak, Dr. Carole A. Moubareck-nak, Dr. Youssef Idaghhdour-nak, Prof. Wafaa Jamal-nak, Prof. Vincent Rotimi-nak, Prof. Manaf Al-Qahtani-nak, Dr. Jalila Mohsin-nak, Dr. Seif Al-Abri-nak, Prof. Eskild Petersen-nak, Prof. Atef Shibl-nak, Dr. Arif Al-Hamad-nak, Dr. Ali Omrani-nak, Dr. Szijártó Valériának, Dr. Nagy Gábornak, Dr. Pranita Tamma-nak, Prof. Alessandra Carattoli-nak, Prof. Gian Maria Rossolini-nak, Dr. Paul Higgins-nak, Dr. Andres Opazo-nak, Prof. Sebastian Amyes-nak, Dr. Melegh Szilviának, Dr. Herpay Máriának és Dr. Mag Tündének a közös munka lehetőségét.

Nagy hálával tartozom Dr. Akela Ghazawi-nak a laboratóriumi munkában nyújtott rengeteg technikai segítségéért. Köszönet Mohammed Al-Hajnak laboratóriumi munkájáért. Hálás köszönetem Prof. Farah Mustafá-nak és Prof. Tahir Rizvi-nak a molekuláris biológiai munkákban adott észrevételeikért, tanácsaikért. Köszönettel tartozom emírátsági MSc és PhD hallgatóimnak, Somaya M. Farag-nak, Dania Darvich-nak, Sara M. Ali-nak, Noura Al-Zarouni-nak, Amna Al-Baloushi-nak és Shaimaa F. Mouftah-nak a kísérletekbe fektetett energiáért és figyelemért.

Hálásan köszönöm a PTE Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet Bakteriológiai és Kórházhigiénés Laboratóriumában dolgozó minden munkatársamnak, valamint jelenlegi PhD hallgatóimnak a dolgozat írása alatt mutatott türelmüket, segítségüket és megértésüket.

Köszönöm az Egyesült Arab Emírátságok Egyetemének, az Egyetem Orvoskarának, a UAE National Research Foundation-nak, a Terry Fox Foundation-nak, és az MSD, Pfizer és Becton Dickinson cégeknek, illetve a PTE ÁOK Kispál Gyula ösztöndíjának, hogy munkámat vezető, illetve társkutatóként támogatták.

Nem lehetek elég hálás családomnak: édesanyámnak és édesapámnak, testvéremnek és családjának, gyermekeimnek, Borbálának, ifjabb Tibornak és az ő

családjának, hogy az évek során elfogadták távollétemet, a munkára - és nem rájuk - fordított energiámat, így módon járulva hozzá a dolgozat létrejöttéhez.

Végül, de nem utolsósorban, mérhetetlenül hálás vagyok férjemnek, Tibornak, aki mind a kutatómunkában, mind a magánéletben társként segített, akinek soha nem szűnő biztatása, esetenként nógatása nélkül sem kutatóvá nem váltam volna, sem ez az értekezés, vagy az alapjául szolgáló közlemények nem születtek volna meg.