

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Kocsiné Franyó Dorottya

**Vancomycin-rezisztens Enterococcusok
molekuláris biológiai vizsgálata**

DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Vancomycin-rezisztens Enterococcusok
molekuláris biológiai vizsgálata**

Kocsiné Franyó Dorottya

Témavezető: Dr. Dombrádi Zsuzsanna Rita



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2019

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. BEVEZETÉS	7
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
3.1. Az Enterococcus genus.....	9
3.2. Az enterococcusok jellemzői.....	11
3.3. Enterococcusok antibiotikum rezisztenciája	13
3.3.1. β -laktám rezisztencia	13
3.3.2. Glikopeptid rezisztencia.....	14
3.3.2.1. Természetes rezisztencia	16
3.3.2.2. Szerzett rezisztencia	16
3.4. Vancomycin-rezisztens enterococcus (VRE) törzsek előfordulása	19
3.4.1. VRE epidemiológiája.....	19
3.4.2. VRE hordozása	21
3.5. Enterococcusok virulencia faktorai	21
4. CÉLKITŰZÉSEK	24
5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	25
5.1. Anyagok.....	25
5.1.1. Tápoldatok, táptalajok.....	25
5.1.2. Vegyszerek, enzimek, kitek	26
5.1.3. PCR primerek.....	26
5.1.4. Baktérium törzsek	28
5.2. Módszerek	28
5.2.1. Vancomycin-rezisztens enterococcusok azonosítása klinikai mintákból	28
5.2.2. Vancomycin-rezisztens enterococcusok azonosítása széklet mintákból	29
5.2.3. MALDI-TOF MS	29
5.2.4. Antibiotikum érzékenység meghatározása.....	30
5.2.5. Molekuláris biológiai vizsgálatok.....	32
5.2.6. Biofilmképzés vizsgálata	35
5.2.7. Epidemiológiai tipizálási módszerek	36

5.2.8. Epidemiológiai adatok elemzése.....	38
5.2.9. Esp és biofilmképzés közötti kapcsolat elemzése.....	39
6. EREDMÉNYEK	40
6.1. Klinikai mintákból származó VRE törzsek jellemzése	40
6.1.1. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredményei	41
6.1.2. Vancomycin-rezisztencia gének illetve virulencia faktorok kimutatása.....	42
6.1.3. Biofilmképzés	44
6.1.4. Epidemiológiai vizsgálatok eredményei	46
6.2. Székletből izolált VRE törzsek jellemzése	48
6.2.1. Enterococcus törzsek azonosítása, antibiotikum rezisztenciája	49
6.2.2. VRE törzset hordozó betegek epidemiológiai jellemzői.....	50
6.2.3. Szűrőmódszerek jellemzése	52
7. MEGBESZÉLÉS	54
8. ÖSSZEFOGLALÁS	62
9. SUMMARY	64
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	66
11. TÁRGYSZAVAK-KEYWORDS	91
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	92
13. FÜGGELÉK.....	93

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ace- collagen adhesine gene (kollagén-kötő gén)

agg- aggregation substance gene (aggregációs protein gén)

ATCC- American Type Culture Collection (amerikai törzstípus gyűjtemény)

bp- bázispár

CDC- Centers for Disease Control and Prevention (Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ)

CSF- cerebrospinal fluid (cerebrospinális folyadék)

CFU- colony forming unit (telepképző egység)

ddl- D-alanin-D-alanin ligáz

DNS- deoxiribonukleinsav

ECDC- European Centre for Disease Prevention and Control (Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ)

esp- enterococcal surface protein gene (enterococcus felszíni fehérje gén)

EUCAST- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Antimikrobiális Rezisztencia Vizsgálatok Európai Bizottsága)

LAP- leucin-aminopeptidáz

MALDI-TOF MS- Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (Mátrix által segített lézer deszorpción és ionizáción alapuló-repülési idő tömegspektrometria)

MIC- minimal inhibitory concentration (minimális gátló koncentráció)

MLST- Multilocus sequence typing (multilókusz szekvencia tipizálás)

MRSA- methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*

OD- optikai denzitás

PBP-penicillin binding protein (penicillinkötő fehérje)

PCR- polimerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

PFGE- Pulsed-field Gel Electrophoresis (pulzáló erőterű gélelektroforézis)

PYR- pirrolidonil-arilamidáz

rRNS- riboszomális ribonukleinsav

VRE- vancomycin-rezisztens *Enterococcus*

VRE_{fm}- vancomycin rezisztens *Enterococcus faecium*

2. BEVEZETÉS

Az antibiotikumokat először az 1940-es években kezdték a különféle fertőzések kezelésére alkalmazni. Azóta milliók életét mentették meg és a modern orvostudomány által használt leggyakoribb terápiás szerek lettek. Az elmúlt 70 évben azonban a baktériumok megmutatták azon tulajdonságukat, hogy képesek ellenállni akár már minden kifejlesztett antimikróbás szerrel szemben. Napjaink egyik legsúlyosabb közegészségügyi problémája a különböző antibiotikumokkal szemben rezisztens törzsek által okozott infekciók egyre gyakoribb előfordulása. A CDC (Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ) becslése szerint az Egyesült Államokban évente több mint kétmillió ember betegszik meg valamilyen rezisztens törzs miatt, melyet sajnos körülbelül 23 ezren nem is élnek túl (CDC, 2013). A súlyos, nozokomiális fertőzéseket okozó kórokozók között egyre nagyobb arányban jelennek meg az egyszerre több antibiotikumnak is ellenálló úgynevezett multirezisztens törzsek.

A normál bélflóra részét képező enterococcusok számos betegséget okozhatnak, különösen véráram fertőzéseket, sebfertőzéseket, valamint húgyúti infekciókat. Klinikai szempontból releváns fajok az *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus raffinosus*, *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus hirae*. Az enterococcusok közül a vancomycinnel szemben rezisztenciát mutató törzsek (VRE) a terápiás lehetőségek szűkössége miatt a legveszélyesebbek, az enterococcusok által okozott nozokomiális fertőzések kb. 30%-áért tehetők felelőssé. A CDC adatai alapján a VRE fertőzések 77%-át *E. faecium*, 9%-át pedig *E. faecalis* okozza (CDC, 2013). A VRE *faecium* (VRE_{fm}) növekvő előfordulása hazánkban is aggodalomra ad okot. Az ECDC (Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ) legfrissebb statisztikája alapján, Magyarországon 2011 óta figyelhető meg a VRE_{fm} törzsek folyamatos előretörése: 0,8%-ról - 39,5%-ra nőtt az arányuk invazív mintákból származó izolátumok körében 2011-2018 között (ECDC, 2018).

Ebben a helyzetben egyre fontosabb szerepet tölt be a rezisztens baktériumok megfigyelése/ellenőrzése. A törzsek előfordulásának felmérése, a lehetséges rezervoárok felkutatása és a folyamatos monitorozás elengedhetetlen a megfelelő empirikus antibiotikum terápia kiválasztásához. Munkámmal ehhez a területhez szerettem volna hozzájárulni az Orvosi

Mikrobiológiai Intézet Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumában a vancomycin-rezisztens enterococcusok vizsgálatával. Molekuláris biológiai és epidemiológiai módszerek segítségével kívántuk felmérni a VRE jelenlegi előfordulását a klinikai mintákból, meghatározni a törzsek rezisztenciáját, virulenciáját valamint rokonsági kapcsolatukat. A megnövekedett számú fertőzések egyik lehetséges okaként feltételeztük a VRE törzsek székletben történő hordozását, ezért vizsgálatainkat széklet mintákból is elvégeztük, illetve meghatároztuk a hordozást elősegítő rizikó tényezőket.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Az *Enterococcus* genus

Az enterococcus első említése 1899-ben a Thiercelin által írt publikációban jelent meg, aki egy új Gram-pozitív coccusként írta le (Thiercelin, 1899). 1906-ban azonban Andrew-es és Horder Thiercelin „enterococcusát” átnevezték *Streptococcus faecalis*-nak, azon képessége alapján, hogy rövid vagy hosszú láncok kialakítására képes (Andrews és Horder, 1906). Az enterococcusok története nem választható el a *Streptococcus* nemzetségtől. Az ezt követő három évtizedben elkezdődött ezeknek az ember beleiből származó Gram-pozitív baktériumoknak az intenzív tanulmányozása. Összefüggésbe hozták endocarditissel, seb és húgyúti fertőzésekkel, újszülöttkori szepszissel, illetve ételmérgezéssel is. A különböző szerzők egyre gyakrabban kezdték használni a *Streptococcus faecalis* nevet (Murray, 1990).

A streptococcusok (és enterococcusok) azonosítása és csoportosítása a Lancefield által 1933-ban bevezetett szerológiai csoportosításon alapul. Ebben a rendszerezésben a törzseket a sejtfalukban található C-poliszacharid alapján A-tól W-ig jelölve különböző szerocsoportokba soroljuk. Azok a törzsek, melyek nem rendelkeznek C-poliszachariddal, ebbe a csoportosításba nem vonhatóak be. A Lancefield D-antigén teichosavat tartalmaz, mely az enterococcusokat jellemzi, ez alapján a törzseket D-csoportú streptococcusként jelölték (Lancefield, 1933). 1970-ben Kalina egy új nemzetséget javasolt *Enterococcus* névvel, mely magába foglalta a *Streptococcus faecalis* és *Streptococcus faecium* fajokat. A nemzetséget azonban addig nem fogadták el, amíg a genetikai bizonyítékok teljes mértékben meg nem különböztették az enterococcusokat a streptococcusoktól (Schliefer és Killper-Baltz, 1984). Jelenleg a DNS-DNS, a DNS-rRNS hibridizáció (Garvie és Farrow, 1981; Kilpper-Balz és Schleifer, 1981, 1984; Kilpper-Balz és mtsai. 1982; Schleifer és Kilpper-Balz, 1984; Schleifer és mtsai. 1985) és a 16S rRNS szekvenálási (Ludwig és mtsai, 1985) vizsgálatok alapján az *Enterococcus* nemzetségbe 55 különböző faj és 2 alfaj sorolható (1. Táblázat).

1. Táblázat: *Enterococcus* nemzetségbe tartozó fajok; *bactero.net*

Faj	Leírás éve	Referencia
<i>Enterococcus faecalis</i>	1984	Schliefer és Killper-Baltz 1984
<i>E. faecium</i>	1984	Schliefer és Killper-Baltz 1984
<i>E. avium</i>	1984	Collins és mtsai. 1984
<i>E. casseliflavus</i>	1984	Collins és mtsai. 1984
<i>E. durans</i>	1984	Collins és mtsai. 1984
<i>E. gallinarium</i>	1984	Collins és mtsai. 1984
<i>E. malodoratus</i>	1984	Collins és mtsai. 1984
<i>E. hirae</i>	1985	Farrow és Collins 1985
<i>E. mundtii</i>	1986	Collins és mtsai. 1986
<i>E. raffinosus</i>	1989	Collins mtsai. 1989
<i>E. pseudoavium</i>	1989	Collins mtsai 1989
<i>E. cecorum</i>	1989	William mtsai.s 1989
<i>E. solitarius</i>	1989	Collins mtsai. 1989
<i>E. saccharolyticus</i>	1990	Rodrigues és Collins 1990
<i>E. dispar</i>	1991	Collins mtsai. 1991
<i>E. sulfureus</i>	1991	Martinez-Murcia és Collins 1991
<i>E. seriolicida</i>	1991	Kusuda és mtsai. 1991
<i>E. flavescens</i>	1992	Pompeiés mtsai.1992
<i>E. columbae</i>	1993	Devriese és mtsai.1993
<i>E. asini</i>	1998	de Vaux és mtsai.1998
<i>E. ratti</i>	2001	Teixeira és mtsai. 2001
<i>E. villorum</i>	2001	Vancanneyt és mtsai. 2001
<i>E. porcinus</i>	2001	Teixeira és mtsai. 2001
<i>E. moraviensis</i>	2001	Svec és mtsai. 2001
<i>E. haemoperoxidus</i>	2001	Svec és mtsai. 2001
<i>E. pallens</i>	2002	Tyrrell és mtsai. 2002
<i>E. gilvus</i>	2002	Tyrrell és mtsai. 2002
<i>E. phoeniculicola</i>	2003	Law-Brown és Meyers 2003
<i>E. canis</i>	2003	De Graef és mtsai. 2003
<i>E. saccharominimus</i>	2004	Vancanneyt és mtsai. 2004
<i>E. hermanniensis</i>	2004	Koort és mtsai. 2004

<i>E. italicus</i>	2004	Fortina és mtsai. 2004
<i>E. canintestini</i>	2005	Naser és mtsai. 2005
<i>E. aquimarinus</i>	2005	Švec és mtsai. 2005
<i>E. devriesei</i>	2005	Švec és mtsai. 2005
<i>E. caccae</i>	2006	Carvalho és mtsai. 2006
<i>E. termitis</i>	2006	Švec és mtsai. 2006
<i>E. silesiacus</i>	2006	Švec és mtsai. 2006
<i>E. camelliae</i>	2007	Sukontasing és mtsai. 2007
<i>E. thailandicus</i>	2008	Tanasupawat és mtsai. 2008
<i>E. viikkiensis</i>	2011	Rahkila és mtsai. 2011
<i>E. plantarum</i>	2012	Švec és mtsai. 2012
<i>E. quebecensis</i>	2012	Sistek és mtsai. 2012
<i>E. rivorum</i>	2012	Niemi és mtsai. 2012
<i>E. lactis</i>	2012	Morandi és mtsai. 2012
<i>E. ureasiticus</i>	2012	Sistek és mtsai. 2012
<i>E. alcedinis</i>	2013	Frolkov és mtsai. 2013
<i>E. rotai</i>	2013	Sedláček és mtsai. 2013
<i>E. saccharolyticus</i> subsp. <i>saccharolyticus</i>	2013	Chen és mtsai. 2013
<i>E. saccharolyticus</i> subsp. <i>taiwanensis</i>	2013	Chen és mtsai. 2013
<i>E. diestrammenae</i>	2013	Kim és mtsai. 2013
<i>E. ureilyticus</i>	2013	Sedláček és mtsai. 2013
<i>E. olivae</i>	2014	Lucena-Padrós és mtsai. 2014
<i>E. xiangfangensis</i>	2014	Li és mtsai. 2014
<i>E. bulliens</i>	2016	Kadri és mtsai. 2016
<i>E. saigonensis</i>	2016	Harada és mtsai. 2016
<i>E. crotali</i>	2017	McLaughlin és mtsai. 2017

3.2. Az enterococcusok jellemzői

Az enterococcusok kataláz negatívak, azonban esetenként az úgynevezett pszeudokataláz termelés következtében gyengén pozitív kataláz reakciót adhatnak. Egyesével, párokban vagy

rövid láncot formálva fordulhatnak elő. Az optimális növekedési hőmérsékletük 35°C, azonban a legtöbb törzs 10 °C - 45°C-on is képes szaporodni. Fakultatív anaerobok, valamint ellenállnak a magas sótartalomnak és pH-nak; így 6,5% -os NaCl jelenlétében 9,6-os pH-n szaporodnak. Az eszculint képesek hidrolizálni, 40% epe és Na-azid jelenlétében is növekednek. A legtöbb faj jól szaporodik lemezagaron, azonban izolálásukra inkább véres agart használunk. 1-2 mm nagyságú szürkés-fehér, csillogó telepeket képeznek. Néhány faj β -hemolízist mutat. Az *E. casseliflavus*, *E. mundtii* és az *E. sulfureus* sárga pigment termelésére képes, melyet akkor észlelhetünk, ha a tenyészetet kacsával vagy vattatamponnal megérintjük. Szelektív táptalajuk az epe-eszkulin-azid táptalaj, melyen az eszkulin hidrolízise következtében fekete színű telepeket képeznek. A legtöbb faj pirrolidonil-arilamidázt (PYR) termel, valamint az összes képes leucin-aminopeptidáz (LAP) előállítására. Egyes fajok pl. az *E. gallinarum* és az *E. casseliflavus* mozgékonyak (Teixeira és Facklam, 2003; Facklam és mtsai. 2002).

A fajok mannit- szorbóz, valamint arginin hidrolízis alapján 5 csoportba oszthatók (Facklam és mtsai. 2002):

Az **I. csoportba** tartozó *E. avium*, *E. malodoratus*, *E. raffinosus*, *E. pseudoavium*, *E. saccharolyticus*, *E. pallens* és *E. gilvus* savat képeznek mannitból és szorbózból, de nem hidrolizálják az arginint.

A **II. csoportba** tartozik az *E. faecalis*, az *E. faecium*, az *E. casseliflavus*, az *E. mundtii* és az *E. gallinarum*. Ez az öt faj savat képez a mannitból és bontja az arginint, de nem hidrolizálja a szorbózt.

A **III. csoportba** tartozik az *E. durans*, az *E. porcinus*, az *E. ratti*, az *E. hirae*, az *E. dispar*, és az *E. faecalis* és az *E. faecium* mannit-negatív variánsai.

A **IV. csoportba** tartoznak azok az enterococcusok melyek nem képeznek savat mannitból vagy szorbózból és nem hidrolizálják az arginint. Ezek az *E. asini*, *E. sulfureus* és *E. cecorum*.

Végül az **V. csoport** az *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* és *E. faecalis* törzseiből áll, amelyek nem hidrolizálják az arginint.

Ezt a csoportosítást a nemrégiben azonosított Enterococcus fajokra is kiterjesztették. Fontos azonban megjegyezni, hogy ezt a fenotípusos osztályozást meg kell különböztetni a 16S

rRNS szekvencia viszonytól, tehát bár ezek a tesztek potenciálisan hasznosak a diagnosztikában, nem tükrözik az *Enterococcus* fajok evolúciós kapcsolatát.

3.3. *Enterococcus*ok antibiotikum rezisztenciája

Az *enterococcus*ok számos szerrel szemben mutatnak természetes rezisztenciát, valamint képesek bizonyos antibiotikumokkal szemben szerzett rezisztenciára is szert tenni. A rezisztencia kialakulhat az antibiotikum kötőhelyet ért pontmutáció miatt pl. a kinolonok (Onodera és mtsai. 2002), illetve az ampicillin rezisztencia esetében, vagy különböző rezisztencia géneket szerezhettek meg, mely az aminoglikozidok, makrolidek, kloramfenikol, tetraciklin és glikopeptid rezisztencia esetében fordul elő. Klinikai szempontból azonban a legrelevánsabb a vancomycinnel szembeni rezisztencia (Moellering, 1990; Murray, 1990, Landman és Quale, 1997; Leclercq, 1997; Onodera és mtsai. 2002).

3.3.1. β -laktám rezisztencia

Az első β -laktám antibiotikum az Alexander Fleming által felfedezett penicillin volt (Tan és mtsai. 2015). Ezt követően számos penicillin származékot és más β -laktám-antibiotikum csoportot fejlesztettek ki. A β -laktámok baktericid hatással bírnak, hatásukat a sejtfalszintézis gátlásával fejtik ki. A baktériumok sejtfala keresztkötésekkel összekapcsolt peptidláncokból áll, felépítésükért enzimek felelősek. A β -laktámok ezekhez a peptidázokhoz képesek kötődni és inaktiválni. A baktériumok β -laktám-érzékenységét a penicillinkötő fehérjék (penicillin-binding protein, PBP) határozzák meg. A Gram-pozitív baktériumok érzékenységének oka, hogy a sejtfaluk peptidoglikánja könnyen hozzá férhető az antibiotikum számára, míg a Gram-negatívoknál ezt egy külső fehérje réteg fedi.

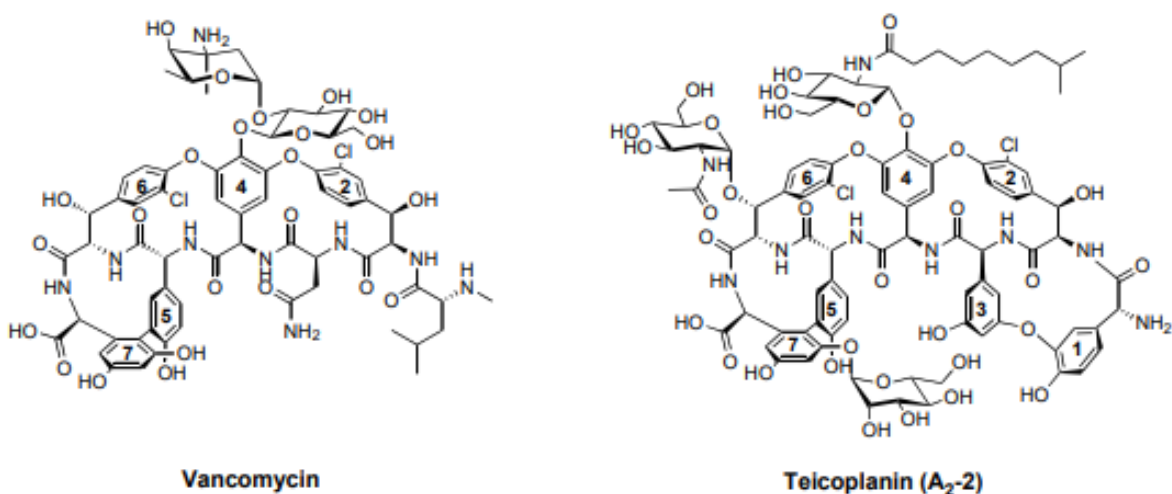
Az összes *enterococcus* természetes magas szintű rezisztenciát mutat a cefalosporinok, és a félszintetikus penicillináz stabil penicillinekkel szemben, valamint alacsony szintű rezisztenciát az egyéb penicillin származékok iránt. Ennek oka az alacsony affinitású PBP5 termelése. Továbbá képesek tolerálni a penicillin és a vancomycin baktericid hatását (Murray 1990). A β -laktám antibiotikumokkal szembeni szerzett rezisztencia leggyakoribb típusa a β -laktamáz enzim

termelése. Ez a β -laktám gyűrűt hidrolizálja, mely az antibiotikum hatástalanításához vezet. Ez a fajta rezisztencia sokkal gyakoribb az *E. faecalis* esetében. Az első β -laktamáz termelő *E. faecalis* törzset (HH22) 1981-ben izolálták egy houstoni beteg mintájából (Murray 1990). Ezután az eset után sokkal gyakoribbá vált és számos nozokomiális infekciót okozott világszerte (Murray és mtsai. 1991; 1992; Patterson és mtsai. 1988; Rhinehart és mtsai. 1990; Wells és mtsai. 1992; Mazzulli és mtsai. 1992) Az első ilyen rezisztenciát hordozó *E. faecium* törzset 11 évvel később Richmondban azonosították, később pedig további 8 epidemiológiailag nem összefüggő izolátumot Modenában 2010-ben (Sarti és mtsai. 2012). Szerencsére más enterococcusoknál eddig nem írtak le ilyen típusú rezisztenciát. A β -laktamázt kódoló gén lehet kromoszómálisan valamint extrakromoszomális DNS-sen (plazmidon) kódolva, mely így az utóbbi esetben gyorsan tud terjedni a különböző baktérium fajok között, ám nem válik állandó tulajdonságukká (Füst és mtsai, 2011). Ennek a rezisztenciának a kivédése lehet a különböző β -laktamáz gátlók alkalmazása, mint pl. a klavulánsav, szulbaktám és a tazobaktám. Ezek a vegyületek lehetővé teszik, hogy kombinációban a régebben használt antibiotikumokat (ampicillin) is újra lehessen alkalmazni. A második leggyakoribb mechanizmus a β -laktám antibiotikumokkal szemben egy szerzett rezisztencia típus: a baktérium sejtfalában található PBP megváltozása, melynek következtében a β -laktámok gyengén vagy egyáltalán nem képesek bekötődni. Raze és mtsai. már 1998-ban leírták, hogy a megváltozott PBP fehérje termeléséért felelős gén a *pbp5*, plazmidon kódolt így átadható különböző baktérium fajoknak (Raze 1998).

3.3.2. Glikopeptid rezisztencia

A glikopeptid antibiotikumok csoportjából a humán gyógyászatban jelenleg használt szerek a vancomycin és a teicoplanin (1. ábra). A vancomycint termelő organizmust, melyet *Amycolatopsis orientalis* névvel azonosítottak (Lechevalier és mtsai. 1986) a borneoi dzsungel talaj mintájából izolálták (Griffith, 1984, Pittenger, 1956). Az általa termelt vancomycin a „vanquish” (legyőz) szóból származik (Griffith, 1984). Az első jóváhagyott glikopeptid antibiotikum volt (Pfeiffer, 1981), melyet széles körben kezdtek el használni az 1958-as forgalomba kerülését követően, mint Staphylococcus-ellenes antibiotikum (Levine, 2008). Azonban a következő évtizedben a Staphylococcus ellen jól használható penicillinek és cefalosporinok háttérbe szorították. Klinikai jelentősége csak az 1970-es évek második felében

kezdett nőni, amikor egyre nagyobb számban jelentek meg a methicillinre rezisztens és így β -laktám antibiotikummal nem kezelhető *Staphylococcus* (MRSA) törzsek (Füst és mtsai 2011). A lipoglikopeptidok a glikopeptid antibiotikumok alcsoportját képviselik. Ebből a csoportból az *Actinoplanes teichomyceticus* talajbaktérium által termelt teicoplanint fedezték fel elsőként, mint természetes lipoglikopeptid (Parenti, 1986).



1. ábra: A vancomycin és a teicoplanin szerkezete (Norris, 2010)

Ezeket az eredeti készítményeket rendkívül oto- és nefrotoxikus voltuk miatt kezdetben csak bélműtétek előkészítésében, az anaerob baktériumok csíraszámának csökkentésére használták. Később kromatográfiásan tisztították őket, így egyrészt hatásuk megtöbbszöröződött, másrészt kevésbé voltak toxikusak (Gergely, 2003). A jelenleg elfogadott álláspont szerint a vancomycin minimum koncentrációját 15–20 mg/l között célszerű tartani, így beszűkült vagy változó vesefunkció esetén, idős beteg, tartós terápia, aminoglikoziddal vagy amphotericinnel való kombináció, illetve akut kardiovaszkuláris elégtelenség esetén a szérumszint monitorozása mellett intravénás injekció formájában adható (Füst és mtsai. 2011). A teicoplanin intravénásan és intramuscularisan is adható, a szérumfehérjéhez 90–95%-ban kötődik, felezési ideje hosszú (40–70 óra), mely lehetővé teszi napi egyszeri adagolását (Füst és mtsai. 2011).

A béta-laktám antibiotikumokhoz hasonlóan a glikopeptidok is gátolják a sejtfal szintézist, azonban más mechanizmus révén. A glikopeptidok ugyanis nagy, hidrofób molekulák melyek a baktériumok sejtfalát felépítő peptidoglikán egyik prekursor molekulájához a

pentapeptid-D-alanil-D-alanin terminálisához kötődnek, megakadályozva így a transzpeptidációt (Courvalin, 2006).

3.3.2.1. Természetes rezisztencia

A glikopeptid rezisztencia egyik formája, amikor a transzpeptidációban résztvevő terminális pentapeptid D-alanin helyett D-szerin vagy D-laktát található. Az ilyen baktériumok természetes rezisztenciával rendelkeznek a glikopeptid antibiotikumokkal szemben, ugyanis ezen pentapeptidekhez a glikopeptidek csak nagyon gyengén tudnak kötődni. Ilyen baktériumok a *Leuconostoc*, a *Lactobacillus* és a *Pediococcus* nemzetségbe tartozó törzsek (Nicas és Allen 1994). Az *E. gallinarum* a *vanC1* míg az *E. casseliflavus* és *E. flavescens* a *vanC2/3* génnel rendelkeznek, melyek a *VanC* fenotípust kódolják. Ez a gén kromoszomálisan kódolt, így nem átadható. A törzsek vancomycinnel szemben konstitutív alacsony szintű rezisztenciát mutatnak (MIC=2-32µg/ml), míg teicoplaninnal szemben továbbra is érzékenyek (Cetinkaya és mtsai. 2000).

3.3.2.2. Szerzett rezisztencia

Az enterococcusokban a glikopeptidekkel szembeni szerzett rezisztencia szabályozásának és expressziójának biokémiai mechanizmusa az egyik legfejlettebb és legtökéletesebb példája a baktériumok genetikai adaptációjának (Leclercq és Courvalin 1997). A vancomycinnel szembeni rezisztenciát általában a kilenc *van* gén egyike közvetíti: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN* (Courvalin 2006, Boyd és mtsai 2008, Lebreton és mtsai 2011, McKessar 2000, Xu és mtsai 2010). A négy leggyakrabban előforduló fenotípusa a VanA, VanB, VanD és VanE (Murray 2000). Ezen fenotípusok kapcsolatát a különféle enterococcus fajokkal, a MIC szinteket és a rezisztencia gének átvihetőségét a 2. táblázat mutatja be:

2. Táblázat: *Enterococcus* fajok glikopeptid rezisztenciája és transzferálhatósága (saját szerkesztés)

Fenotípus Leggyakoribb előfordulás	Vancomycin MIC (µg/ml)	Teicoplanin MIC (µg/ml)	Transzferálhatóság
VanA: <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	64–1,000	16–512	+
VanB: <i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>	4 – 1024	≤0.5	+
VanC: <i>E. gallinarium</i> <i>E. casseliflavus</i> <i>E. flavescens</i>	2–32	≤0.5	-
VanD: <i>E. faecium</i>	128	4	-
VanE: <i>E. faecalis</i>	16	0.5	-

+: igen, - nem, MIC: minimális gátló koncentráció

A VanA rezisztencia típust magas szintű rezisztencia jellemzi mind a vancomycin, mind a teicoplaninnal szemben. A rezisztenciát mindkét antibiotikum indukálhatja (Werner és mtsai. 2008). A rezisztenciát hét gén közvetíti a Tn1546 transzpozonon (Arthur és mtsai. 1993) és konjugációval átkerülhet egy másik *enterococcus* törzs kromoszómájába vagy akár más genusokba is pl. *Staphylococcus*ba (Handwerger és Skoble 1995). A gének hét polipeptidet kódolnak (VanR, VanS, VanH, VanA, VanX, VanY és VanZ), amelyek együttműködve alakítják ki a glikopeptid-rezisztenciát. A két első, a VanR és a VanS a génexpressziót szabályozza. A következő három, a VanH, a VanA és a VanX, a glikopeptid antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát biztosítja, egy módosított sejtfal-prekurzor transzlációjával, amely D-alanil-D-laktáttal végződik (D-Ala -D-Lac) a normál D-Ala-D-Ala helyett. Az utolsó kettő (VanY és VanZ) kiegészítő fehérjék, amelyek hozzájárulnak a rezisztenciához a peptidoglikán szintézis normál útjának gátlásával (Leclercq és Courvalin 1997).

VanB rezisztencia típust mérsékelt vagy magas szintű vancomycin rezisztencia (MIC 4 µg/ml - 1000 µg/ml) jellemzi, de a törzsek általában megtartják teicoplaninnal szembeni érzékenységüket. A rezisztenciát a vancomycin indukálja, a teicoplanin nem. A *vanB* gén klaszter egy Tn1547 transzpozonnal társul (Quintiliani és Courvalin 1996). Genetikai szempontból a *vanA*

és a *vanB* rezisztencia génnek meglehetősen hasonlóak, csupán a VanS fehérjében különbözik egy aminosav a két genotípus között (Evers és Courvalin 1996).

A VanC rezisztencia típusra az alacsony szintű vancomycin rezisztencia jellemző, mely tipikusan az *E. gallinarum*, az *E. casseliflavus* és az *E. flavescens* fajok tulajdonsága. A *vanC1* gént az *E. gallinarumban*, a *vanC2* gént az *E. casseliflavusban* míg a *vanC3*-at az *E. flavescens* fajokban írták le (Clevel, 1990). Az *E. gallinarum* VanC ligáza D-Alanin – D-Szerin-ben végződő pentapeptidet hoz létre.

A VanD típust 1991-ben azonosították egy New York-i kórházban (Perichon és mtsai. 1997). A rezisztenciát kódoló gén kromoszómálisan helyezkedik el és nem transzferábilis. Közepes szintű rezisztenciát jelent a vancomycinnel szemben, míg a teicoplanin hatásos marad.

A VanE rezisztenciára az alacsony mértékű vancomycin és teicoplanin rezisztencia jellemző. Kromoszómálisan kódolt, nem átadható, leginkább a *vanC* típusú rezisztenciához hasonlít (Fines és mtsai. 1999)

Mindezekon felül már leírtak glikopeptid függő *vanA* és *vanB* Enterococcus törzseket is. Ezek a törzsek mutációk következtében elvesztették a D-Ala-D-Ala szintézisét végző enzimjüket, de rendelkeznek a VanA vagy VanB rezisztenciadeterminánsokkal. Azonban mivel mindkettő típusú rezisztencia indukálható, a hiányzó peptidet pótló szintézis csak glikopeptidek jelenlétében zajlik le, enélkül a baktérium elpusztul (Courvalin 2006).

3.4. Vancomycin-rezisztens enterococcus (VRE) törzsek előfordulása

3.4.1. VRE epidemiológiája

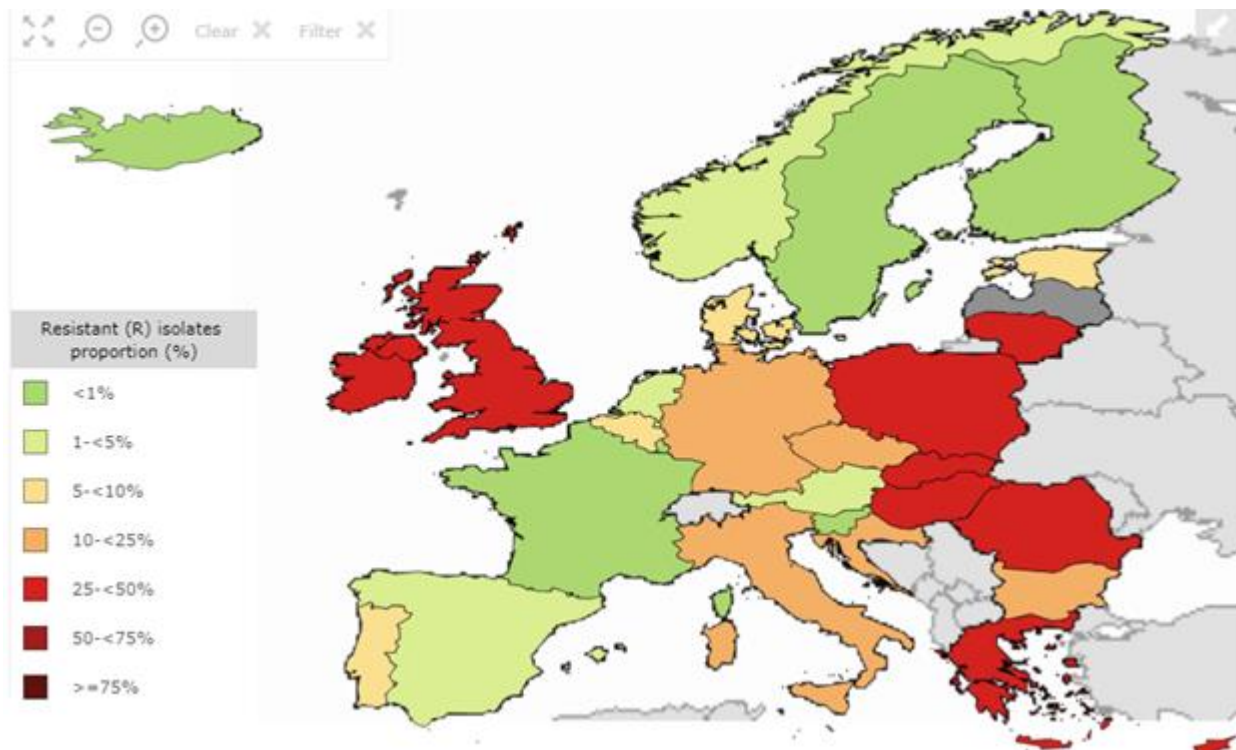
Az enterococcusok a természetben szinte mindenütt megtalálhatók, mivel képesek szaporodni és túlélni kedvezőtlen körülmények között is. A legtöbb állat béltraktusából kimutathatóak, például disznóból és marhából (Manero és mtsai. 2002), kutyából (Wheeler és mtsai. 2002), lóból (Wheeler és mtsai. 2002), nyúlból (Poeta és mtsai. 2005), csirkéből (Hammerum, 2000), valamint birkából és vad madarakból (Poeta és mtsai. 2005). Az élelmiszerekből, például tejből és húskészítményekből, különféle környezeti forrásokból, valamint hulladékból és a felszíni vizekből is könnyen kinyerhetők (Aarestrup 2002). Az emberi bél normál baktériumflórájának kb. 0,01%-át teszik ki (Jett és mtsai. 1994), a székletben található tipikus koncentrációja legfeljebb 10^8 CFU/gram. A szájüreg, a bőr és a hüvely is kolonizálódhat, ám ezekről a helyekről az esetek kevesebb, mint 20% -ában mutathatók ki (Beezhold és mtsai. 1997, Bonten és mtsai. 1996, Huycke és mtsai. 1998). A leggyakoribb enterococcus, melyet egészséges egyének székletéből izolálnak az *E. faecalis*. Ugyancsak ez a faj dominál a különböző fertőzésekben izolált enterococcusok között (körülbelül 80%), a második leggyakoribb pedig az *E. faecium*. Mivel az ampicillinnel és a vancomycinnel szembeni szerzett rezisztencia főként *E. faecium* esetében fordul elő, ennek a fajnak rohamosan megnőtt az előfordulása a kórházban előforduló enterococcusok körében (Cetinkaya és mtsai. 2000).

Uttley és mtsai (1988) valamint Leclercq és mtsai. (1988) számoltak be először a vancomycin-rezisztens *E. faecium* és *E. faecalis* törzsek megjelenéséről Angliában, illetve Franciaországban. Azóta a vancomycin- és/vagy teicoplanin-rezisztens törzsek a világ minden táján megjelentek (Willems és mtsai. 2011). A VRE fertőzések gyakorisága magas Ausztráliában, ahol az *E. faecium* által okozott bakterémiában a törzsek 36,5%-a volt vancomycin-rezisztens (Coombs és mtsai. 2014), valamint az Egyesült Államokban, ahol 87%-a a noszokomiális fertőzésekben származó *E. faecium* izolátumoknak rezisztens (Edelsberg és mtsai. 2014).

Magyarországon az első *vanA* gént hordozó *E. faecalis*-t 2000-ben izolálták egy lábujjfekélyből (Ghidán és mtsai. 2000). Ezt követően két egymástól független esetről (Knausz és

mtsai. 2003, Dombrádi és mtsai. 2009), egy járványról (Böröcz. és mtsai 2005), valamint két epidemiológiai felmérésről számoltak be (Libisch és mtsai. 2008, Dombrádi és mtsai. 2012).

Az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (ECDC) 2017. évi jelentése szerint az intenzív osztályon előforduló, nozokomiális húgyúti és véráram fertőzéseket okozó kórokozók közül az enterococcusok voltak a második leggyakrabban izolált baktériumok. Ezen enterococcusok között a vancomycin rezisztens törzsek aránya 7,3% volt (ECDC 2019). A *VREfm* izolátumok százalékos előfordulása Európában 0% (Izland, Luxemburg) és 59,1% (Ciprus) között van (2. ábra). A legfrissebb adatok alapján, Magyarországon is a nemzetközi trendeknek megfelelően 2011 óta tapasztalható a *VREfm* prevalenciájának folyamatos növekedése a hospitalizált betegek körében. 2018-ban az előfordulási arány 39,5% volt, mely 11,2%-os növekedés az előző évhez képest (ECDC 2017, 2018).



2. ábra: Vancomycin rezisztens *Enterococcus faecium* törzsek százalékos előfordulása Európában 2018-ban (European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance atlas of infectious diseases [internet]. Stockholm: ECDC; 2018 [Letöltve: 2019. október 18.] <http://atlas.ecdc.europa.eu/>.)

A VRE epidemiológiáját tekintve megállapítható, hogy előfordulása más eredetű Amerikában, mint Európában. Az Egyesült Államokban a VRE gyors megjelenése valószínűleg a vancomycin és/vagy cefalosporin túlzott használatának volt tulajdonítható (McDonald és mtsai.

1997, Woodford és mtsai. 1995), míg Európában az állattenyésztésben hozamnövelés céljából alkalmazott glikopeptid-analógoknak (például avoparcinnak) a használatával és az élelmiszerláncba történő bekerülésével magyarázzák (Bates és mtsai. 1993, Donnelly és mtsai. 1996, Chadwick és mtsai. 1996). Egy érdekes tanulmány támasztja alá az állati élelmiszerek és a VRE közötti kapcsolat hipotézisét, mely szerint a VRE magas hordozási arányát találták Hollandiában húsfogyasztó idős emberek körében, míg az idős vegetáriánusok esetében a VRE hordozás hiánya volt tapasztalható (van den Braak és mtsai. 1997).

3.4.2. VRE hordozása

A nem megfelelő antibiotikum használat az egyik fő oka a rezisztens baktériumok kisselektálódásának, és ezen multirezisztens kórokozók hosszú távú hordozása megnöveli a későbbi fertőzések kialakulásának valószínűségét. A VRE kolonizáció számos kockázati tényezővel hozható összefüggésbe. Ide tartozik többek között a hosszabb kórházi tartózkodás, az előrehaladott életkor, súlyos alapbetegség, központi vénás katéter használat, valamint a különféle antibiotikumok, például vancomycin vagy metronidazol előzetes expozíciója (Karki és mtsai. 2012; Purohit és mtsai. 2017; Sohn és mtsai. 2013). A VRE tünetmentes hordozása és a hatékony dekolonizációs eljárási rend hiánya stabilizálja a VRE endemikus állapotát az egészségügyi környezetben (Cheng és mtsai. 2014). A kolonizáltak rezervoárként funkcionálhatnak a többi bent lévő beteg megfertőzésében, mely megnövekedett morbiditást, mortalitást és újabb költségeket eredményezhet (Muto és mtsai. 2003; Stosor és mtsai. 1998).

3.5. Enterococcusok virulencia faktorai

Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia önmagában nem magyarázza az enterococcusok fokozott virulenciáját, valamint az általuk okozott fertőzéseket. Különböző virulencia faktorokkal rendelkeznek, amelyek lehetővé teszik a virulens törzseknek a gazdaszervezetbe történő bejutást, kolonizálást, valamint a gazdaszervezet immunválaszának elkerülését. Ezen túlmenően az ilyen virulens törzsek patológiás elváltozásokat is okoznak a közvetlen toxintermeléssel (*Streptococcus pyrogenic* exotoxinjához hasonlóan) vagy közvetett módon gyulladás indukálásával (Salminen és mtsai. 2004).

Korábbi tanulmányok az enterococcusok virulenciáját összefüggésbe hozták többek között a kollagénkötő fehérje (ace), az aggregációs protein (agg), az enterococcus felszíni fehérje (esp) jelenlétével, vagy a biofilmképző képesség meglétével (Nallapareddy és mtsai. 2000, Shankar és mtsai. 2001).

Aggregációs protein (agg): Adhézióban játszik szerepet, különböző eukarióta sejtekhez képes kötődni, például makrofágokhoz és bélhámsejtekhez (Eaton és Gasson, 2001; Fisher és Phillips 2009). Egy feromonra érzékeny plazmid kódolja. Rozdzinski és mtsai (2001) kimutatták, hogy az aggregációs fehérje nemcsak az eukarióta sejtekhez képes bekötődni, hanem az extracelluláris mátrix fehérjékhez, például a fibronektinhez, vitronektinhez és az I. típusú kollagénhez is. A fertőzés és a bakterémia kiváltása érdekében az enterococcusoknak át kell hatolniuk a bél- vagy az urogenitális epithéliumon, és be kell lépniük a nyirokkeringésbe és/vagy az érrendszerbe (Rozdzinski és mtsai. 2001). Ezt a transzlokációt elősegítheti a virulens törzsben található aggregációs protein. Ezen kívül szerepet játszik az eukarióta sejt inváziójában is és elősegíti az enterococcusok túlélését a gazdaszervezet immunsejtjeiben (Rakita és mtsai. 1999).

Kollagén-kötő fehérje (ace): Egy sejt felszíni fehérje, amely a mikrobák felszíni komponenseit felismerő adheziv mátrix molekulák (MSCRAMM) családjába tartozik (Fisher és Phillips 2009). Az ace szerepet játszik az *E. faecalis* által okozott endokarditisz patogenezisében (Koch és mtsai. 2004, Singh és mtsai. 2010)

Enterococcus felszíni fehérje (esp): Fontos szerepet játszik az enterococcusok patogenitásában, megtalálható mind az *E. faecalis* mind az *E. faecium* törzsekben. Az esp előfordulása magasabb a kórházi törzsek között, mint az egészséges egyénekből származó izolátumok esetében, mely jelzi, patogenezisben betöltött szerepét (Eaton és Gasson, 2001). A gént kódoló régió a mindkét enterococcus fajban megtalálható patogenitási szigeten helyezkedik el (Leavis és mtsai 2004). Az esp jelenléte hozzájárul a kórokozó kolonizációjához és perzisztenciájához mind az *E. faecalis*, mind az *E. faecium* esetében a gazdaszervezetben. Emellett az esp szerepet játszik a gazdaszervezet immunválaszának megtámadásában is. Az Esp fehérje szekvenciája és felépítése hasonló a két fajban (Eaton és Gasson, 2001). C-terminális régiója tartalmaz egy membránt átfogó hidrofób domént és egy sejt-fal-rögzítő motívumot, amely a fehérje bakteriális sejt-felülethez történő rögzítésében részt vesz (Salminen és mtsai. 2004). Továbbá ismert, hogy a biofilm-termelő baktériumok képesek katétereket, beültetett szívbillentyűket vagy különböző

ortopédiai eszközöket kolonizálni, ezáltal hozzájárulnak a natív endocarditis, a krónikus otitis media, valamint további különböző nozokomiális fertőzések kialakulásához (Costerton és mtsai. 1999).

4. CÉLKITŰZÉSEK

A Debreceni Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Intézet Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumába évente több mint 40 000 minta érkezik. Munkánk során célunk volt az egyik leggyakoribb Gram-pozitív noszokomiális patogén, a vancomycin-rezisztens enterococcus előfordulásának felmérése, molekuláris és epidemiológiai vizsgálata. Kutató munkám két fő területre fókuszált, melyek a következők:

Klinikai mintákból származó vancomycin-rezisztens enterococcus törzsek vizsgálata:

Célkitűzések:

1. A Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumba 2012. január 1. és 2015. december 31. között érkezett klinikai minták VRE szűrése, a VRE törzsek előfordulásának felmérése.
2. A törzsek identifikálása MALDI-TOF MS (Mátrix által segített lézer deszorpción és ionizáción alapuló-repülési idő tömegspektrometria) használatával.
3. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok. A háttérben álló rezisztencia gének illetve a patogenezisben szerepet játszó virulencia faktorok meghatározása molekuláris biológiai módszerrel.
4. A virulencia faktorok és a biofilm képzés közötti összefüggés feltárása.
5. Az izolátumok epidemiológiai kapcsolatainak feltárása a VRE terjedésének megértése szempontjából pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE) valamint multilókusz szekvencia tipizálás (MLST) segítségével.

Székletből izolált vancomycin-rezisztens enterococcus törzsek vizsgálata:

Célkitűzések:

1. A VRE törzsek szűrése kétféle szűrőmódszer segítségével a 2016. február és szeptember közötti időszakban beérkezett széklet mintákból.
2. A törzsek fajok szerinti megoszlásának vizsgálata MALDI-TOF MS használatával.
3. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok, a háttérben álló rezisztencia gének kimutatása.
4. A VRE pozitív betegek illetve hordozók jellemzése.
5. A VRE kolonizációt elősegítő rizikófaktorok elemzése.

5. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1. Anyagok

5.1.1. Tápoldatok, táptalajok

Brain Heart Infusion tápoldat (BHI): 37 g BHI-t (Oxoid) 1 liter ioncserélt vízben feloldunk és autoklávozunk. BHI összetétele: 27,5 g szubsztrát (agykivonat, szív kivonat és peptonok), 2 g glükóz, 5 g NaCl, 2,5 g Na₂HPO₄

Tryptic Soy Broth (TSB): 27,5 g tripton-szója por (LabM Limited Kft) + 1 liter ioncserélt víz

TSB 15% glicerinnel: 1 liter ioncserélt vízhez 27,5g TSB-t adunk. TSB (LabM) összetétele: tripton 17g, szója pepton 3g, NaCl 5, dikálium-hidrogén-foszfát 2,5g

Columbia agar (Merck): 3 g peptonkeverék, 1 g keményítő, 5 g NaCl és 13 g agar

Véres agar (LabM): 42 g Columbia agart feloldunk 1 liter ioncserélt vízben és a steril defibrinált bikavért 45-50 °C-ra hűtött táptalajhoz adjuk majd petricsészébe öntjük.

VRE agar (Oxoid): (14 literhez): pepton 280g, élesztő kivonat 70g, NaCl 70g, Nátrium-citrát 14g, eszkulin 14g, vas-ammónium-citrát 7g, Nátrium-azid 2,1g

VRE screen lemez: 1 liter ioncserélt vízben 42,7 g VRE agart (Oxoid) feloldunk és autoklávozunk. A kiöntés előtt az agarhoz 6 µg/ml vancomycint (Fresenius Kabi Hungary Kft).

Folyékony VRE screen: Megfelel a VRE screen lemeznek az agar hozzáadása nélkül

Mueller-Hinton agar (Oxoid): 28g Mueller-Hinton agart 1 liter ioncserélt vízben feloldunk. A Mueller-Hinton agar összetétele: 30 g/l marhahús kivonat, 17,5 g/l kazein hidrolizátum, 17 g/l agar, 1,5 g/l keményítő, pH 7.4;

TSA: TSB 15 g agar-agarral (Merck) szilárdítva

A táptalajokat 116°C-on 30 percig autoklávozzuk.

5.1.2. Vegyszerek, enzimek, kitek

Vegyszerek: alfa-ciano-4-hidroxi-fahéjsav (Bruker Daltonik GmbH), 70%-os hangyasav (Sigma), 100bp DNS létra (Invitrogen), etidium-bromid (Serva), agaróz (Bio-Rad), DNáz mentes víz, 0,5 % TBE puffer (45 mM Tris, 2 mM EDTA, 45 mM ecetsav), PBS (137 mM/l NaCl, 2,7 mM/l KCl, 1,76 mM/l KH₂PO₄, 8,1 mM/l Na₂HPO₄, pH 7.4), 95 % etanol (Scharlab Magyarország Kft), RE puffer (1 M NaCl, 10 mM Tris [pH 7.6]), EC puffer (6 mM Tris [pH 7.6], 1 M NaCl, 100 mM EDTA [pH 7.5], 0.5% Brij 58, 0.2% dezoxikólsav, 0.5% nátrium-lauril-szarkozinát), ESP puffer (0.5 M EDTA [pH 9-9.5], 1% nátrium-lauril-szarkozinát, 50ug/ml proteináz K), TE puffer (10 mM Tris hydrochloride [pH 7.5], 1 mM EDTA), 99 % metanol (Scharlau Chemicals), antibiotikum korongok (Bio-Rad), E-teszt (Liofilchem, BioMerieux)

Enzimek: Taq polimeráz (Thermo Scientific), RED TaqTM Ready Mix (Sigma), HotStar Taq MasterMix (Sigma), lizozim (Sigma), mutanolizsin (Sigma), *Sma*I restrikciós endokukleáz

Kitek: Mikrobank gyöngyök (Microbank; Pro-Lab Diagnostics), QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen),

5.1.3. PCR primerek

A PCR-hez használt primereket az Integrated DNA Technologies Incorporated-től (Bio-Science Kft.) rendeltük. A *van* génekre (3.táblázat), illetve az *E. faecalis* és *E. faecium* *ddl* génekre specifikus primereket (4. táblázat) Depardieu és mtsai (2004) alapján terveztük. A virulencia faktor gének (*agg*, *ace* *esp*) kimutatása Cariolato és mtsai. (2008) által leírt protokoll alapján történt, a reakciókhoz használt primereket Woodford és mtsai. (2001), Eaton és mtsai. (2001), valamint Mannu és mtsai (2003) által leírtak alapján terveztük (5. táblázat).

3. Táblázat: Rezisztencia gének detektálásához használt primerek

Primer	Szekvencia (5' → 3')	Gén	PCR termék (bp)
EA1 (+)	GGG AAA ACG ACA ATT GC	VanA	732
EA2 (-)	GTA CAA TGC GGC CGT TA		
EB3 (+)	ACG GAA TGG GAA GCC GA	VanB	647
EB4 (-)	TGC ACC CGA TTT CGT TC		
EC5 (+)	ATG GAT TGG TAY TKG TAT	VanC1/2	815/827
EC8 (-)	TAG CGG GAG TGM CYM GTA A		
ED1 (+)	TGT GGG ATG CGA TAT TCA A	VanD	500
ED2 (-)	TGC AGC CAA GTA TCC GGT AA		
EE1 (+)	TGT GGT ATC GGA GCT GCA G	VanE	430
EE2 (-)	ATA GTT TAG CTG GTA AC		
EG1 (+)	CGG CAT CCG CTG TTT TTG A	VanG	941
EG2 (-)	GAA CGA TAG ACC AAT GCC TT		

+, sense primer; -, antisense primer

K=G /T; M=A/C; Y=C/T

4. Táblázat: Fajspecifikus PCR reakció során használt primerek

Primer	Szekvencia (5' → 3')	Gén	PCR termék (bp)
DD1-3 (+)	CAC CTG AAG AAA CAG GC	ddl (<i>E. faecalis</i>)	475
DD3-2 (-)	ATG GCT ACT TCA ATT TCA CG		
FAC1-1 (+)	GAG TAA ATC ACT GAA CGA	ddl (<i>E. faecium</i>)	1091
FAC2-1 (-)	CGC TGA TGG TAT CGA TTC AT		
CA1	TCC TGA ATT AGG TGA AAA AAC	sodA (<i>E. casseliflavus</i>)	288
CA2	GCT AGT TTA CCG TCT TTA ACG		
GA1	TTA CTT GCT GAT TTT GAT TCG	sodA (<i>E. gallinarum</i>)	173
GA2	TGA ATT CTT CTT TGA AAT CAG		

+, sense primer; -, antisense primer

5. Táblázat: Virulencia faktor gének detektálásához használt primerek

Primer	Szekvencia (5' → 3')	Gén	PCR termék (bp)
Esp1 (+)	GGT CAC AAA GCC CAA CTT GT	esp	407
Esp2 (-)	ACG TCG AAA GTT CGA TTT CC		
TE3 (+)	AAG AAA AAG AAG TAG ACC AAC	agg	1553
TE4 (-)	AAA CGG CAA GAC AAG TAA ATA		
ACE1 (+)	AAA GTA GAA TTA GAT CCA CAC	ace	320
ACE2 (-)	TCT ATC ACA TTC GGT TGC G		

+, sense primer; -, antisense primer

5.1.4. Baktérium törzsek

Kontroll törzsek:

Munkánk során a következő kontroll törzseket használtuk: *E. faecalis* ATCC 29212 (vad típusú törzs), *esp* illetve *vanB* pozitív kontrollként az Országos Epidemiológiai Központtól kapott E310-es *E. faecium* törzset használtuk (Libisch és mtsai, 2008). Egy korábban izolált *E. faecalis* 17980-as klinikai törzs volt az *agg*, *ace* és *vanA* pozitív kontrollunk. Továbbá egy korábban izolált 4608-as és 27847-es klinikai törzs volt az *E. gallinarum* és az *E. casseliflavus* kontrollunk.

Vizsgált törzsek:

Mintáink a Debreceni Egyetem Klinikáiról származó, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumában feldolgozott vizsgálati anyagok voltak. A kísérleteinkbe bevont VRE törzseket 2012. január 1. és 2015. december 31. között gyűjtöttük. A vizsgálatainkba bevont széklet mintákból származó törzseket 2016. február 1. és 2016. szeptember 30. között izoláltuk.

5.2. Módszerek

A Klinikai Központ több mint 1700 ágyon, 49 diagnosztikai munkahelyen és 130 ambulancián végzi betegellátó tevékenységét. Az Orvosi Mikrobiológiai Intézetben 2004 óta szűrjük a vancomycin rezisztens enterococcus törzseket a klinikai mintákból.

5.2.1. Vancomycin-rezisztens enterococcusok azonosítása klinikai mintákból

A klinikai mintákat rutinszerűen a következő táptalajokra szélesztjük az aerob tenyésztés során: véres agar, csokoládé agar, eozin-metilénkék. Enterococcusok esetén véres agaron és csokoládé agaron 16-18 órás inkubáció után jellegzetes telepmorfológiát kapunk. A telepek szürkés-fehérek, 1-2 mm átmérőjűek, csillogóak, közepén tömörebb állományúak. Néhány izolátum β - vagy α - hemolízist mutat (Czirok, 1999). A kitenyésztett enterococcus törzseket ezután VRE Screen szelektív táptalajra oltjuk, mely 6 $\mu\text{g/l}$ vancomycint tartalmaz, majd 37°C-on 24 órán keresztül tenyésztjük. A VRE-k az inkubációs idő letelte után az eszkulin hidrolízisének

következtében fekete telepeket képeznek. Az telepeket MALDI-TOF MS-el (Bruker Daltonics, Germany) azonosítottuk, majd Microbank gyöngyökön (Microbank, Pro-Lab Diagnostics) -20°C-on tároltuk.

5.2.2. Vancomycin-rezisztens enterococcusok azonosítása széklet mintákból

A széklet minták vizsgálatának időszakát két periódusra osztottuk. Az első periódusban 2016. 02. 01.-07.05 között (155 nap, 2050 minta) a rutin diagnosztikában is használt 6 µg/l vancomycint tartalmazó VRE Screen lemezre oltottuk ki a széklet mintákat direkt módon egy üvegbot segítségével. A második periódusban 2016.07.06.-09.30 között (88 nap, 971 minta), ugyanazt a beoltási technikát és tenyésztő közeget alkalmaztuk, de agarral nem szilárdítottunk, úgynevezett folyékony szűrő tápoldatot használtunk. Mindkét módszer esetén, 24-48 órás inkubációs periódus következett 37°C-on. A fekete telepeket átoltottuk, illetve a feketére színeződő tápoldatból kioltást végeztünk 5%-os véres agarra (LabM). A faji szintű azonosítást MALDI-TOF MS-el végeztük, majd az enterococcusokat a további vizsgálatokig -20°C-on TSB-ben (LabM) tároltuk.

Minden beteg esetében csak az első izolátumot vizsgáltuk tovább amennyiben későbbi mintájából is ugyanaz a faj tenyészet ki.

5.2.3. MALDI-TOF MS

A minták faji szintű azonosítása a mikrobiológiai diagnosztikában egyre nagyobb teret hódító MALDI-TOF MS-el történt. A vizsgálat első lépéseként az izolált telepekből egy fogpiszkáló segítségével egy apró baktériumtelepet vittünk fel a mintafelvívő lemezre (target). A minta molekuláinak ionizációja egy 1µl segédanyag (mátrix) az alfa-ciano- 4-hidroxi-fahéjsav hozzáadásával történik. Az oldószer elpárolgása után az analit molekulák a mátrix kikristályosodott molekuláiba ágyazódnak. Ez az anyag képes elnyelni az ionizációhoz használt nitrogén lézer energiáját és továbbítani azt az analit molekuláknak. A target készülékbe helyezését követően a pulzáló lézersugár hatására a makromolekula-mátrix komplexből egyszeres töltésű ionok szabadulnak fel, melyek bejutnak az analizátorba, az ionok összeütközését megakadályozza az itt található magas vákuum. A becsapódó ionokat a detektor érzékeli és

repülési idejük alapján analizálja. A repülési idő a molekula méretével arányos, a kisebb méretű molekuláknak rövidebb, a nagyobb méretű molekuláknak hosszabb időbe telik eljutni a detektorig. A kapott tömegspektrum egy összetett fehérje profil, mely riboszómális fehérjékből áll, ez a baktérium molekuláris „ujjlenyomatának” fogható fel. A készülék az expresszált proteinek tömegspektrumát összehasonlítja az adatbázisában tárolt törzsek referenciaspektrumával. A jelenlegi MALDI Biotyper 3.0 szoftverünk több mint 7000 faj tömegspektrumát tartalmazza. Az általunk használt szoftver az azonosított fajokat egy „log score”(LS) érték alapján rangsorolja. Ez az érték tükrözi az adatbázisban lévő fajok spektrumának egyezését az ismeretlen izolátum spektrumaival, amely eredményeként a szoftver egy nulla és három közé eső LS értéket generál az eredmények kiértékelésére (6. táblázat).

6. Táblázat: A találati (score) értékek kiértékelése

Score érték tartomány	Jelentés	szimbólum	szín
2.300 - 3.000	magas valószínűségű species szintű azonosítás	(+++)	zöld
2.000 - 2.299	biztos genus szintű, lehetséges species szintű azonosítás	(++)	zöld
1.700 - 1.999	biztos genus szintű azonosítás	(+)	sárga
0.000 - 1.699	identifikálás nem lehetséges	(-)	piros

5.2.4. Antibiotikum érzékenység meghatározása

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat az EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) aktuális évi, érvényben lévő nemzetközi ajánlásai alapján végeztük. A vizsgálatok kivitelezése a nemzetközi standardoknak megfelelő körülmények között az ajánlásoknak megfelelő kontrolltörzsekkel ellenőrzött táptalajokon történt.

Korongdiffúzió

A Kirby-Bauer féle korongdiffúziós módszerrel szemikvantitatív módon lehet meghatározni a baktériumok antimikrobiális szerekkel szembeni in vitro érzékenységét. A vizsgálat során az alábbi antibiotikum tartalmú korongokat (Bio-Rad) használtuk: ampicillin (2 mg), gentamicin (30 mg) és ciprofloxacín (5 mg). A megadott koncentrációjú antimikrobiális szerrel átitatott korongokat helyeztünk a megfelelő táptalaj felszínére, melyet előzőleg a vizsgálandó baktérium törzs, tiszta, friss tenyészetéből készített kalibrált inokulummal oltottunk be. Az inkubációs hőmérséklet az EUCAST által megadott $35 \pm 1^\circ\text{C}$, az inkubáció időtartalma pedig $18 \pm 2\text{h}$. Az inkubációs idő letelte után, a papírkorongból a táptalajba diffundáló antibiotikum hatására az érzékeny mikrobák esetében a korong körül feltisztulási zóna jön létre, míg a rezisztens baktériumok az antibiotikum jelenlétében is szaporodni fognak. A kialakult zónák méretéből a kontroll törzsekkel végzett standardizált körülmények között kapott eredményéhez hasonlítva kapunk érzékeny, illetve rezisztens eredményt.

MIC érték meghatározása E-teszttel

A MIC meghatározására több módszer is alkalmas. A rutin diagnosztikában leginkább az úgynevezett E – teszt terjedt el. Ennek az alapja, egy műanyag vagy papír csík, melynek egyik oldala az adott antibiotikumot koncentráció gradiens szerint tartalmazza. A csíkot egy megfelelően inokulált agar táptalaj felszínére kell illeszteni. Az antibiotikum gyorsan kidiffundál a csíkból, úgy hogy a koncentráció gradiens a táptalajban is megmarad. A rászélesztett baktériumok növekedését az antibiotikum gátolni fogja, abban az esetben, ha a táptalajba diffundáló antibiotikum mennyisége eléri a MIC értékét. Ez az érték azzal a csíkon feltüntetett koncentrációval lesz egyenlő, amelynél az ellipszis alakú gátlási zóna metszi a tesztcsíkot. A módszer előnyeként említhető, hogy kivitelezése egyszerű, viszont a tesztcsík drága. A vancomycin, teicoplanin, daptomycin, tedizolid, linezolid, quinupristin/dalfopristin és tigecyclin MIC értékeit az antibiotikumokat meghatározott koncentráció gradiensben tartalmazó csíkokkal, a gyártók előírásainak megfelelően alkalmazva határoztuk meg (BioMérieux, Liofilchem).

5.2.5. Molekuláris biológiai vizsgálatok

DNS izolálás

A baktériumokból nyert lizátumokat Yean és mtsai. (2007) alapján készítettük kisebb módosítással, és ezeket a PCR reakciók templátjaként használtunk. A DNS izoláláshoz a 24 órás tenyészetből egy kicsinyi mennyiséget 100µl DNáz mentes vízben elszuszpendáltunk, majd 15 percig 98°C-on hőkezeltük, elősegítve ezzel a sejtek feltárását. 3 perc centrifugálás (10 000g) után a DNS-t tartalmazó felülúszót leszívtuk és kb. 3µl-t használtunk egy-egy PCR reakcióhoz. A reakciók elvégzéséig a DNS-t -20°C-on tároltuk.

Vancomycin rezisztencia gének kimutatása

A rezisztenciagének molekuláris szintű azonosítása specifikus PCR reakciók alkalmazásával történt (Depardieu és mtsai, 2004). A reakcióelegy tartalmazta mind a rezisztenciagénekre, mind az *E. faecium* és *E. faecalis* D-alanin-D-alanin ligáz génekre (*ddl*) specifikus primer párokat is (3. 4. táblázat). Így egy reakción belül meg tudjuk állapítani, hogy melyik *Enterococcus* speciesről van szó és az adott törzs melyik rezisztenciáért felelős génnel rendelkezik.

A PCR reakcióelegy összetétele (7. táblázat) *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* illetve *ddl* és *sodA* specifikus PCR reakció esetén:

7. Táblázat: PCR reakcióelegy összetevői vancomycin rezisztencia gének detektálásához

Összetevők	Mennyiség
REDTaq™ ReadyMix	25µl
Primer keverék (forward ill. reverz primerek 4pmol/µl oldata)	5µl
Templát (DNS lizátum)	3µl
Steril H ₂ O	17µl
végtérfogató	50µl

a) Az inkubációs ciklus körülményei a *vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE* illetve a *ddl* specifikus PCR reakció esetén a következők:

1. 94°C – 3 perc
 2. 94°C – 1 perc
 3. 54°C – 1 perc
 4. 72°C – 1 perc
 5. 72°C – 7 perc
 6. 4°C – ∞
- } 30 ciklus

b) A *vanC* specifikus PCR esetén a 3. lépésben 54°C helyett 50°C-ot alkalmaztunk.

c) A fajspecifikus *sodA* PCR reakció esetén az inkubációs ciklus körülményei a következők voltak:

1. 95°C – 4 perc
 2. 95°C – 30 másodperc
 3. 55°C – 1 perc
 4. 72°C – 1 perc
 5. 72°C – 1 perc
 6. 4°C – ∞
- } 30 ciklus

Virulencia faktorok vizsgálata

A virulencia faktor gének kimutatása Cariolato és mtsai. (2008) által leírt protokoll alapján történt. A reakciókhoz használt primereket Woodford és mtsai. (2001) Eaton és Gasson. (2001) valamint Mannu és mtsai (2003) által leírtak alapján terveztük (5. táblázat).

A virulencia faktor génekre specifikus PCR reakcióelegy (8. táblázat) az alábbi összetevőket tartalmazta:

8. Táblázat: virulencia faktor génekre specifikus PCR reakcióelegy összetevői

Összetevők	Mennyiség
MgCl ₂ (25 mM)	1,5μl
10x Taq puffer	2,5μl
dNTP mix (10 mM)	0,5μl
Primer keverék (forward ill. reverz primerek 4pmol/μl oldata)	3μl
Taq polimeráz (5 U/μl)	0,5μl
Templát (DNS lizátum)	1μl
Steril H ₂ O	16μl
végtérfogó	25μl

a) Az inkubációs ciklus körülményei az *esp* és az *agg* specifikus PCR esetén:

1. 94°C – 3 perc
 2. 94°C – 30 másodperc
 3. 58°C – 30 másodperc
 4. 72°C – 1 perc
 5. 72°C – 5 perc
 6. 4°C – ∞
- } 30 ciklus

b) Az *ace* gén kimutatására az alábbi programot használtuk:

1. 94°C – 3 perc
 2. 94°C – 1 perc
 3. 56°C – 1 perc
 4. 72°C – 1 perc
 5. 72°C – 10 perc
 6. 4°C – ∞
- } 33 ciklus

Az amplikonok detektálása

A PCR során amplifikált DNS fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel detektáltuk. Az elválasztásra használt agaróz gél az alábbiak szerint készítettük el: 0,4 g agarózt 30 ml 0,5 %-os TBE pufferben melegítéssel feloldottunk. A puffer kézmelegre történő hűlése után 1,5 μl ethidium-bromidot adtunk az elegyhez, majd hagytuk megdermedni. A DNS mintákhoz (5-5 μl) 1-1 μl 6x DNS puffert adtunk, majd felvittünk 5-5 μl-t a megszilárdult gélre a standardként

szolgáló 100bp léptékű DNS létra mellé. A mintákat 1,5%-os gélben 80 V feszültségen, körülbelül 40 percig elektroforetizáltuk. A géleket Bio-Rad Multi-Analyst készülék segítségével UV- fényben értékeltük.

5.2.6. Biofilmképzés vizsgálata

A vancomycin rezisztens enterococcus törzsek biofilm képzését Stepanovic és munkatársai által publikált, módosított mikrotiter-plate teszt segítségével vizsgáltuk, melyet kisebb mértékben optimalizáltunk (Stepanovic és mtsai, 2007). Ez a módszer a szerzők korábban publikált (2000) standard mikrotiter-plate tesztjétől annyiban különbözik, hogy indirekt módon képes mérni mind a mélyedés falán, mind pedig annak alján, megtapadt baktériumokat egy festék visszaoldásának köszönhetően. Az izolátumokat vizsgálataink során előbb véres agaron, majd 0,25 % glükóz tartalmú tripton-szója-agaron (TSA) felnöveltük egy éjszakán keresztül, 37°C-on. Következő lépésként 0,5 McFarland denzitású baktérium-szuszpenziót készítettünk 0,25 % glükózzal kiegészített tripton-szója-húsleves (TSB) felhasználásával. Mindegyik törzs esetében háromszor 200-200 µl-t pipettáztunk egy 96-lyukú, lapos aljú mikrotiter lemez (TPP, Trasadingen, Switzerland) mélyedéseibe. A mintában levő baktériumok az egy éjszakán át, 37°C-on, aerob körülmények között végzett inkubálás során kitapadtak a plate aljára, illetve annak falára, és az arra hajlamosak biofilmet képeztek. Pozitív kontrollként egy *vanB* pozitív *E. faecium* klinikai izolátumot (E310) használtunk, míg a negatív kontroll üregei 200µl TSB-t tartalmaztak. A 24 órás biofilmet 3x300 µl foszfát pufferolt sóoldattal (PBS) mostuk. A mosással eltávolítottuk a mikrotiter plate lyukaiban meg nem tapadt baktériumokat, ugyanis ezek zavarják a mérést. A kialakított biofilmbe ágyazott mikroorganizmusokat 150 µl, 99%-os metanol hozzáadásával fixáltuk 20 percen keresztül, majd a lemezt szobahőmérsékleten szárítottuk fejjel lefelé, egy éjszakán át. A vizsgálat következő napján 150 µl, 2 %-os kristályibolyával festettük meg a kitapadt sejteket majd 15 perc elteltével, csapvizet öblítéssel eltávolítottuk a meg nem kötött festéket, a lemezt pedig levegőn szárítottuk. Utolsó lépésként visszaoldottuk a biofilmben található baktériumok által megkötött kristályibolyát 150 µl, 95%-os etanol hozzáadásával. Végül ELISA Reader segítségével 540/620 nm hullámhosszon meghatároztuk az optikai denzitásokat

(OD). A cut-off értéket (OD_c) a negatív kontroll átlagos OD értékéből számítottuk Stepanovic és mtsai (2000) alapján:

$$\text{ODc} = \text{negatív kontroll OD átlag} + (3 \times \text{negatív kontroll szórás})$$

Az eredmények kiértékelés során a leolvasott optikai denzitások átlagának cut-off értékhez (OD_c) való viszonya alapján a vizsgált törzseket az alábbi csoportokba soroltuk

$\text{OD} \leq \text{ODc} \rightarrow$ nem biofilmképző

$\text{ODc} < \text{OD} \leq 2 \text{ ODc} \rightarrow$ gyenge biofilmképző

$2 \text{ ODc} < \text{OD} \leq 4 \text{ ODc} \rightarrow$ közepes biofilmképző

$4 \text{ ODc} < \text{OD} \rightarrow$ erős biofilmképző

5.2.7. Epidemiológiai tipizálási módszerek

Pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE)

Az *Enterococcus* törzsek PFGE vizsgálatát a Nemzeti Népegészségügyi Központban Murray és mtsai. illetve McEllistrem és munkatársai által leírt protokoll alapján végezték kisebb módosításokkal (Murray és mtsai. 1990., McEllistrem és mtsai 2000.). A törzseket először 3ml BHI-ban felnövelték egy éjszakán át 37°C-on termosztátban. A baktérium szuszpenzióból 700µl-t lecentrifugáltunk, majd az üledéket 1ml RE pufferrel felszuszpendáltuk. Ezután fotométer segítségével beállítottuk a keverék optimális sejtsűrűségét (optikai denzitás OD=1,00-1,50 között megfelelő), majd 1,2%-os alacsony olvadáspontú gélét készítettünk (10ml RE + 0,12g Seakem agaróz). 200µl RE pufferes baktérium tenyészetet összekevertünk ugyanennyi alacsony olvadáspontú géllal, majd a kapott szuszpenziót öntőformába pipettáztuk és hagytuk, hogy megszilárduljon. Dermedés után a plugokat 400µl lízis pufferben (EC oldat + 10 mg/ml lizozim + 5000 U/ml mutanolizin), inkubáltuk 37°C-on 4 órán át, majd 50°C-on egy éjszakán át ESP pufferben. A plugokat ezután háromszor mostuk 30 percig 1ml TE pufferben és felhasználásig 4°C-on tároltuk. Az emésztéshez 2-3mm-es plug darabokat vágtunk, előmostuk 200µl desztillált vízzel, majd emésztettük 30°C-on *SmaI* restrikciós endokukleázzal éjszakán át. A kapott fragmentumokat CHEF-DRII (Bio-Rad) készülékben választottuk szét. A futtatás 14 °C-on, 6V feszültség alatt 25 órán keresztül zajlott. Ezt követően a gélét ethidium-bromid segítségével megfestettük, majd a fragmentumokat Gel Dok rendszerben UV fény alatt detektáltuk. A dendogramokat a Fingerprinting II. program 3.0 verziójával analizáltuk (Bio-Rad), Dice-

koefficiens alkalmazásával az „unweighted pair group method with arithmetic means” (UPGMA) felhasználásával 1.0% sáv pozíció toleranciával és 1.0% optimalizációval. Az izolátumok összefüggését Tenover kritériumai alapján határoztuk meg (Tenover és mtsai. 1995).

Multilókusz szekvencia tipizálás (MLST)

Az *E. faecium* törzsek vizsgálata során 7 háztartási gén (*adk*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *purK*, *pstS*) belső gén fragmentumának szekvenálása történt. A kísérletek során használt primereket (9. táblázat), a <https://pubmlst.org/> webhely szerint alkalmaztuk (Homan és mtsai. 2002). *E. faecium* MLST esetén a PCR reakció elegy összetétele a 10. táblázatban látható. A kapott PCR termékeket QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk, majd mindkettő szálát megszekvenáltattuk. Az így nyert fragmentek szekvenciáit összevettem a nemzetközi adatbázisban (<https://pubmlst.org>) található megfelelő alléllal, mely eredményeként megkaptam a törzsek allélikus profilját. A meghatározott allélok kombinációja alapján a hét génszakasz esetében pedig megállapítható az adott törzs szekvencia típus száma (ST). Az adott törzs ST száma alapján az adatbázissal történő összehasonlítás eredményeként meghatározható a különböző helyekről izolált törzsek közti filogenetikai kapcsolatrendszer. A goeBURST 1.2.1. algoritmust használtunk a meghatározott szekvencia-típusok csoportosításához (Francisco és mtsai 2009, Feil és mtsai 2004).

9. Táblázat: *E. faecium* MLST során használt primerek

Primer	Szekvencia (5' → 3')	Gén	PCR termék (bp)
adk1 (+)	TAT GAA CCT CAT TTT AAT GGG	<i>adk</i>	437
adk2 (-)	GTT GAC TGC CAA ACG ATT TT		
atpA1 (+)	CGG TTC ATA CGG AAT GGC ACA	<i>atpA</i>	556
atpA2 (-)	AAG TTC ACG ATA AGC CAC GG		
ddl1 (+)	GAG ACA TTG AAT ATG CCT TAT	<i>ddl</i>	465
ddl2 (-)	AAA AAG AAA TCG CAC CG		
gdh1 (+)	GGC GCA CTA AAA GAT ATG GT	<i>gdh</i>	530
gdh2 (-)	CCA AGA TTG GGC AAC TTC GTC CCA		
gyd1 (+)	CAA ACTGCT TAG CTC CAA GG C	<i>gyd</i>	395
gyd2 (-)	CAT TTC GTT GTC ATA CCA AGC		
purK1 (+)	GCA GAT TGG CAC ATT GAA AGT	<i>purK</i>	495
purK2 (-)	TAC ATA AAT CCC CCT GTT TY		
pstS1 (+)	TTG AGC CAA GTC GAA GCT GGA G	<i>pstS</i>	583
pstS2 (-)	CGT GAT CAC GTT CTA CTT CC		

+, sense primer; -, antisense primer; Y=C/T

10. Táblázat: MLST PCR reakció esetén az összetevők

Összetevők	Mennyiség
HotStar Taq MasterMix	25µl
Primer pár (forward ill. reverz primerek 4pmol/µl oldata)	10µl
Steril H ₂ O	14µl
Templát (DNS lizátum)	1µl

Az inkubációs ciklus jellemzői:

1. 95°C – 15 perc
 2. 94°C – 30 másodperc
 3. 50°C – 30 másodperc
 4. 72°C – 30 másodperc
 6. 72°C – 5 perc
 7. 4°C – ∞
- } 35 ciklus

5.2.8. Epidemiológiai adatok elemzése

A VRE pozitív székletmintával rendelkező betegek esetében a szűrést megelőző 6 hónapig visszamenőleg a betegadataikat a következő tényezők alapján vizsgáltuk: életkor, nem, alapbetegség, a kórházi tartózkodás időtartama, antibiotikum-fogyasztás, intravénás katéter, dialízis, nazogastrikus cső, tracheostoma illetve lélegeztető gép használata, normál bélflóra hiánya és toxin pozitív *Clostridioides difficile* lelet jelenléte. A szűrővizsgálatot megelőző és az azt követő 6 hónapban az adatbázisunkban (MedBakter) elemeztük a VRE-t hordozók bármely más VRE pozitív klinikai mintáját is. A hordozást elősegítő rizikó faktorok meghatározása céljából ugyanezen időszakból 93 széklet VRE negatív beteg jellemzőit is vizsgáltuk. Ebbe a populációba a betegeket Monte-Carlo szimulációval választottuk ki véletlenszám-generáció alapján. Az orvosi adatokat az SPSS szoftver 24.0 verziójával (SPSS Inc.) értékeltük. A VRE-vel történő kolonizáció eredményét bináris kategorikus változóként fejeztük ki. Az összes kategorikus változót Khi-négyzet próbával elemeztük. Ha az összes várható értékfrequencia nem

volt egyenlő, vagy nagyobb volt, mint 5 akkor Fisher-féle valószínűség-tesztet alkalmaztunk, míg a logisztikus regressziót alkalmaztuk a folyamatos független változók és kategorikus paraméterek meghatározására. A 0,05-nél alacsonyabb p-értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. Esély hányados tesztet alkalmaztunk a kockázati tényezők és a VRE kolonizáció közötti kapcsolat meghatározására.

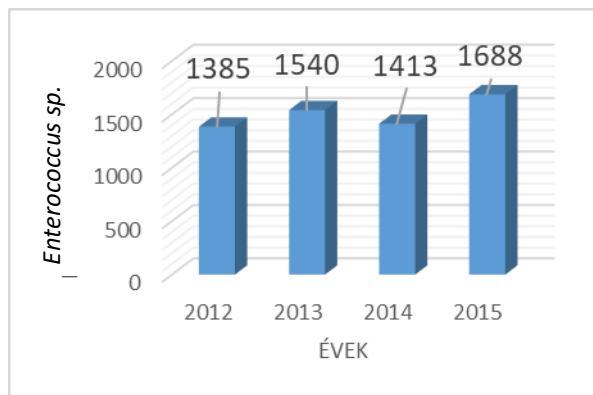
5.2.9. Esp és biofilmképzés közötti kapcsolat elemzése

Az adatok értékelését az SPSS szoftver 24.0 verziójával végeztük (SPSS Inc.). A 0,05-nél kisebb p-értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Khi-négyzet próbát végeztünk az *esp* gén jelenléte és a biofilm pozitivitás közötti kapcsolat megvizsgálására. Továbbá az esély hányados teszt alkalmazásával meghatároztuk a biofilm termelés esélyét abban az esetben amennyiben az *esp* gén jelen van.

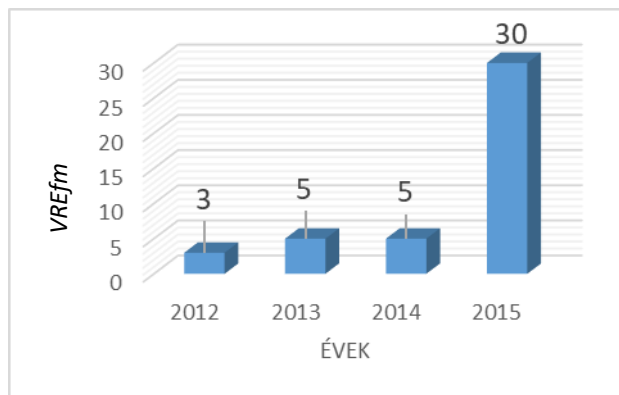
6. EREDMÉNYEK

6.1. Klinikai mintákból származó VRE törzsek jellemzése

A négyéves kutatási időszak alatt összesen 7799 Enterococcust izoláltunk különféle klinikai mintákból. Ezek közül 73 nőtt ki a VRE Screen lemezen, melyek 43 betegtől származtak. A MALDI-TOF MS-sel történő faji azonosításuk során magas score értékkel ($> 2,0$) sikerült kimutatni, hogy az összes VRE *Enterococcus faecium* volt. A 3. ábrán látható évek szerint lebontva az összes Enterococcus izolátum előfordulása, míg a 4. ábrán megfigyelhetjük, hogy 2012-ben 3, 2013-ban és 2014-ben 5, 2015-ben pedig már 30 VRE_{fm} törzset tudtunk kimutatni. Az azonos betegtől származó ismétlődő izolátumokat kizártuk a statisztikai elemzésből.

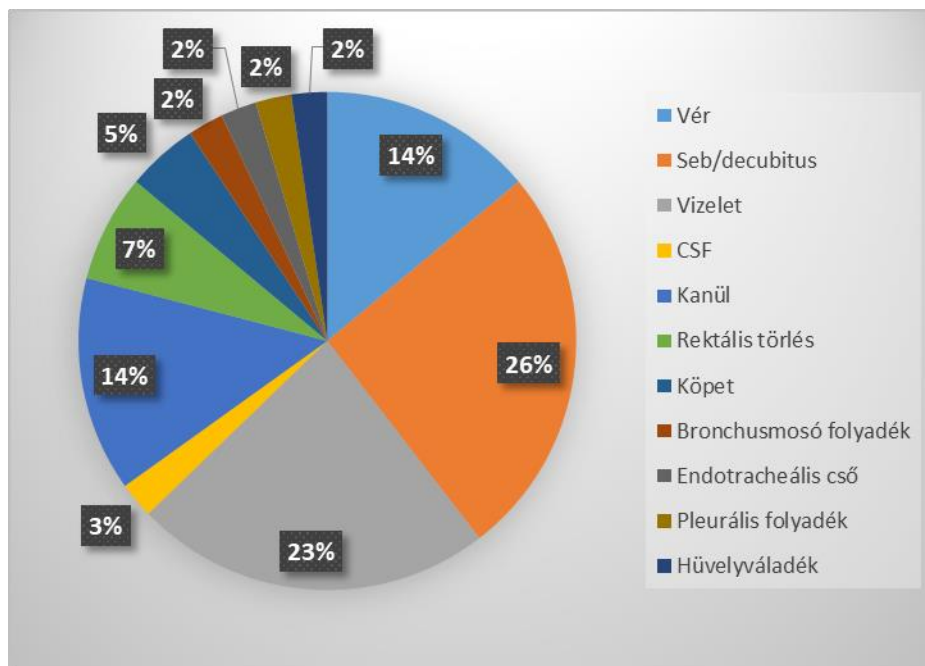


3. ábra: Összes Enterococcus izolátum előfordulása a Debreceni Egyetem Klinikáin



4. ábra: VRE_{fm} előfordulása a Debreceni Egyetem Klinikáin

A VRE_{fm} törzsek legnagyobb hányadát sebből/decubitusból (26%), vizeletből (23,3%), vérből és kanülből (14-14%) izoláltuk, míg 3 törzs származott rektális törlésből, 2 köpetből és 1-1 CSF- ből (cerebrospinális folyadék), bronchusmosó folyadékból, endotracheális csőből, pleurális folyadékból és hüvelyből (5. ábra).



5. ábra: A 43 VRE izolátum mintánkénti megoszlása

A betegek átlag életkora 57 év volt, majdnem azonos nemek szerinti megoszlással (férfiak: 51,2%, nők: 48,8%).

6.1.1. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredményei

Az izolátumok érzékenységét kilenc antimikrobiális szerrel szemben vizsgáltuk, Kirby-Bauer féle korrondiffúzióval, illetve E-teszt alkalmazásával. Az összes izolátum rezisztens volt vancomycinnel, ampicillinnel és ciprofloxacinnel szemben, míg 81,4%-uk gentamicinnel szemben is. A törzsek 7%-a mutatott rezisztenciát a teicoplanin iránt. Az újabb antibiotikumokkal szemben: linezolid, tedizolid, tigecyclin és daptomycin mind fogékonyak voltak (11. táblázat).

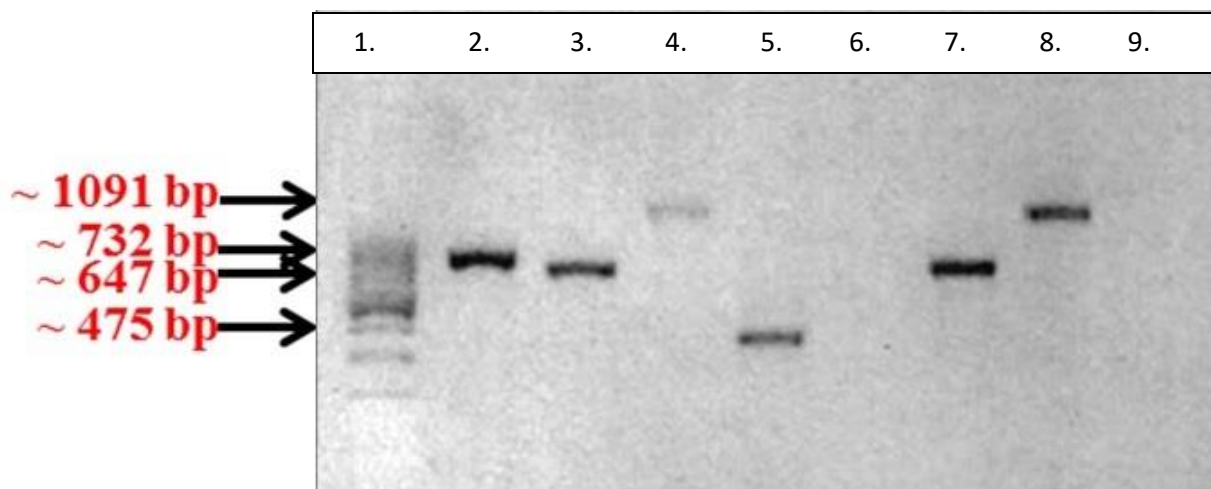
11. Táblázat: VRE törzsek antibiotikum rezisztenciája

Antibiotikumok	<i>E. faecium</i> n (%)	
	É	R
Ampicillin	-	43 (100)
Gentamycin	8 (18.6)	35 (81.4)
Ciprofloxacin	-	43 (100)
Vancomycin	-	43 (100)
Teicoplanin	40 (93)	3 (7)
Linezolid	43 (100)	-
Tedizolid	43 (100)	-
Daptomycin	43 (100)	-
Tigecyclin	43 (100)	-

É: érzékeny, R: rezisztens

6.1.2. Vancomycin-rezisztencia gének illetve virulencia faktorok kimutatása

A rezisztenciagének detektálásához alkalmazott specifikus PCR reakciókat Depardieu és mtsai, alapján végeztük. A reakcióelegyek egyaránt tartalmazták a rezisztenciagénekre, valamint az *E. faecium* és *E. faecalis* D-alanin-D-alanin ligáz (ddl) génekre specifikus primer párokat (Depardieu és mtsai. 2004) (6. ábra). A ddl gén-specifikus PCR megerősítette a MALDI-TOF MS által történt faji azonosítás eredményeit.



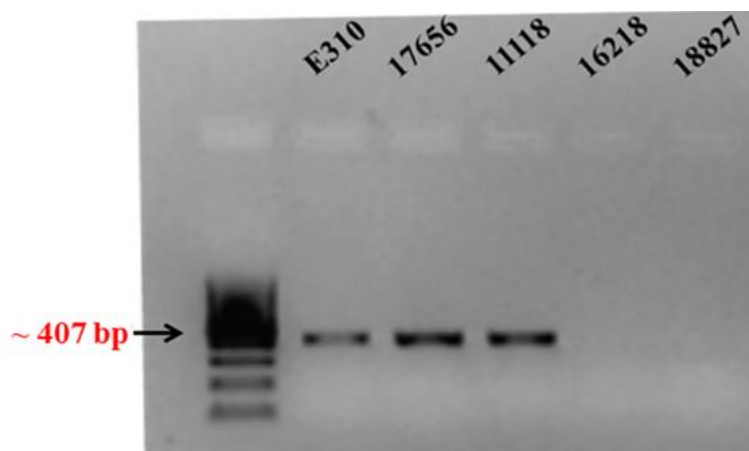
6. ábra: 2528-as minta vizsgálata *vanA*, *vanB* és *E. faecium*-, *E. faecalis*-ddl specifikus PCR reakcióval. 1. oszlop 100bp DNS létra, 2. oszlop *vanA* (732 bp) pozitív kontroll, 3. oszlop *vanB* (647 bp) pozitív kontroll, 4. oszlop *E. faecium* (1091 bp) és 5. oszlop *E. faecalis* (475 bp) pozitív kontroll. 6-9. oszlop 2528-as minta (*vanB* pozitív *E. faecium*).

A 43 *VREfm* izolátum közül 40-nél mutattunk ki *vanB* (93%) 3 esetében pedig *vanA* (7%) rezisztenciagént (7. ábra). A *vanB* pozitív izolátumok magas szintű rezisztenciát mutattak a vancomycinnel szemben, de érzékenyek voltak a teicoplaninra, míg a *vanA* pozitív izolátumok mindkét antibiotikummal szemben magas szintű rezisztenciát mutattak (10. táblázat)



7. ábra: *vanA* és *vanB* törzsek előfordulása

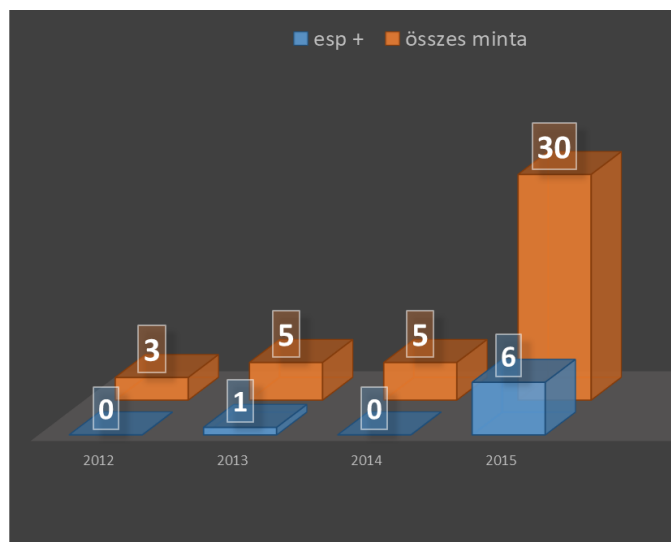
Az *Esp* fehérjét kódoló gén (8. ábra) 7 (16,3%) izolátumban volt jelen, amelyeket különféle invazív és nem invazív helyekről származó mintákból nyertünk: vérből, kanülből, cerebrospinális folyadékból, bronchusmosásból, köpetből, vizeletből és decubitusból.



Specifikus PCR termék: 407 bp

8. ábra: 17656-os, 11118-as és 18827-es minták vizsgálata *esp* virulencia faktor jelenlétére PCR reakcióval. 1. oszlop 100bp DNS létra, 2. oszlop E310-es *esp* pozitív kontroll, 3. oszlop 17656 *esp* pozitív törzs, 4. oszlop 11118 *esp* pozitív törzs, 5. sor 16218 *esp* negatív törzs, 18827 *esp* negatív törzs

A 4 éves vizsgálati időszakban az *esp* pozitív törzsek megoszlását a 9. ábra szemlélteti.

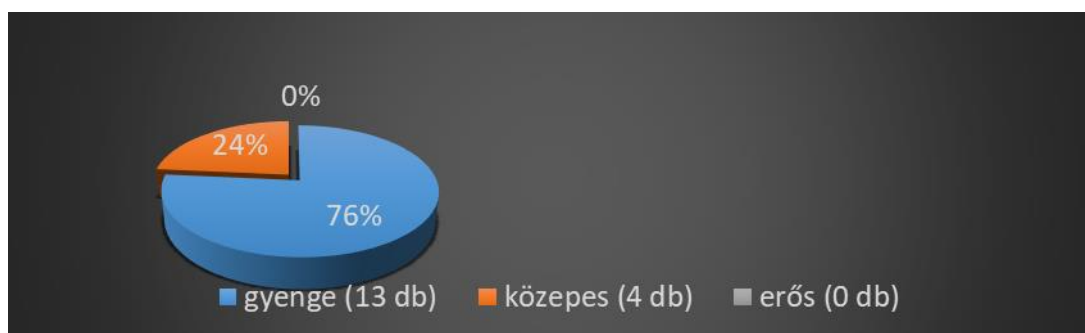
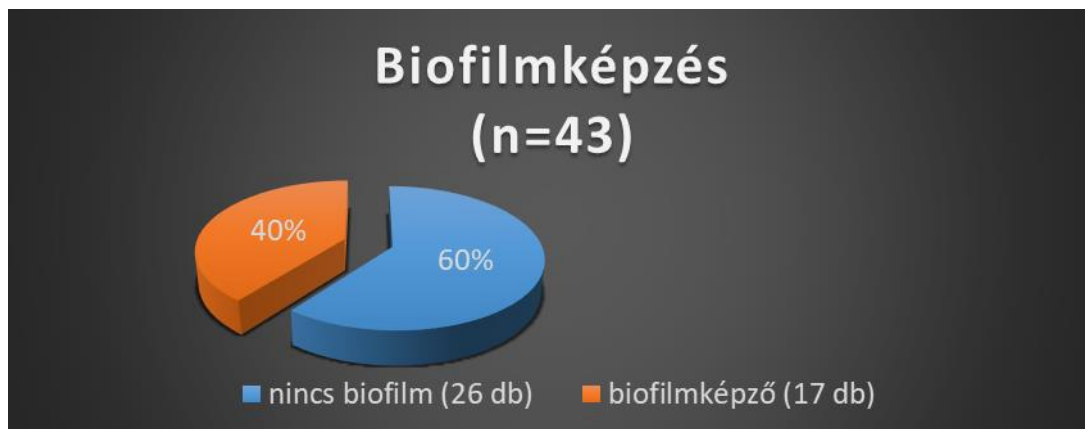


9. ábra: *Esp* pozitív törzsek megoszlása az adott évben izolált összes VRE izolátumhoz hasonlítva.

Egyik izolátum sem nem adott PCR-terméket a *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *ace* vagy *agg* specifikus primerekkel.

6.1.3. Biofilmképzés

A vizsgált izolátumok 40%-a volt biofilmképző. A 43 izolátum közül egyik sem bizonyult erős biofilmképzőnek, 4 (24%) volt közepes, míg 13 (76 %) bizonyult gyenge biofilmképzőnek (12. ábra).



10. ábra: Biofilm lépzés vizsgálata a 43 VREfm törzs esetében

A biofilm képzők 71,4% (5/7) volt invazív, 33,3% (12/36) nem invazív mintából származó törzs. A Khi-négyzet próba alapján nem volt statisztikailag szignifikáns korreláció a biofilm termelése és az izolációs hely között ($p = 0,059$). Az *esp* virulencia gén és a biofilm képzése közötti összefüggést a 12. táblázatban láthatjuk. Összefüggést találtunk 90%-os megbízhatósággal ($p = 0,059$) az *esp* gén jelenléte és a biofilm termelés között. A kontingencia táblázat elemzése gyenge összefüggést mutatott ($C = 0,28$). Az esélyhányados teszt alapján ötször nagyobb az esély a biofilmtermelésre, ha az *esp* gén jelen van. Két izolátum hordozta az *esp* gént, de nem alakult ki biofilm, míg tizenkét izolátum volt biofilmtermelő anélkül, hogy a vizsgált virulenciagéneket hordozták volna (12. táblázat).

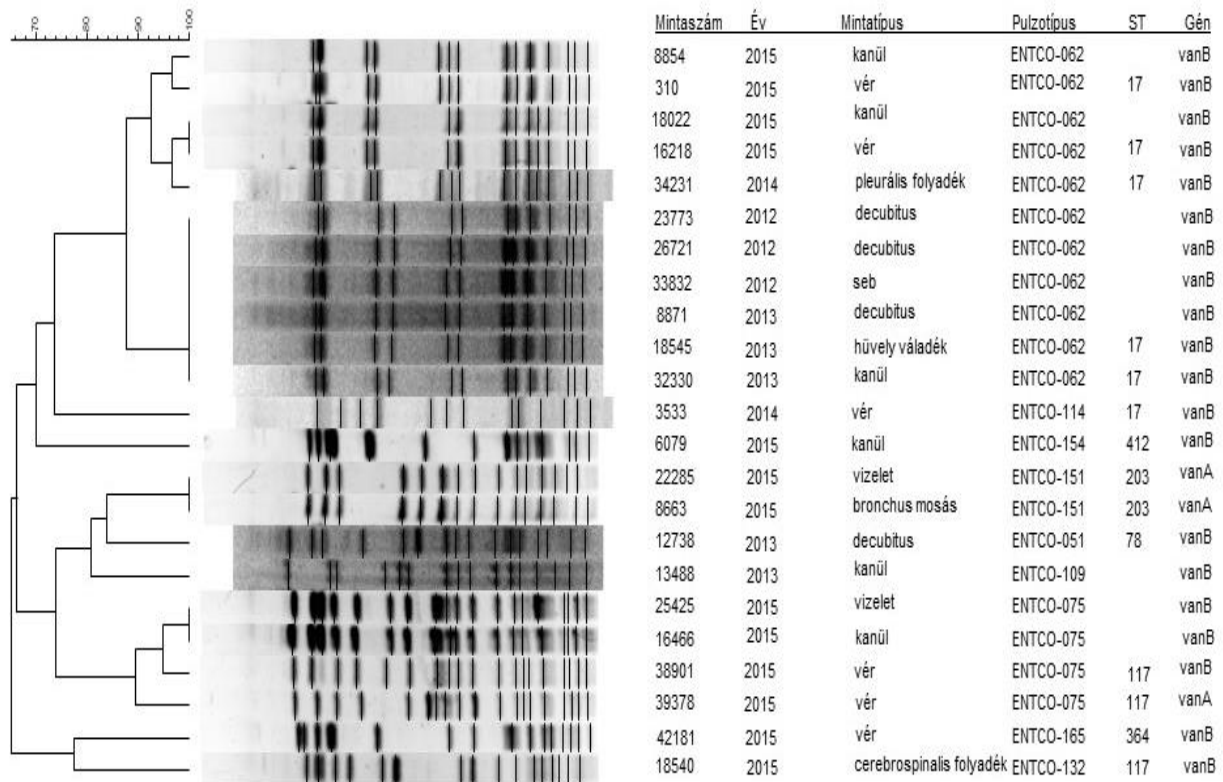
12. Táblázat: A különböző típusú minták biofilm termelése és a virulenciagének gyakorisága közötti kapcsolat

Minta (n=43)		Biofilm termelés				Virulencia gén			Biofilm +esp ⁺
		Erős	Közepes	Gyenge	Nincs	esp	ace	agg	
Invasív	Vér (n=6)	0	1	3	2	1	0	0	1
	CSF (n=1)	0	0	1	0	1	0	0	1
Nem invazív	Vizelet (n=10)	0	1	4	5	1	0	0	1
	Seb/decubitus (n=11)	0	0	3	8	1	0	0	0
	Kanül (n=6)	0	1	0	5	1	0	0	0
	Rektális törlés (n=3)	0	0	1	2	0	0	0	0
	Hüvely váladék (n=1)	0	0	0	1	0	0	0	0
	Pleurális folyadék (n=1)	0	0	0	1	0	0	0	0
	Köpet (n=2)	0	1	0	1	1	0	0	1
	Endotracheális tubus (n=1)	0	0	0	1	0	0	0	0
	Bronchus mosás (n=1)	0	0	1	0	1	0	0	1

6.1.4. Epidemiológiai vizsgálatok eredményei

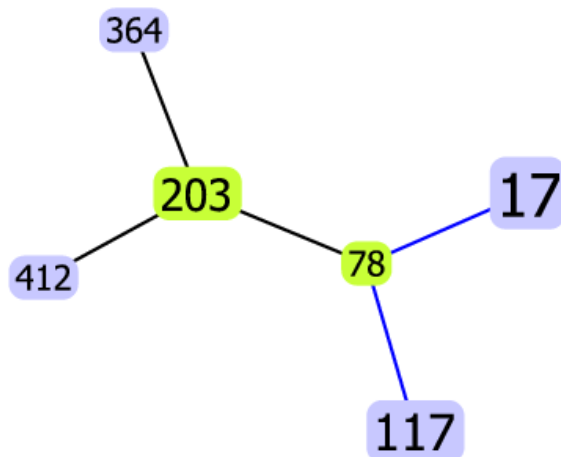
A VRE törzsek genetikai rokonsági kapcsolatainak feltárásához pulzáló erőterű gélelektroforézist használtunk (11. ábra). A PFGE mintázatokat Tenover és mtsai (1995) alapján elemeztük ki. PFGE vizsgálatokat a 2012 és 2013-ból származó összes törzs esetében, a további években csak az invazív helyekről származóak esetében végeztük el. Az így kiválasztott 23 *VREfm* izolátum 9 PFGE-típust tárt fel, $\geq 85\%$ -os hasonlósági határérték alapján (11. ábra). A fő pulzotípus az ENTCO-062 volt, ebbe a típusba 11 izolátum tartozott. A pulzotípuson belül minden egyes izolátum a *vanB* rezisztencia gént hordozta. A második leggyakoribb az ENTCO-075 volt, melybe 4 izolátum tartozott, melyből 3 hordozta a *vanB*, 1 a *vanA* rezisztencia gént. A harmadik leggyakoribb az ENTCO-151, 2 *vanA* izolátummal. A 6 további PFGE típus

mindegyike egyetlen izolátummal jelent meg. A teljes vizsgálati időszak alapján megfigyelhettük, hogy 2012 és 2014 között a fő PFGE pulzotípus az ENTCO-062 volt, míg 2015-ben az izolátumok már változatos pulzotípusokat mutattak (11. ábra).



11. ábra: A 23 *VREfm* PFGE dendrogramja, MLST szekvencia típusa és a hordozott vancomycin rezisztencia génje

MLST vizsgálatra 14 *VREfm* izolátumot választottunk ki, mely alapján 6 különböző szekvenciatípust (ST) tudtunk elkülöníteni. A domináns ST a ST17 volt melybe 6 *vanB* rezisztencia gént hordozó izolátum tartozott. A további szekvencia típusok az ST117: 2 *vanA* és 1 *vanB* izolátummal, az ST203:2 *vanA* izolátummal, az ST78, az ST412, és az ST364 egy-egy *vanB* izolátummal. Mindegyik szekvencia típus a 17-es klonális komplexhez (CC17) tartozik, mely a nosokomiális *E. faecium* törzsekre jellemző (12. ábra). A meghatározott ST-ok csoportosításához a goeBURST 1.2.1. algoritmust használtuk.



12. ábra: Az MLST típusok goeBURST algoritmussal történő klaszterezése. Minden csomópont egy ST-t képvisel, a csomópontok mérete tükrözi az ST-n belüli izolátumok számát. A csoport alapítói világos zöld színűek; A kék színű vonalak a single locus variánsokat jelzik, a feketék a double locus variánsokat.

6.2. Székletből izolált VRE törzsek jellemzése

Az első vizsgálati időszakban összesen 2050 széklet mintát vizsgáltunk szilárd VRE Screen lemez használatával. Ezek közül 313 minta (15%) esetében tapasztaltunk fekete színű telep növekedést a VRE Screen lemezen. Ez természetesen nem egyezik meg a VRE hordozás arányával, ugyanis más, generikusan vancomycin rezisztens fajok, például *Lactobacillus*, *Pediococcus* vagy *Weissella* is képes növekedést mutatni ezen a szűrőlemezen. Továbbá néhány normál bélflórához tartozó Gram-negatív baktérium, illetve gomba is kitenyészett. Ezért a vizsgálataink további részére a MALDI-TOF mérésekhez csak 266 izolátumot választottunk ki telep morfológiájuk alapján. A második vizsgálati időszakban 971 széklet mintát szűrtünk VRE dúsító tápfolyadék használatával. Közülük 469 (48%) okozta a dúsító folyadék feketedését, véres agarral történő kioltásukat követően makroszkopikus morfológiájuk alapján 264 izolátumot választottunk ki a MALDI-TOF-al történő faji azonosításhoz. 2 kolonizált beteg esetében, két egymást követő mintájukból különféle VRE fajokat tudtunk elkülöníteni, 7 minta esetében pedig ugyanazon mintából két különböző enterococcus faj tenyészett ki. Mindegyik esetet egymástól függetlenül pozitívnak tekintettük, így összességében a teljes vizsgálati időszakot tekintve 102 VRE pozitív székletmintával dolgoztunk, melyek 93 betegről származtak.

6.2.1. Enterococcus törzsek azonosítása, antibiotikum rezisztenciája

MALDI TOF-al történő faji azonosítás alapján 71 törzs *Enterococcus faecium*-nak bizonyult. Érdekes módon a második leggyakoribb faj az *E. gallinarum* (n = 23) volt, melyet 5 *E. faecalis*, 2 *E. casseliflavus* és 1 *E. hirae* követett (13. táblázat). Az *E. faecium* izolátumok közül 33 volt *vanA* és 38 *vanB* pozitív. Csak 4 *vanA* és 1 *vanB* pozitív *E. faecalis* törzset mutattunk ki. Az egyetlen *E. hirae*-ről kiderült, hogy *vanA* pozitív. Természetesen az összes *E. gallinarum* hordozta a *VanC1* rezisztencia gént és az összes *E. casseliflavus* pedig a *VanC2* gént. A *VanB* pozitív izolátumok magas szintű rezisztenciát mutattak a vancomycinnel szemben (medián MIC > 256 µg / ml) és érzékenyek voltak a teicoplanin iránt, míg a *vanA* pozitív izolátumok mindkét antibiotikummal szemben magas szintű rezisztenciát mutattak (medián vancomycin MIC > 256 µg / ml; medián teicoplanin MIC = 32 µg / ml) (12. táblázat). Az összes *vanC* törzs alacsony szintű vancomycin rezisztenciát mutatott (medián MIC = 4-6 µg / ml), és mind érzékenyek voltak a teicoplaninra. Szerencsére az összes izolátum érzékeny volt az újabb antibiotikumokra, például a linezolidra, a tigecyclinre és a daptomycinre. Quinupristin/dalfopristin rezisztenciát négy *E. faecalis* izolátumban tudtunk detektálni (3,9%) (13. táblázat).

13. Táblázat: A székletmintákból származó VRE törzsek antibiotikum rezisztenciája

Faj (db)	MIC arány µg/mL (Rezisztencia %)					Q/D
	Van	Tei	Lin	Dap	Tig	
<i>E. faecium</i> (71)	6-256 (100)	0.125-256 (47.9)	0.5-1 (0)	0.5-2 (0)	0.032-0.125 (0)	0.25-4 (0)
<i>E. gallinarum</i> (23)	4-6 (100)	0.125-0.5 (0)	0.25-1 (0)	0.5-2 (0)	0.032-0.125 (0)	0.5-4 (0)
<i>E. faecalis</i> (5)	>256 (100)	0.125 -256 (80)	0.5-1 (0)	0.125-1 (0)	0.032-0.125 (0)	4-8 (80)
<i>E. casseliflavus</i> (2)	6 (100)	0.125 (0)	0.5-1 (0)	0.5-1 (0)	0.064 (0)	1-2 (0)
<i>E. hirae</i> (1)	>256 (100)	32 (100)	1 (0)	2 (0)	0.032 (0)	4 (0)

MIC: minimális gátló koncentráció; Van, vancomycin; Tei, teicoplanin; Lin, linezolid; Dap, daptomycin; Tig, tigecycline; Q/D, quinupristin/dalfopristin.

6.2.2. VRE törzset hordozó betegek epidemiológiai jellemzői

A betegek jellemzőit a 14. táblázat foglalja össze. A VRE hordozók életkora 8 hónap és 102 év között volt, az átlagéletkor 47 év volt. A többségük (71%) felnőtt volt, valamint kissé női dominancia volt megfigyelhető (59,1%). A VRE szűrést megelőző 6 hónapban az átlag kórházi tartózkodásuk 25 nap volt. Csak 7 VRE hordozó volt járóbeteg. A leggyakrabban előforduló alapbetegségek a rosszindulatú daganatok (22,6%), a cukorbetegség és a különböző eredetű fertőzőes megbetegedések (21,5%) voltak. A vizsgált rizikó faktorok közül a normál bélflóra hiányt 24,7% -ban találtunk, 18 (19,4%) VRE hordozó esetében mutattunk ki *C. difficile* toxin pozitív infekciót legalább egyszer a szűrés időpontjában vagy az azt megelőző 6 hónapban. A mesterséges lélegeztetés alkalmazása szintén gyakori volt (10,8%) (14. táblázat).

A 93 kolonizált és nem kolonizált beteg statisztikai elemzése kimutatta, hogy a cukorbetegség, a normál flóra hiány, a *C. difficile* pozitivitás, a hosszabb kórházi tartózkodás és az előrehaladott életkor szignifikánsan hozzá társul a VRE kolonizációjához. A legnagyobb esély cukorbetegség esetén fordult elő. A VRE hordozás pozitivitási esélye ezekben a betegekben 12,46-szoros. (14. táblázat).

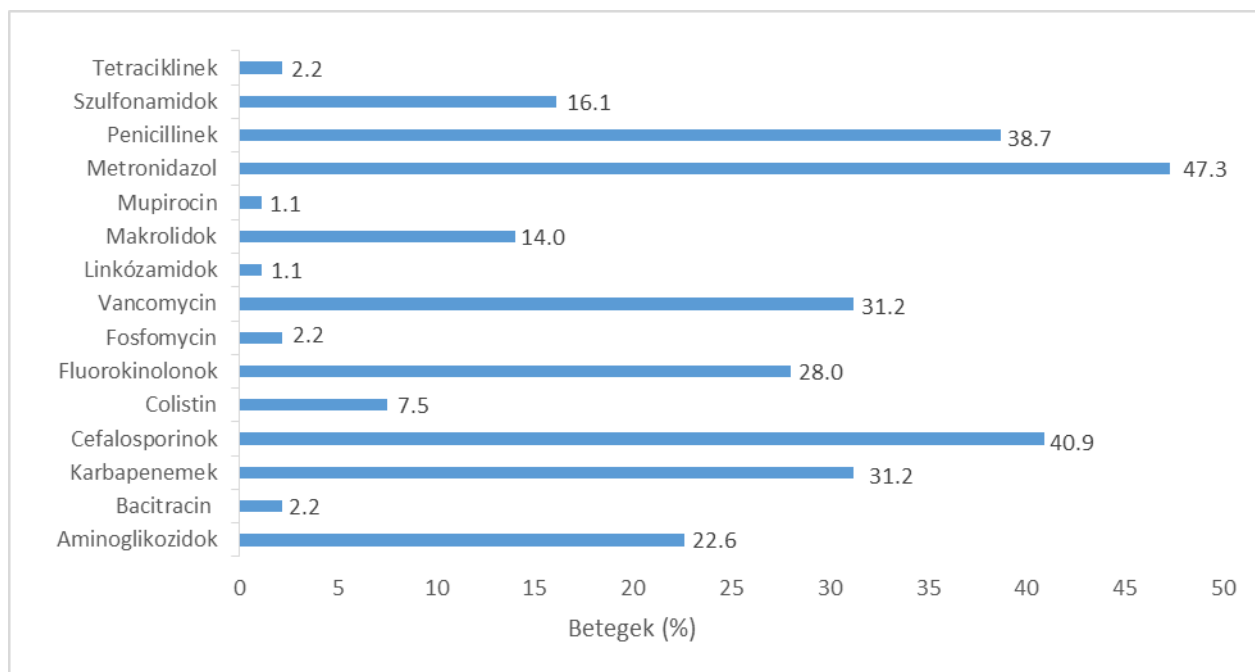
14. Táblázat: VRE kolonizációval kapcsolatos betegek jellemzői

Betegek jellemzői	VRE kolonizált n=93 (%)	VRE nem kolonizált n=93 (%)	OR (95% - CI)	p-érték
Kor, (évek, átlag ± SD)*	47 ± 34.2	29 ± 32.7	1.016 (1.007 – 1.025)	<.0001
Nő arány	55 (59.1)	49 (52.7)	1.299 (0.727 – 2.321)	0.37
Kórházi tartózkodás (napok, átlag, arány)*	25, 0 – 215	11, 0 – 70	1.042 (1.024 – 1.060)	<.0001
Alapbetegség				
Cukorbetegség*	20 (21.5)	2 (2.2)	12.46 (2.822 – 55.08)	<.0001
Szív és érrendszeri	9 (9.7)	6 (6.4)	1.55 (0.529 – 4.554)	0.420
Rosszindulatú daganat	21 (22.6)	13 (14)	1.79 (0.838 – 3.843)	0.129
Májcirrhosis	2 (2.2)	2 (2.2)	1 (0.137 – 7.253)	1
Légzési elégtelenség	3 (3.2)	2 (2.2)	1.51 (0.247 – 9.293)	0.5
Gastrointesztinális	4 (4.3)	7 (7.5)	0.55 (0.156 – 1.953)	0.26
Fertőzés ¹	20 (21.5)	58 (62.7)	0.16 (0.086 – 0.316)	<.0001
Vese elégtelenség	7 (7.5)	1 (1.1)	0.133 (0.016 – 1.107)	0.032
Egyéb ²	7 (7.5)	2 (2.2)	0.27 (0.054 – 1.335)	0.08
Rizikó faktorok				
Intravénás katéter	5 (5.4)	14 (15)	0.32 (0.110 – 0.930)	0.029
Dialízis	3 (3.2)	1 (1.1)	3.06 (0.313 – 30.035)	0.31
Nasogastricus szonda	3 (3.2)	4 (4.3)	0.7417 (0.161 – 3.409)	0.5
Tracheostomia	6 (6.5)	1 (1.1)	6.34 (0.748 – 53.778)	0.059
Mesterséges lélegeztetés	10 (10.8)	6 (6.4)	1.74 (0.607 – 5.021)	0.296
Normal flora hiány*	23 (24.7)	4 (4.3)	7.31 (2.412 – 22.118)	0.0001
<i>C. difficile</i> pozitivitás*	18 (19.4)	8 (8.6)	2.55 (1.048 – 6.202)	0.0344

SD, standard deviation (szórás) 1: bronchitis, pneumonia, húgyúti infekciók, hasmenés, szepszis, vírusos fertőzések, toxikus shock szindróma, újszülöttkori distressz szindróma 2: hipovolémia, aplasztikus anémia, elektrolit zavar, hepatosplenomegália, hipogammaglobulinémia, szisztémás lupus erythematosus.

*: szignifikáns kapcsolat a VRE kolonizációval

A VRE kolonizált betegek 78,5% -a kapott legalább egyféle antibiotikumot a székletminta szűrését megelőző 6 hónapban. Közülük a metronidazolt használták a leggyakrabban (47,3%), majd a különböző cefalosporinokat (40,9%) (13. ábra).



13. ábra: 93 VRE kolonizált beteg antibiotikum fogyasztása a szűrést megelőző 6 hónapban

6.2.3. Szűrő módszerek jellemzése

A VRE szilárd Screenel és dúsító táptalajjal végzett szűréseink eredményeit a 15. táblázat tartalmazza. Az első vizsgálati időszakban a szilárd screen 2050 székletmintából 46 VRE-t (2,2%) azonosított, míg a második időszakban a VRE dúsító táptalaj 56 VRE-t (5,8%) tudott detektálni 971 székletből. Érdekes módon, a második időszakban 1 vancomycin rezisztens *E. hirae*-t is sikerült azonosítani.

15. Táblázat: VRE izolátumok detektálása szilárd és folyékony dúsító használatával

Izolált törzsek	1. Vizsgálati időszak VRE Screen lemez (2050 minta)	2. Vizsgálati időszak Folyékony VRE dúsító (971 minta)
<i>E. faecium</i> (n=71)	27	44
<i>E. gallinarum</i> (n=23)	15	8
<i>E. faecalis</i> (n=5)	3	2
<i>E. casseliflavus</i> (n=2)	1	1
<i>E. hirae</i> (n=1)	0	1
Összesen:	46 (2,2 %)	56 (5,8 %)

7. MEGBESZÉLÉS

Magyarországon az első, az egészségügyi ellátással összefüggő VRE jáványt egy *vanB* izolátum okozta 2004-ben egy hematológiai és összejt transzplantációs osztályon (Böröcz és mtsai 2005). Ezt követően Libisch és mtsai (2008) jellemezték a magyarországi és szerbiai VRE klinikai izolátumokat, és dokumentálták a CC17 előfordulását. Azóta csak néhány ilyen jellegű magyar felmérést tettek közzé, amelyek az állattenyésztésből származó izolátumokat vizsgálták (Ghidán és mtsai. 2008, Dolka és mtsai. 2016). Korábban kutatócsoportunk felmérte a VRE prevalenciáját 2004 és 2009 között a Debreceni Egyetem klinikáin, és megállapította, hogy a *VanC* pozitív *E. gallinarum* és *E. casseliflavus* törzsek dominálnak (Dombrádi és mtsai. 2012). Azóta ez a kép megváltozott. Az ECDC legfrissebb adatai rámutattak az invazív *VREfm* 2012 és 2018 közötti jelentős növekedésére (ECDC 2018). Ezen jelentés alapján, Magyarországon az invazív izolátumok száma 3,5% -ról 39,5% -ra emelkedett. Hasonló tendenciákat jelentettek a szomszédos országokból, ahol a *VREfm* izolátumok aránya szintén nőtt; Szlovákiában 4,9% -ról 32,3% -ra, Romániában 2,9% -ról 40,3% -ra és Horvátországban 0-ról % 25,4%-ra. Az országosan emelkedő tendenciával összhangban mi is hasonló figyeltünk meg a keleti régióban található oktató kórházunkban, ahol az invazív és nem invazív *VREfm* aránya 2011 és 2015 között 1,7% -ról 11% -ra emelkedett (Franyó és mtsai. 2018).

A vancomycin rezisztenciagének eloszlása tekintetében ismert, hogy az Egyesült Államokban a *vanA* dominál, míg Ausztráliában a *vanB* gyakoribb, Európában azonban mind a *vanA*, mind a *vanB* pozitív VRE megtalálható (Howden és mtsai. 2013). Magyarországon a VRE prevalenciája 2011 óta növekszik, többségük *vanA* rezisztencia gént hordozó *E. faecium*, a második leggyakoribb pedig a *vanB*-t hordozó *E. faecium*. Érdekes, hogy vizsgálatunk során csak 3 izolátum adta a várható 1030 bp-os amplifikációs terméket a *vanA*-specifikus primerekkel. Ezek az izolátumok mind a teicoplaninnal, mind a vancomycinnel szemben rezisztensnek bizonyultak az antibiotikum érzékenységi vizsgálatainkban. A fennmaradó 40 izolátum a *vanB* rezisztencia gént kódolta, tehát érzékeny volt teicoplaninra.

A klinikai mintákból származó *VREfm* izolátumaink multirezisztensnek bizonyultak. Az ampicillin-rezisztencia gyakorisága 100% volt, a törzsek nagy százaléka szintén rezisztenciát mutatott a gentamicinnel szemben (81,4%). Az aminoglikozidok (gentamicin) és a sejtfalat

támadó aktív szerek (ampicillin) közötti szinergizmus elmaradása miatt ez komoly probléma, mivel csökkenti az enterococcus fertőzések lehetséges kezelési lehetőségeit. Ez a rezisztencia arány hasonló az Iránban tapasztaltakhoz (Arshadi és mtsai. 2017), viszont még mindig alacsonyabb, mint Koreában, ahol a gentamicin rezisztencia egy tanulmány alapján 95,2% volt (Oh és mtsai. 2005). Oh és mtsai. azt is kimutatták, hogy az összes általuk izolált VRE rezisztens volt ciprofloxacinnal szemben, melyet mi is megfigyeltünk a klinikai izolátumainknál. A VRE megjelenése és gyors elterjedése miatt az újabb antibiotikumok, mint a linezolid, a tedizolid, a tigecyclin és a daptomicin használata megnövekedett. Linezolid rezisztens VRE-ről már beszámoltak Németországból, Görögországból, Írországból, az Egyesült Államokból és Brazíliából is (Krull és mtsai. 2016, Souli és mtsai. 2009, O'Driscoll és mtsai. 2015, Gonzales és mtsai. 2001, Zurenko és mtsai. 1999, De Almeida 2014). Egy 5 éves felmérés alapján -melyet az Egyesült Államokban és európai kórházakban közösen végeztek- megfigyelték, hogy a *VREfm* izolátumok több mint 97%-a továbbra is fogékony a tigecyclinnel és daptomicinnal szemben (Bensaci és mtsai. 2017). Ugyanez a cikk megállapítja, hogy noha jelenleg nincsenek jóváhagyott EUCAST határértékek a tedizolidra vonatkozóan, a szer továbbra is aktív minden enterococcus faj esetében. Német kutatók által gyűjtött 73 *E. faecium* és *E. faecalis* törzs vizsgálata bebizonyította, hogy a tigecyclin 3 éven belül használhatatlan lesz a törzsekkel szemben (Fiedler és mtsai. 2016). Kelesidis és mtsai (2011), egy irodalmi kutatást végeztek, mely alapján a daptomicin rezisztencia aránya 1% volt a VRE-k körében. Saját kutatásunkban a fent említett antibiotikumokat találtuk a leghatékonyabb szereknek az izolátumokkal szemben.

A vizsgált virulencia faktorok közül az Ace-t kódoló gén, amely hasonló a *Staphylococcus aureus* törzsben fellelhető egyik kollagén-kötő proteinhez (Nallapareddy és mtsai. 2000), egyik vizsgált törzsben sem fordult elő. Ez megegyezik más kutatócsoportok korábbi megállapításaival, melyek leírják, hogy csak az *E. faecalis*-ban találták meg (Dupré és mtsai. 2003, Cariolato és mtsai. 2008, Chajacka-Wierzchowska és mtsai. 2017). Hasonlóképpen, a vizsgált *VREfm* izolátumok egyike sem hordozta az *agg* gént, szintén összhangban más szerzők eredményeivel (Soares és mtsai 2014, Eaton és Gasson 2001). Cariolato és mtsai ezt a gént túlnyomó részt *E. faecalis* esetében azonosították (Cariolato és mtsai. 2008). Vizsgálatunkban az *esp* volt az egyetlen virulencia faktor, amelyet a törzsek 16,3%-ában megtaláltunk. Számos korábbi tanulmány kimutatta, hogy az *esp* az egyik jellemzője a kórházakban elterjedt antibiotikum-rezisztens *E. faecium* törzseknek (Willems és mtsai. 2001, Leavis és mtsai. 2004,

Eaton és Gasson 2001, Coque és mtsai. 2002). Egyes szerzők szerint ez a gén fontos szerepet játszhat a biofilm képzésben (Toledo-Arana és mtsai. 2001, Tendolkar és mtsai. 2004), míg mások szerint ez a gén nem szükséges hozzá (Ramadhan és mtsai. 2005, Dupré és mtsai. 2003, Raad és mtsai. 2005). Kutatócsoportunk vizsgálta a biofilm képzést és annak kapcsolatát a virulencia génnek jelenlétével. Megállapítottuk, hogy az *esp* gén és a biofilm termelés közötti kapcsolat statisztikailag szignifikáns ($p = 0,059$) volt, 90% -os megbízhatósággal. Amennyiben az *esp* jelen van a törzsben, a biofilm termelésnek az esélye ötször nagyobb. A biofilm kialakulása azonban függetlenül az *esp*-től, számos egyéb mechanizmuson is alapulhat (Mohamed és Huang 2007).

A molekuláris tipizálás kimutatta a *VREfm* izolátumok klonális kapcsolatát. A PFGE vizsgálat 9 különböző pulzotípust mutatott ki (10. ábra). A törzsek 74%-át 3 fő klaszterbe lehet csoportosítani, jelezve a monoklonalitást. Az MLST alapján a 14 *VREfm* izolátumot hat szekvencia típusba lehetett besorolni, melyek mindegyike a 17-es klonális komplexhez tartozik. Közülük négy (ST17, ST117, ST78, ST203) képviseli a fő ampicillin-rezisztens kórházi eredetű klont (11. ábra). A CC17-et különösen virulensnek írják le és különböző kórházi járványokkal hozható összefüggésbe a világ minden részén (Libisch és mtsai. 2008, Yang és mtsai. 2015, Ochoa és mtsai. 2013, Van Schaik és mtsai. 2010, Werner és mtsai. 2008, Coombs és mtsai. 2014). Kinolon- és ampicillin rezisztencia, valamint egy patogenitási sziget jellemzi, amely gyakran tartalmaz virulenciafaktor géneket, mint például az *esp-t* vagy hialuronidázt (*hyl*) (Willems és mtsai. 2005, Leavis és mtsai. 2004, 2006). Bár törzseink a CC17-et képviselték, nem mindegyikben (7/43) volt megtalálható az *esp* hasonlóan más tanulmányokhoz (Elhani és mtsai. 2014, Billstrom és mtsai. 2010). Ismert ugyanis, hogy erősebb kapcsolat van a CC17 és az ampicillin rezisztencia, mint a CC17 és az *esp* gén jelenléte között (Willems és mtsai. 2005). Kísérleteink elején 2012-ben az ENTCO-062 pulzotípus volt az uralkodó, ám 2014-ben és 2015-ben ez kevésbé volt jellemző. Bár 5 izolátum 100% -os hasonlóságot mutatott ebben a klaszterben (ST17 és *vanB* genotípus), ezek sporadikus eseteknek bizonyultak, járványt nem tapasztaltunk. A vizsgálati időszak végén 2015-ben az ENTCO-075 pulzotípus volt a gyakoribb. Érdekes, hogy két izolátum (38901, 39378) is vérmintából származott, azonos szekvencia típussal (ST117), és mindkettő negatív volt az *esp* génre, de az egyik *VanA*, a másik *VanB* pozitív volt (10. ábra). A további elemzéseink feltárták, hogy a két törzs izolálási ideje nagyon közel esett egymáshoz (5 napon belül), ám a minták különböző intézményekből származtak. Ezekben az

esetekben mind a *vanA*, mind a *vanB* génnek a megszerzése külön eseményként fordult elő. A harmadik leggyakoribb pulzótípus az ENTCO-151 volt, mely kettő ST203-ba tartozó *VRE_{fm}*-ot tartalmazott *vanA* és *esp* pozitivitással.

Az ST412 és ST364 szekvencia típusokhoz tartozó *VRE_{fm}* izolátumokat a kutatócsoportunk írta le először a Közép-Európai régióban. Az ST364 kimutatása kivételesen jelentős. Ezt az ST-t (15-1-1-44-1-20-1) először Zhu és mtsai. (2009) írták le Pekingben és tudomásunk szerint eddig csak egyetlen egy ilyen szekvencia típusú törzsről számoltak be Tajvanban (Lu és mtsai. 2012, Zhu és mtsai. 2009). Az ST412 számos országban megtalálható, főleg az Egyesült Államokban és Nyugat-Európában, de a hivatalos adatbázis szerint még nem regisztrálták Európában (Da Silva és mtsai. 2017, Panesso és mtsai. 2010, Damani és mtsai. 2010). A 2 izolátumot a régióban először azonosított szekvencia típusokkal a kutatócsoportunk továbbította a nemzetközi adatbázis számára (pubmlst.org).

Kutatócsoportunk 2004 és 2009 között elsősorban *vanC* pozitív *E. gallinarum* és *E. casseliflavus* fajokat izolált klinikai mintákból. Azóta beszámoltunk arról, hogy az invazív és nem invazív klinikai mintákban emelkedik a vancomycin-rezisztens *E. faecium* törzsek száma (Dombrádi és mtsai. 2012, Franyó és mtsai. 2018;). Mostanáig nem állt rendelkezésünkre információ a VRE széletben való hordozásáról annak ellenére, hogy a tünetmentesen kolonizáltak különböző nozokomiális fertőzések forrásaként szolgálhatnak. 2016-ban a VRE prevalenciája 3,2% volt a klinikai mintákban a rutin tenyésztésben használt szilárd VRE Screen-t alkalmazva. Kutatásom során 2016-ban két periódusban megvizsgáltuk a gastrointestinális VRE hordozás arányát; ugyanazt a szilárd VRE Screent alkalmazva ez 2,2%-os, míg folyékony dúsítót alkalmazva 5,8% -os hordozási arányt jelentett. Mivel nem azonos a két időszak ez eredhetett az eltérő mintaszámból is.

A különböző földrajzi régiókat tekintve, Európában a VRE kolonizációs aránya körülbelül 20% (Alevizakos és mtsai. 2016). Amint a kolonizáció megtörténik, hónapoktól akár évekig megmaradhat (Nelson és mtsai. 2014). Számos kutató feltételezi, hogy a VRE fertőzés forrása a különböző szennyezett élelmiszerek, melyek rezervoárként szolgálhatnak, melynek fogyasztásával a nem hospitalizált betegek kolonizálódhatnak (Cetinkaya és mtsai. 2000). A hozamnövelőként használt avoparcint, mely az állatokban kisselektálja a VRE-t, 1998-ban betiltották Magyarországon, a következő években pedig a VRE rátájának csökkenését írták le a

brojlercsirkék esetében (Kaszanyitzky és mtsai, 2007). 2005-ben azonban még 2 *vanA* VRE törzset izoláltak a levágott baromfikból (Ghidán és mtsai. 2008). Vizsgálatunk során 93 VRE hordozó epidemiológiai adatait elemeztük. 24,7%-uk esetében a rutin tenyésztés normál bélflóra hiányt mutatott ki a szűrés időpontjában, vagy az azt megelőző 6 hónapban legalább egyszer (14. táblázat). Ez a normál bél mikrobiom egyensúly felborulásának aggasztó jele, mely a hordozók egynegyedében volt jelen. 22 (23,7%) VRE hordozó kórtörténetében nem szerepelt mikrobiológiai tenyésztés a széklet szűrése előtt, a fennmaradó 71 közül pedig csak 3 betegnek volt VRE pozitív valamilyen más klinikai mintája, azonban ezek mind vizeletminták voltak, vagyis a vizelet minta széklettel történő szennyeződése nem zárható ki. 8 hordozó klinikai mintájából tenyésztett ki VRE a szűrésünket követő 6 hónapban; 3 közülük azonos volt a fent említett betegekkel (vizelet), 3 széklet mintából tenyésztett ki, 2 pedig invazív mintákból (vér, kanül) származott. A 93 VRE hordozó közül 18-nak volt *C. difficile* pozitív lelete a szűrés időpontjában vagy az azt megelőző 6 hónapban, de csak 12 részesült vancomycin kezelésben. 17 VRE hordozó kapott vancomycint, de nem volt az anamnézisében *C. difficile* pozitivitás. Statisztikai elemzéseink alapján megállapíthatjuk, hogy a *C. difficile* pozitivitás és a VRE kolonizáció közötti kapcsolat statisztikailag szignifikáns volt ($p=0,0345$), hasonlóan egy korábbi tanulmányhoz (Özsoy és Ilke, 2017). A VRE pozitivitás esélye 2,55-szer nagyobb *C. difficile* pozitív betegekben (14. táblázat). A vancomycin terápiában részesülő betegek esetén megállapítottuk, hogy a VRE pozitivitás esélye 13,59-szer magasabb, mint ha nem adtak volna nekik vancomycin kezelést. Összegezve elmondhatjuk, hogy 5,39-nél nagyobb eséllyel válhat VRE hordozóvá valaki a vancomycin kezelés után, mint a *C. difficile* fertőzés után.

Az irodalommal összehangban kutatócsoportunk is leggyakoribb alapbetegségként a malignitást mutatta ki a VRE-t hordozók körében (22,6%) (Sohn és mtsai. 2013; Cetinkaya és mtsai. 2000). Alevizakos és mtsai. (2016) kimutatták, hogy a VRE kolonizált rosszindulatú daganatos betegek esetében 24,15-ször nagyobb valószínűséggel alakulnak ki véráram-fertőzések. Vizsgálatunk során a különböző infekciók és a cukorbetegség csaknem olyan gyakori volt, mint a rosszindulatú daganatok. Egy indiai oktató kórház intenzív osztályán megállapították (Amberpet és mtsai. 2016), hogy a cukorbetegség (23,7%) volt a második leggyakoribb kockázati tényező hasonlóan, mint a mi felmérésünkben. A VRE hordozók 21,5%-ánál nem volt dokumentált alapbetegség a kórtörténetükben, csupán valamilyen jellegű fertőzés (14. táblázat). Nyilvánvalóan, a fertőzések nagy hatással voltak a kórházi tartózkodás idejére és a választott

antibiotikum terápiára. A járóbetegekkel együtt (7/93) a VRE hordozók teljes kórházi tartózkodása 0-215 nap volt, átlagosan 25 nap. A tartós kórházi tartózkodás egyértelműen fontos rizikótényezőnek bizonyult, mások eredményeihez hasonlóan (Purohit és mtsai. 2017; Sohn és mtsai. 2013; Cetinkaya és mtsai. 2000). A hosszabb kórházi ápolás megnövekedett antibiotikum fogyasztást eredményez, a hordozók csupán 21,5%-a nem kapott antibiotikum terápiát. A kolonizált és nem kolonizált betegek statisztikai elemzése magas VRE kolonizációs valószínűséget tárt fel az alábbi jellemzők esetén: cukorbetegség, a normál enterális flóra hiánya, *C. difficile* pozitivitás, hosszabb kórházi tartózkodás, valamint előrehaladott életkor. A leggyakrabban alkalmazott antibiotikum a metronidazol volt (47,3%), ezt követték a cefalosporinok (40,9%) és penicillinek (38,7%). A hordozók 31,2%-a kapott vancomycint, amely a karbapenemmel együtt a negyedik leggyakrabban alkalmazott szer volt (13. ábra). További vizsgálatok következetesen kimutatták, hogy a vancomycinnel, a harmadik generációs cefalosporinnal és/vagy az anaerobokra ható szerekkel végzett terápia fontos szerepet játszik a VRE-vel történő kolonizációs folyamatban, mivel nincs aktivitásuk ellene (Karki és mtsai. 2012; Sohn és mtsai. 2013; Donskey és mtsai. 2000). Továbbá az enterococcusok alacsony vagy közepes szintű intrinzik rezisztenciával rendelkeznek a penicillinekkal és a karbapenemekkel szemben (Top és mtsai. 2008). Vizsgálatunkban 13,59-szer magasabb VRE pozitivitást találtunk vancomycin terápia esetén, mint anélkül.

A fajok identifikálásához MALDI-TOF tömegspektrométert alkalmaztunk. Ez egy viszonylag új technika, melyet a közelmúltban vezettek be a klinikai mikrobiológiába. A riboszómális protein profil alapján gyorsan azonosítja a baktériumok széles skáláját faji szinten (Seng és mtsai. 2009; Gekenidis és mtsai. 2014). A rutin diagnosztikában alkalmazott hagyományos módszerekkel összehasonlítva a MALDI-TOF előnyei között szerepel a minimális mintaelőkészítés, a gyors és összehasonlítható eredmények, a rövidebb leletátfordulási idő és az alacsonyabb reagens költségek (Carbonnelle és mtsai. 2011). A VRE törzsek székletből történő azonosítása során 102 VRE-t identifikáltunk faji szinten ezzel az új technikával. Az összes izolátum magas score értékű eredményt adott, amely megerősíti, hogy ez a módszer kiváló a baktériumok azonosítására. MALDI-TOF nélkül, és csak a szilárd táptalaj vagy dúsító feketedésére támaszkodva (a vancomycinre generikusan rezisztens eszculint hidrolizáló egyéb mikrobák miatt) sokkal magasabb ál-VRE pozitivitást kaptunk volna, mint azt Ieven és

munkatársai is megállapították (Ieven és mtsai. 1999). A mi esetünkben ez szilárd táptalajjal 12,8%, dúsító táptalajjal 42,2% lett volna.

2012-2015 közötti vizsgálatunkban 40 *vanB* és 3 *vanA* *E. faecium* izolátum detektálásáról tudtunk beszámolni klinikai mintákból (Franyó és mtsai 2018). 2016-ban a klinikai mintákból izolált VRE előfordulása a következő volt; 33 *vanB* *E. faecium* és 21 *vanA* *E. faecium*. Ez azt mutatja, hogy nemcsak a *VREfm* gyakorisága növekedett az előző évekhez képest, hanem a *vanA* izolátumok aránya is. A VRE *E. faecalis* aránya továbbra is alacsony maradt (1 *vanA* és 1 *vanB* izolátum). A széklet minták vizsgálata kimutatta, hogy a széklet VRE izolátumok faji és genotípus szerinti megoszlása hasonló volt a klinikai izolátumokéhoz; 71 *E. faecium* (38 *vanB*, 33 *vanA*) és 5 *E. faecalis* (1 *vanB*, 4 *vanA*). Annak ellenére, hogy a székletből izolált második leggyakoribb faj az *E. gallinarum* (23 db) volt, a klinikai minták között ez csak 2004-2009 között volt megfigyelhető (Dombrádi és mtsai. 2012). Érdekes, hogy a szilárd szűrőtáptalaj valamivel több *E. gallinarum*-ot azonosított, mint a dúsító, de ennek oka lehet, hogy a két különböző szűrési periódus eltért egymástól. Az *E. casseliflavus* aránya alacsony volt (15. táblázat).

Egy érdekes esetben egy betegnél *vanA* *E. hirae* kolonizációt tudtunk kimutatni, a szűrést egy hónappal megelőzően pedig *vanA* *E. faecium* tenyésztett ki a székletéből. Ebben az esetben feltételezhető, hogy a *vanA* gén átadása történt a két faj között, bár ezt a hipotézist nem erősítettük meg molekuláris módszerekkel. A teljes szűrési periódus alatt összesen 37,3% *vanA* rezisztencia gént hordozó VRE-t detektáltunk, ami aggasztó, mivel a *vanA* átvihető más genusokba tartozó nozokomiális kórokozókra, például a *Staphylococcus aureus*-ba (Noble és mtsai. 1992).

Az intestinális VRE izolátumok érzékenyek voltak az újabb szerekkel szemben (13. táblázat). Az öt *E. faecalis* izolátum közül csak 4 volt rezisztens a quinupristin-dalfopristinre (Q/D). Habár az *Enterococcus faecalis* fajok az *lsa* gén expressziója miatt intrinzik rezisztenciával rendelkeznek a Q/D-vel szemben, azok a klinikai izolátumok, amelyekben ennek a génnek a mutációja történt, érzékenyek lehetnek (Dina és mtsai. 2003).

A VRE kolonizáció gyakoriságát nehéz összevetni a többi tanulmánnyal a betegpopuláció, a minta típusa, a különféle táptalajokat alkalmazó kimutatási módszerek és/vagy a glikopeptid-koncentrációk különbségei miatt (Gambarotto és mtsai. 2000). Sok kórházban a rektális tampont használják a multirezisztens kórokozók felmérésére, de D'Agata és munkatársai

(2001) vizsgálatukban megállapították, hogy a rektális tenyésztés nem azonosította a gastrointestinalis kolonizációk nagy részét. Ezért kutatócsoportunk úgy döntött, hogy vizsgálatainkhoz a tenyésztésre érkező széklet mintákat használjuk. Számos cikk azt is leírta, hogy a folyékony dúsítás javítja a kimutatás érzékenységét (Ieven és mtsai. 1999; Gambarotto és mtsai 2000; Novicki és mtsai 2004). Ezt kívántuk tesztelni, azonban vizsgálatunk egyik korlátja volt, hogy csak két egymást követő időszakot vizsgáltunk a két különböző módszerrel, így a szilárd szűrőtáptalaj és a dúsító közvetlen összehasonlítását nem lehet elvégezni. Annak ellenére azonban, hogy a folyékony dúsítás jobbnak tűnik, a szilárd screen alkalmazása kevésbé munka- és időigényes így könnyebben megvalósítható a rutin diagnosztika során.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az antibiotikum rezisztens Gram-pozitív baktériumok közül a vancomycinre rezisztens enterococcusok (VRE) előfordulási gyakorisága jelentősen megnőtt az elmúlt években. Tanulmányom célja volt a klinikai mintákból izolálható törzsek surveillance-e keretében a VRE gyakoriságának vizsgálata, molekuláris és epidemiológiai jellemzése, valamint a VRE székletben való hordozásának felmérése, a hordozást esetlegesen elősegítő rizikófaktorok megállapítása.

A 2012-2015 közötti időszakban 40 *vanB* és 3 *vanA* rezisztencia gént hordozó *E. faecium*-ot azonosítottunk, amelyek a legújabb antibiotikumokra, - linezolid, tedizolid, tigecyclin és daptomycin- még érzékenyek bizonyultak. MLST alapján a kórházi törzsekre jellemző klonális komplex 17-hez (CC17) tartoztak. Kutatócsoportunk először mutatta ki az ST412 és ST364 szekvencia-típusokba tartozó izolátumokat a Közép-Európai régióban. PFGE vizsgálataink alapján 9 különböző pulzotípust tudtunk ki mutatni. A törzsek 74%-át 3 fő klaszterbe (ENTCO-062, ENTCO-075, ENTCO-151) lehetett csoportosítani jelezve a monoklonalitást. Bár 5 izolátum 100% -os hasonlóságot mutatott az ENTCO-062-es klaszterben, ezek sporadikus eseteknek bizonyultak.

Bebizonyítottuk a VRE törzsek székletben történő hordozását a keleti régióban. Kétféle módszert alkalmazva a hordozás 2,2% volt szilárd screent használva, illetve 5,8% folyékony dúsítóval. Összehasonlítva a klinikai és a széklet mintákból származó VRE törzseket a fajok és a rezisztencia gének megoszlása hasonlóan bizonyult, mely utalhat az előbbiekből történő eredetére. Érdekes módon kutatócsoportunk a székletből izolált második leggyakoribb fajnak az *E. gallinarum*-ot találta, mely a klinikai mintákban csak 2009-ig volt jelen, később a rezisztensebb *vanA/vanB* törzsek kiszorították.

Eredményeink alapján javasoljuk az enterococcusok elleni kevésbé hatékony antibiotikumok használatának korlátozását, a rizikó csoportba tartozó betegek szűrését: rosszindulatú daganatos betegek, cukorbeteg, hosszas kórházi ápoláson átesettek illetve korábbi *C. difficile* fertőzöttek. A vizsgált időszakban nem tapasztaltunk járványt, azonban az MRSA folyamatosan növekvő magas prevalenciája, a *C. difficile* fertőzések növekvő száma, a vancomycin fokozott alkalmazását kívánja. A jövőben emiatt számíthatunk a VRE törzsek további emelkedésére, különösen a nozokomiális fertőzések esetén. Az invazív *VRE_{fm}* fertőzések

jelentős növekedése miatt kiemelt jelentősége van a megfelelő infekciókontrollnak, a fertőzött/kolonizált beteg elkülönítésének, és az antibiotikum terápia célzott és szakszerű alkalmazásának.

9. SUMMARY

Among the antibiotic-resistant Gram-positive bacteria the incidence of vancomycin-resistant Enterococci (VRE) has increased significantly over the past years. The aim of our surveillance study was to characterize and elicit the genetic relatedness of VRE isolated from clinical samples and to determine the carriage rate of VRE in stool samples. We also investigated various risk factors which could be associated with VRE colonization.

Between 2012 and 2015 we determined the presence of 40 *VanB* and 3 *VanA* *E. faecium* isolates. Fortunately, all of them were susceptible to newer antibiotics such as linezolid, tedizolid, tigecyclin and daptomycin. According to MLST all of the tested isolates belonged to clonal complex 17 (CC17), a specific lineage associated with nosocomial *E. faecium* strains. We also reported *VREfm* isolates belonging to ST412 and ST364 sequence types for the first time from the Central European region. PFGE revealed 9 different pulsotypes. 74% of the strains could be grouped into 3 main clusters (ENTCO-062, ENTCO-075, ENTCO-151) indicating monoclonality. Although 5 isolates showed 100% similarity within the ENTCO-062 cluster (with ST17 and *vanB* genotype) these proved to be sporadic cases.

We showed the presence of fecal carriage of VRE in the Eastern region of Hungary. Stool colonization proved to be 2.2% with solid screening medium but 5.8% with enrichment broth. Finding similar species and similar rates of *vanA* and *vanB* strains in stool VRE compared to clinical VRE might indicate the stool origin of the latter. Interestingly we found a high rate of fecal carriage of *E. gallinarum* which was present in clinical samples only till 2009 and was subsequently replaced by more resistant *vanA/vanB* strains.

In view of our findings we suggest limiting the inadequate use of antibiotics inefficient against enterococci and advise the screening of risk groups such as patients with malignancy, diabetes, history of recent hospitalization or former *C. difficile* infection. Fortunately, there was no outbreak during the investigation period but constantly high prevalence of MRSA and the increasing rate of *C. difficile* infections in Hungary can potentially lead to the increased use of vancomycin. Therefore we can expect the further rise of VRE especially in the nosocomial setting. Emergence of *VREfm* emphasizes the need for the application of stringent control measures to decrease the risk of dissemination of the resistant bacteria such as isolation of

infected/colonized patients, increased environmental cleaning and improved antimicrobial interventions.

10. IRODALOMJEGYZÉK

Aarestrup, F. M., Butaye, P. and Witte, W. (2002) In the Enterococci, Vol. 1 (Ed, Gilmore, M. S.) American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 55-99.

Alevizakos M, Gaitanidis A, Nasioudis D, Tori K, Flokas ME, Mylonakis E. (2016) Colonization with Vancomycin-Resistant Enterococci and Risk for Bloodstream Infection among Patients with Malignancy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Open Forum Infect Dis* 4(1):ofw246

Amberpet R, Sistla S, Parija SC Thabab MM. (2016) Screening for Intestinal Colonization with Vancomycin Resistant Enterococci and Associated Risk Factors among Patients Admitted to an Adult Intensive Care Unit of a Large Teaching Hospital. *J Clin Diagn Res* 10(9):06-09.

Andrews, F.W. and Horder, T.J. (1906) A study of streptococci pathogenic for man. *Lancet*, 2, 708—713

Arshadi, M., M. Douraghi, L. Shokoohizadeh., S. M. Moosavian, M. R. Pourmand. 2017. High prevalence of diverse Vancomycin Resistance Enterococcus faecium isolates in clinical and environmental sources in ICU wards in southwest of Iran. *Microb. Pathog.* 111:212-217.

Arthur, M., Molinas, C., Depardieu, F. and Courvalin, P. (1993) Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in Enterococcus faecium BM4147. *J Bacteriol*, 175, 117-27.

Bates J, Jordens Z, Selkon JB (1993): Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* (1993) 342:490—491 25.

Beezhold, D. W., Slaughter, S., Hayden, M. K., Matushek, M., Nathan, C., Trenholme, G. M. and Weinstein, R. A. (1997) Skin colonization with vancomycin-resistant enterococci among hospitalized patients with bacteremia. *Clin Infect Dis*, 24, 704-6.

Bensaci, M., D. Sahm. 2017. Surveillance of tedizolid activity and resistance: In vitro susceptibility of Gram-positive pathogens collected over 5 years from the United States and Europe. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 87:133–138.

Billstrom, H., J. Top, C. Edlund, B. Lund. 2010. Frequent occurrence of multidrug-resistant CC17 *Enterococcus faecium* among clinical isolates in Sweden. *J. Appl. Microbiol.* 108:1810-1816.

Bonten, M. J., Hayden, M. K., Nathan, C., van Voorhis, J., Matushek, M., Slaughter, S., Rice, T. and Weinstein, R. A. (1996) Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*, 348, 1615-9.

Boyd, D. A., B. M. Willey, D. Fawcett, N. Gillani, M. R. Mulvey. (2008). Molecular Characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with Low-Level Vancomycin Resistance Harboring a Novel D-Ala-D-Ser Gene Cluster, vanL. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52(7):2667-2672.

Böröcz, K., Szilágyi, E. Kurcz, A., Libisch, B. Glatz, K. Gacs. M. (2005). First vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak reported in Hungary *Euro Surveill.* 10(1):E050127.1.

Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X. (2011) MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin. Biochem* 44(1):104–109.

Cariolato, D., C. Andrighetto, A. Lombardi. (2008). Occurrence of virulence factors and antibiotic resistance in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control.* 19(9): 886–892.

Carvalho Mda G, Shewmaker PL, Steigerwalt AG, Morey RE, Sampson AJ, Joyce K, Barrett TJ, Teixeira LM, Facklam RR. (2006). *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. *Int J Syst Evol Microbiol.* 56:7:1505-8.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2013: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> (honlap felkeresésének időpontja 2019.10.25)

- Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG (2000). Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev. 13(4):686–707. doi:10.1128/cmr.13.4.686-707.
- Chadwick PR, Woodford N, Kaczmarek EB, Gray S, Barrell RA, Oppenheim BA (1996): Glycopeptide-resistant enterococci isolated from uncooked meat. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1996) 38:908–909.
- Chajęcka-Więrzchowska, W., A. Zadzernowska, L. Laniewska-Trokenheim. 2017. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. LWT-Food Sci. Techno. 75:670-676.
- Chen YS, Lin YH, Pan SF, Ji SH, Chang YC, Yu CR, Liou MS, Wu HC, Otoguro M, Yanagida F, Liao CC, Chiu CM, Huang BQ. (2013). *Enterococcus saccharolyticus* subsp. *taiwanensis* subsp. nov., isolated from broccoli. Int J Syst Evol Microbiol. 63:12:4691-7.
- Cheng VC, Chen JH, Tai JW, Wong SC, Poon RW, Hung IF, To KK, Chan JF, Ho PL, Lo CM, Yuen KY (2014) Decolonization of gastrointestinal carriage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: case series and review of literature. BMC Infect Dis 14:514.
- Cleveland, D. B. (1990). Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9:90–102.
- Collins, M. D., Facklam, R. R., Farrow, J. A. and Williamson, R. (1989) *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. FEMS Microbiol Lett, 48, 283-8.
- Collins, M. D., Farrow, J. A. E. and Jones, D. (1986) *Enterococcus mundtii* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 36, 8-12.
- Collins, M. D., Rodrigues, U. M., Pigott, N. E. and Facklam, R. R. (1991) *Enterococcus dispar* sp. nov. a new *Enterococcus* species from human sources. Lett Appl Microbiol, 12, 95-8.
- Coombs, G. W., J. C. Pearson, D. A. Daley, T. Le, O. J. Robinson, T. Gottlieb, B. P. Howden, P. D. R. Johnson, C. M. Bennett, T.P. Stinear, J. D. Turnidge. (2014). Molecular Epidemiology of Enterococcal Bacteremia in Australia. J. Clin. Microbiol. 52(3):897-905.

- Coque, M. T., R. Willems, R. Cantón, R. Del Campo, F. Baquero. 2002. High occurrence of esp among ampicillin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* clones from hospitalized patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 50:1035-1038.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, E. P. Greenberg. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* 284(5418):1318-22.
- Courvalin, P. (2006). Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clin. Infect. Dis.* 42:25-34.
- Czirók Éva. (1999). *Klinikai és járványügyi bakteriológia*, Melania Kiadó, Budapest
- Da Silva Alves, G., M. F. Pereira, L. de Lima Bride, A. P. Ferreira Nunes, R. Pinto Schuenck. 2017. Clonal dissemination of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST412 in a Brazilian region. *Braz. J. Infect. Dis.* 21(6):656-659.
- de Vaux, A., Laguerre, G., Divies, C. and Prevost, H. (1998) *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). *Int J Syst Bacteriol*, 48 Pt 2, 383-7.
- D'Agata EMC, Jirjis J, Gouldin C et al (2001) Community dissemination of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Am J Infect Control* 29(5):316-20.
- Damani, A., D. Klapsa, M. Panopoulou, I. Spiliopoulou, K. Pantelidi, E. Malli, F. Kolonitsiou, S. Grapsa, E. Alepopoulou, F. Frantzidou, E. Vlahaki, C. Koutsia-Carouzou, H. Malamou-Lada, L. Zerva, S. Kartali-Ktenidou, E. D. Anastassiou, A. N. Maniatis, E. Petinaki. 2010. A newly described vancomycin-resistant ST412 *Enterococcus faecium* predominant in Greek hospitals. *Eur. J. Clin Microbiol. Infect. Dis.* 29:329–331.
- De Almeida, L. M., M. R. E. De Araújo, M. F. Iwasaki, A. G. Sacramento, D. Rocha, L. P. da Silva, M. Pavez, A. C. de Brito, L. C. S. Ito, A. C. Gales, N. Lincopan, J. L. M. Sampaio, E. M. Mamizukaa. 2014. Linezolid Resistance in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolates in a Brazilian Hospital. 58(5):2993-2994.
- De Graef EM, Devriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Collins MD, Lefebvre K, Swings J, Haesebrouck F. (2003). Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcinus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al 2001..*Int J Syst Evol Microbiol.* 53:4:1069-74.

- Depardieu, F., B. Perichon P. Courvalin. (2004). Detection of the van Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42(12): 5857–5860.
- Devriese, L. A., Ceyssens, K., Rodrigues, U. M. and Collins, M. D. (1990) *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. *FEMS Microbiol Lett*, 59, 247-51.
- Dina J, Malbruny B, Leclercq R (2003) Nonsense Mutations in the *lsa*-Like Gene in *Enterococcus faecalis* Isolates Susceptible to Lincosamides and Streptogramins A. *Antimicrob Agents Chemother* 47(7): 2307–2309.
- Dolka, B, D. Chrobak-Chmiel, L. Makrai, P. Szeleszczuk. (2016). Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus cecorum* strains associated with infections in poultry. *BMC Vet. Res.* 12(1):129.
- Dombrádi, Z., Bodnár, F. Orosi, P. Dombrádi, V. Szabó. J (2009). A case report of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization of a femoral wound in central europe. *Cent Eur J Med*, 4(2):259-261.
- Dombrádi, Z., Dobay, O., Nagy, K. Kozák, A. Dombrádi, V., Szabó. J. (2012). Prevalence of vanC vancomycin-resistant enterococci in the teaching hospitals of the University of Debrecen, Hungary. *Microb Drug Resist.* 18(1):47-51
- Donnelly JP, Voss A, Witte W, Murray BE (1996): Does the use of antimicrobial agents, including glycopeptide antibiotics, influence the efficacy of antimicrobial therapy in humans? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (1996) 37:389–390 26.
- Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT Høyen CK, Hanrahan JA, Hujer AM, Hutton-Thomas RA, Whalen CC, Bonomo RA, Rice LB. (2000) Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med* 343(26):1925-32
- Duprè I., S. Zanetti, A. M. Schito, G. Fadda, L. A. Sechi. 2003. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J. Med. Microbiol.* 52(6):491-8.

Eaton, T. J., M. J. Gasson. (2001). Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, 67 (4): 1628–1635.

ECDC (2017). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017

ECDC (2018). Surveillance atlas of infectious diseases. <http://atlas.ecdc.europa.eu/> (honlap felkeresésének időpontja 2019. 10.17)

ECDC (2019): Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.

Edelsberg, J., D. Weycker, R. Barron, X. Li, H. Wu, G. Ostera, S. Badre, W. J. Langeberg, D. J. Weberd. (2014). Prevalence of antibiotic resistance in US hospitals. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 78(3):255-262.

Elhani, D., N. Klibi, R. Dziri, M. B. Hassan, S. A. Mohamed, L. B. Said, A. Mahjoub, K. B. Slama, B. Jemli, R. Bellaj, F. Barguelli, C. Torres. 2014. *vanA*-containing *E. faecium* isolates of clonal complex CC17 in clinical and environmental samples in a Tunisian hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 79(1):60-63.

Enterococcus faecium MLST website sited at the University of Oxford. Available at: <https://pubmlst.org/efaecium/>.

Evers S, Courvalin P. (1996). Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR(B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. *J Bacteriol*;178:1302–9.

Facklam, R. R., Carvalho, M. G. S., and Teixeira, L. M. (2002) History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: *The Enterococci. Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance* (Gilmore, M. S., ed.), ASM, Washington, DC, pp. 1–54.

- Farrow, J. A. E. and Collins, M. D. (1985) *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO1258 and strains causing growth depression in young chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35, 73-5.
- Feil, E. J., B. C. Li, D. M. Aanensen, W. P. Hanage, B. G. Spratt. (2004). eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *J. Bacteriol.* 186(5):1518-1530.
- Fiedler, S., J. K. Bender, I. Klare, S. Halbedel, E. Grohmann, U. Szewzyk, G. Werner. 2016. Tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterococcus faecium* is mediated by an upregulation of plasmid-encoded tetracycline determinants tet(L) and tet(M). *J. Antimicrob. Chemother.* 71(4):871 –881.
- Fines, M., B. Perichon, P. Reynolds, D. F. Sahm, and P. Courvalin. (1999). VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43:2161–2164.
- Fisher, K., Phillips, C. (2009) The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* . 155:1749-1757.
- Fortina MG, Ricci G, Mora D, Manachini PL. (2004). Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54:5:1717-21.
- Francisco, A. P., M. Bugalho, M. Ramirez, J. A Carriço. 2009. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics.* 10:152.
- Franyó, D., Kocsi, B., Lesinszki, V., Pászti, J., Kozák, A., Bukta, E. E., Dombrádi, Z. (2018). Characterization of clinical vancomycin-resistant *enterococcus faecium* isolated in Eastern Hungary. *Microbial Drug Resistance*, 24(10), 1559-1567.
- Frolkov P, Švec P, Sedláček I, Mašlaňová I, Černohlávková J, Ghosh A, Zurek L, Radiměřský T, Literák I. (2013). *Enterococcus alcedinis* sp. nov., isolated from common kingfisher (*Alcedo atthis*). *Int J Syst Evol Microbiol.* 63:8:3069-74.
- Fürst Zsuzsanna, Gyires Klára. (2011) A farmakológia alapjai. Medicina Könyvkiadó Zrt.

- Gambarotto K, Ploy MC, Turlure P, Grélaud C, Martin C, Bordessoule D, Denis F. (2000) Prevalence of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples from hospitalized patients and nonhospitalized controls in a cattle-rearing area of France. *J Clin Microbiol* 38(2):620-4.
- Garvie, E.I. and Farrow, J.A.E. (1981) Sub-divisions within the genus *Streptococcus* using deoxyribonucleic acid/ribosomal ribonucleic acid hybridization. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* (1. Abteilung Originale), C 2, 299-310
- Gekenidis MT, Studer P, Wüthrich S, Brunisholz R, Drissner D (2014) Beyond the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Biotyping Workflow: in Search of Microorganism-Specific Tryptic Peptides Enabling Discrimination of Subspecies. *Appl Environ Microbiol* 80(14):4234-41.
- Gergely L. (2003). *Orvosi Mikrobiológia*. Alliter Kiadó, Budapest
- Ghidán, Á., Csiszár, K. Jeney, Cs., Maródi, L. Rozgonyi. F. (2000). PCR detection of the *vanA* gene in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 46:325–326.
- Ghidán, A., Dobay, O. Kaszanyitzky, E. J. Samu, P, Amyes, S. G., Nagy, K. Rozgonyi. F. (2008). Vancomycin resistant enterococci (VRE) still persist in slaughtered poultry in hungary 8 years after the ban on avoparcin. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* 55(4):409-17.
- Gonzales, R. D., P. C. Schreckenberger, M. B. Graham, S. Kelkar, K. DenBesten, J. P. Quinn. 2001. Infections due to vancomycin resistant *Enterococcus faecium* resistant to linezolid. *Lancet.* 357 (9263):1179.
- Griffith, R. S. (1984). Vancomycin use - an historical review. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1984, 14, (Suppl. D), 1-5.
- Hammerum, A. M. (2000). Characterization of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible *Enterococcus faecium* isolates from humans, chickens and pigs by RiboPrinting and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45(5), 677–680.

Handwerger, S. and Skoble, J. (1995) Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 2446-53.

Harada T, Dang VC, Nguyen DP, Nguyen TA, Sakamoto M, Ohkuma M, Motooka D, Nakamura S, Uchida K, Jinnai M, Yonogi S, Kawahara R, Kanki M, Kawai T, Kumeda Y, Yamamoto Y. (2016). *Enterococcus saigonensis* sp. nov., isolated from retail chicken meat and liver. *Int J Syst Evol Microbiol*. 66:10:3779-3785.

Homan, W. L., D. Tribe, S. Poznanski, M. Li, G. Hogg, E. Spalburg, J. D. A. van Embden, R. J. L. Willems. (2002). Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol*. 40(6):1963-1971.

Howden, B. P., K. E. Holt, M.M.C. Lam, T. Seemann, S. Ballard, G. W. Coombs, S. Y. C. Tong, M. L. Grayson, P. D. R. Johnson, T. P. Stinear. 2013. Genomic insights to control the emergence of vancomycin-resistant enterococci. *MBio* 4(4):412-13.

Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS (1998) Multiple-Drug Resistant Enterococci: The Nature of the Problem and an Agenda for the Future. *Emerg Infect Dis* 4(2):239-49.

Ieven M, Vercauteren E, Descheemaeker P et al (1999) Comparison of Direct Plating and Broth Enrichment Culture for the Detection of Intestinal Colonization by Glycopeptide-Resistant Enterococci among Hospitalized Patients. *J Clin Microbiol* 37(5):1436–1440.

Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS (1994) Virulence of Enterococci. *Clin Microbiol Rev* 7(4):462-78

Kadri Z, Spitaels F, Cnockaert M, Praet J, El Farricha O, Swings J, Vandamme P. (2015). *Enterococcus bulliens* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from camel milk. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 108:5:1257-65.

Kalina, A. P. (1970) The taxonomy and nomenclature of enterococci. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 20, 185-9.

Karki S, Houston L, Land G Bass P, Kehoe R, Borrell S, Watson K, Spelman D, Kennon J, Harrington G, Cheng AC. (2012) Prevalence and risk factors for VRE colonisation in a

tertiary hospital in Melbourne, Australia: a cross sectional study. *Antimicrob Resist Infect Control* 1:31

Kaszanyitzky EJ, Tenk M, Ghidán A, Fehérvári GY, Papp M. (2007) Antimicrobial susceptibility of enterococci strains isolated from slaughter animals on the data of Hungarian resistance monitoring system from 2001 to 2004. *Int J Food Microbiol* 115(1):119-23

Kelesidis, T., R. Humphries, D. Z. Uslan, D. A. Pegues. 2011. Daptomycin Nonsusceptible Enterococci: An Emerging Challenge for Clinicians. *Clin. Infect. Dis.* 52(2): 228–234.

Kilpper-Balz, R. and Schleifer, K.H. (1981) DNA-rRNA hybridization studies among staphylococci and some other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 10, 357-362.

Kilpper-Balz, R. and Schleifer, K.H. (1984) Nucleic acid hybridization and cell wall composition studies of pyogenic streptococci. *FEMS Microbiology Letters*, 24, 355-364.

Kilpper-Balz, R., Fischer, G. and Schleifer, K.H. (1982) Nucleic acid hybridization of group N and group D streptococci. *Current Microbiology*, 7, 245-250.

Kim JY, Shin NR, Na HK, Hyun DW, Whon TW, Kim PS, Yun JH, Bae JW. (2013). *Enterococcus diestrammenae* sp. nov., isolated from the gut of *Diestrammena coreana*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63:12:4540-5.

Knausz, M., Gartner, B, Fömmötör, I, Ghidán, A, Kamotsay, K. Rozgonyi. F. (2003). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* colonization during recovery from *Neisseria meningitidis* cerebrospinal meningitis. Case report. *Acta Microbiol Immunol Hung* 50(4):453-7.

Koch, S., Hufnagel, M., Theilacker, C. & Huebner, J. (2004). Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 22, 822–830.

Koort J, Coenye T, Vandamme P, Sukura A, Björkroth. (2004). *Enterococcus hermanni* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. *J.Int J Syst Evol Microbiol.* 54:5:1823-7.

- Krull, M., I. Klare, B. Ross, R. Trenchel, D. W. Beelen, D. Todt, E. Steinmann, J. Buer, P-M. Rath, and J. Steinmann. (2016). Emergence of linezolid- and vancomycin resistant *Enterococcus faecium* in a department for hematologic stem cell transplantation. *Antimicrob. Resist Infect Control*. 5:31.
- Kusuda R, Kawai K, Salati F, Banner CR, Fryer JL. (1991). *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int J Syst Bacteriol*. 41(3):406-9.
- Lancefield, R.C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *Journal of Experimental Medicine*, 57, 571-595
- Landman, D. & J. M. Quale. (1997). Management of infections due to resistant enterococci: a review of therapeutic options. *J Antimicrob Chemother* 40: 161-170
- Law-Brown J, Meyers PR. (2003). *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 53(Pt 3):683-5.
- Leavis, H. L., M. J. Bonten, R. J. L. Willems. 2006. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol*. 9(5):454-4.
- Leavis, H., J. Top, N. Shankar, K. Borgen, M. Bonten, J. van Embden, R. J. Willems. (2004). A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J. Bacteriol*. 186(3):672-82.
- Lebreton, F. F. Depardieu, N. Bourdon, M. Fines-Guyon, P. Berger, S. Camiade, R. Leclercq, P. Courvalin, V. Cattoir. (2011). D-Ala-D-Ser VanN-Type Transferable Vancomycin Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 55(10):4606-4612.
- Lechevalier, M. P.; Prauser, H.; Labeda, D. P.; Ruan, J.-S. Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1986, 36, 29-37.
- Leclercq, R. and Courvalin, P. (1997) Resistance to glycopeptides in enterococci. *Clin Infect Dis*, 24, 545-54; quiz 55-6.

- Leclercq, R., (1997) Enterococci acquire new kinds of resistance. Clin Infect Dis 24 Suppl 1: S80-84
- Leclercq, R., E. Derlot, J. Duval, P. Courvalin. (1988). Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. N. Engl. J. Med. 319(3):157–161.
- Levine, D. P. (2008). Vancomycin: understanding its past and preserving its future. South. Med. J., 101, 284-291.
- Li CY, Tian F, Zhao YD, Gu CT. (2014). *Enterococcus xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese pickle. Int J Syst Evol Microbiol. 64:3:1012-7.
- Libisch, B., Lepsanovic, Z., Top, J, Muzslay, M., Konkoly-Thege, M., Gacs. M (2008). Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. clinical isolates from Hungary and Serbia. Scand. J. Infect. Dis. 40(10):778-784.
- Lu, C-L., Y-C. Chuang, H-C. Chang, Y-C. Chen, J-T. Wang, S-C. Chang. 2012. Microbiological and clinical characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteraemia in Taiwan: implication of sequence type for prognosis. J. Antimicrob. Chemother. 67: 2243-2249
- Lucena-Padrós H, González JM, Caballero-Guerrero B, Ruiz-Barba JL, Maldonado-Barragán A. (2014). *Enterococcus olivae* sp. nov., isolated from Spanish-style green-olive fermentations. Int J Syst Evol Microbiol. 64:8:2534-9.
- Ludwig, W., Seewaldt, E., Kilpper-Balz, R., Schleifer, K.H., Magrum, L., Woese, C.R., Fox, G.E. and Stackebrandt, E. (1985) The phylogenetic position of *Streptococcus* and *Enterococcus*. Journal of General Microbiology, 131,543-551.
- Manero A, Vilanova X, Cuéllar-Anicet MC, Blanch R. (2002). Characterization of sewage waters by biochemical fingerprinting of Enterococci. Water Research. 36:11,2831-2835.
- Mannu L., A. Paba, E. Daga, R. Comunian, S. Zanetti, I. Duprè. L.A.Sechi. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. Int. J. Food Microbiol. 88(2-3):291-304.

- Martinez-Murcia, A. J. and Collins, M. D. (1991) *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol Lett*, 64, 69-74.
- Mazzulli T., S.M. King and S.E. Richardson SE. (1992). Bacteremia due to beta-lactamase-producing *Enterococcus faecalis* with highlevel resistance to gentamicin in a child with Wiskott- Aldrich syndrome. *Clin. Infect. Dis.* 14: 780–781.
- McDonald LC, Kuehnert MJ, Tenover FC, Jarvis WR (1997): Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. *Emerging Infectious Diseases* 3:311–317 23.
- McEllistrem, C. Janet E. Stout, and Lee H. Harrison. (2000). Simplified Protocol for Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* Jan; 38(1): 351–353.
- McKessar, S. J., A. M. Berry, J. M. Bell, J. D. Turnidge, J. C. Paton. (2000). Genetic Characterization of *vanG*, a Novel Vancomycin Resistance Locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(10):3224-3228.
- McLaughlin RW, Shewmaker PL, Whitney AM, Humrighouse BW, Lauer AC, Loparev VN, Gulvik CA, Cochran PA, Dowd SE. (2017). *Enterococcus crotali* sp. nov., isolated from faecal material of a timber rattlesnake. *Int J Syst Evol Microbiol.* 67:6:1984-1989.
- Moellering, R. C., Jr., (1990) The enterococci: an enigma and a continuing therapeutic challenge. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9: 73-74.
- Mohamed J.A., D.B. Huang. 2007. Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* 56(12):1581-8.
- Morandi, S., Cremonesi, P., Povolo, M., and Brasca, M. (2012). *Enterococcus lactis* sp. nov., from Italian raw milk cheeses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:1992-1996.
- Murray B.E., H.A. Lopardo, E.A. Rubeglio, M. Frosolono and K.V, Singh. (1992). Intrahospital spread of a single gentamicinresistant, beta-lactamase-producing strain of *Enterococcus faecalis* in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 230–232.

Murray B.E., K.V. Singh, S.M. Markowitz, H.A. Lopardo, J.E. Patterson, M.J. Zervos E. Rubaglio, G.M. Eliopoulos, L.B. Rice, F.W. Goldstein (1991). Evidence for clonal spread of a single strain of beta-lactamase-producing *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* to six hospitals in five states. *J. Infect. Dis.* 163: 780–785.

Murray, B. E. (1990) The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 3: 46-65

Murray, B. E. (2000) Vancomycin-resistant enterococcal infections. *N Engl J Med*, 342, 710-21.

Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, Farr BM; SHEA. (2003) SHEA Guideline for Preventing Nosocomial Transmission of Multidrug-Resistant Strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24(5):362-86.

Nallapareddy, S. R., G. M. Weinstock, B. E. Murray. (2000). Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acn, a new member of the MSCRAMM family. *Mol. Microbiol.* 47(6):1733–47.

Naser SM, Vancanneyt M, De Graef E, Devriese LA, Snauwaert C, Lefebvre K, Hoste B, Svec P, Decostere A, Haesebrouck F, Swings. (2005). *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. *J.Int J Syst Evol Microbiol.* 55: 5:2177-82.

Nelson I, Higueta A, Huycke MM (2014) Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirm

Nicas, T. I.; Allen, N. E. (1994), Resistance and mechanism of action. In *Glycopeptide Antibiotics*, Nagarajan, R., Ed. Marcel Dekker: New York (NY), pp 219-241.

Niemi RM, Ollinkangas T, Paulin L, Svec P, Vandamme P, Karkman A, Kosina M, Lindström K. (2012). *Enterococcus rivorum* sp. nov., from water of pristine brooks. *Int J Syst Evol Microbiol.* 62:9:2169-73.

Noble WC, Virani Z, Cree RG (1992) Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 72:195–8

Norris E. Allen (2010). From Vancomycin to Oritavancin: The Discovery and Development of a Novel Lipoglycopeptide Antibiotic Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry, 9:23-47.

Novicki TJ, Schapiro JM, Ulness BK et al (2004) Convenient selective differential broth for isolation of vancomycin-resistant enterococcus from fecal material. *J Clin Microbiol* 42(4):1637-40.

Ochoa, S.A., G. Escalona, A. Cruz-Córdova, L. B. Dávila, Z. Saldaña, V. Cázares-Domínguez, C. A. Eslava, B. López-Martínez, R. Hernández-Castro, G. Aquino-Jarquín, J. Xicohtencatl-Cortés. (2013). Molecular analysis and distribution of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* isolates belonging to clonal complex 17 in a tertiary care center in Mexico City. *BMC Microbiol.*13:291.

O'Driscoll, C, V. Murphy, O.Doyle, C. Wrenn, A. Flynn, N. O'Flaherty, L.E. Fenelon, K. Schaffer, S.F. FitzGerald. 2015. First outbreak of linezolid-resistant vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in an Irish hospital, February to September 2014. *J. Hosp. Infect.* 91(4):367-70.

Oh, W. S., K. S. Ko, J-H. Song, M. Y. Lee, S. Park, K. R. Peck, N. Y. Lee, C-K. Kim, H. Lee, S-W. Kim, H-H. Chang, Y-S. Kim, S-I. Jung, J. S. Son, J-S- Yeom, H. K. Ki, G.-J. Woo. 2005. High rate of resistance to quinupristin-dalfopristin in *Enterococcus faecium* clinical isolates from Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(12):5176-78.

Onodera, Y., J. Okuda, M. Tanaka & K. Sato, (2002) Inhibitory activities of quinolones against DNA gyrase and topoisomerase IV of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1800-1804.

Özsoy S, İlki A (2017) Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in stool specimens submitted for *Clostridium difficile* toxin testing. *Braz J Microbiol* 48(3): 489–492.

- Panesso, D., J. Reyes, S. Rincon, L. Díaz, J. Galloway-Pena, J. Zurita, C. Carrillo, A. Merentes, M. Guzman, J. A. Adachi, B. E. Murray, C. A. Arias. 2010. Molecular Epidemiology of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: a Prospective, Multicenter Study in South American Hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 48(5):1562-1569.
- Parenti, F. (1986). Structure and mechanism of action of teicoplanin. *J. Hosp. Infect.*, 7 (Suppl. A),79-83.
- Patterson J.E., S.M. Colodny and M.J. Zervos. (1988). Serious infection due to beta-lactamase-producing *Streptococcus faecalis* with high-level resistance to gentamicin. *J. Infect. Dis.* 158: 1144–1145.
- Perichon, B., P. Reynolds, and P. Courvalin. (1997). VanD type glycopeptideresistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:2016–2018.
- Pfeiffer RR. (1981). Structural features of vancomycin. *Rev Infect Dis.* 3:205-9.
- Pittenger, R. C. (1956). Brigham, R. B. *Antibiot. Chemother.* 6, 642-647.
- Poeta P, Costa D, Sáenz Y, Klibi N, Ruiz-Larrea F, Rodrigues J, Torres C (2005). Characterization of antibiotic resistance genes and virulence factors in faecal enterococci of wild animals in Portugal. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 52(9):396-402.
- Pompei, R., Berlutti, F., Thaller, M. C., Ingianni, A., Cortis, G. and Dainelli, B. (1992) *Enterococcus flavescens* sp. nov., a new species of enterococci of clinical origin. *Int J Syst Bacteriol*, 42, 365-9.
- Purohit G, Gaiind R, Dawar R Verma PK, Aggarwal KC, Sardana R, Deb M. (2017) Characterization of Vancomycin Resistant Enterococci in Hospitalized Patients and Role of Gut Colonization. *J Clin Diagn Res* 11(9): DC01–DC05.
- Quintiliani R Jr, Courvalin P. (1996). Characterization of Tn1547, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* BM4281 *Gene.* 12;172(1):1-8.
- Raad, I. I., H. A. Hanna, M. Boktour, G. Chaiban, R. Y. Hachem, T. Dvorak, R. Lewis, B. E. Murray. 2005. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: catheter colonization, esp gene,

and decreased susceptibility to antibiotics in biofilm *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(12): 5046–5050.

Rahkila, R. Per Johansson, Elina Säde, and Johanna Björkroth. (2011). Identification of Enterococci from Broiler Products and a Broiler Processing Plant and Description of *Enterococcus viikkiensis* sp. nov. *Appl Environ Microbiol.* 77(4): 1196–1203.

Rakita, R. M., Vanek, N. N., Jacques-Palaz, K., Mee, M., Mariscalco, M. M., Dunny, G. M., (1999). *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. *Infect. Immun.*, 67(11), 6067-6075.

Ramadhan, A. A., E. Hegedus. 2005. Biofilm formation and *esp* gene carriage in enterococci. *J. Clin. Pathol.* 58(7):685–686

Raze, D., Dardenne, O., Hallut, S., Martinez-Bueno, M., Coyette, J. and Ghuysen, J. M. (1998) The gene encoding the low-affinity penicillin-binding protein 3r in *Enterococcus hirae* S185R is borne on a plasmid carrying other antibiotic resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*, 42, 534-9.

Rhinehart E., N.E. Smith, C. Wennersten, E. Gorss, J. Freeman, G.M. Eliopoulos, R.C. Moellering Jr. and D.A. Goldmann. (1990). Rapid dissemination of β -lactamase-producing, aminoglycosideresistant *Enterococcus faecalis* among patients and staff on an infant/toddler surgical ward. *N. Engl. J. Med.* 323: 1814–1818.

Rodrigues, U. and Collins, M. D. (1990) Phylogenetic analysis of *Streptococcus saccharolyticus* based on 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiol Lett*, 59, 231-4.

Rozdzinski, E., Marre, R., Susa, M., Wirth, R., & Muscholl-Silberhorn, A. (2001). Aggregation substance-mediated adherence of *Enterococcus faecalis* to immobilized extracellular matrix proteins. *Microb. Path.*, 30(4), 211-220.

Salminen, S. Wright, A. V. and Ouwehand, A. (2004). Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects (Third ed.). New York: Mercel Dekker.

- Sarti M., Campanile, F., Sabia, C., Santagati, M, Gargiulo R. Stefani S. (2012). Polyclonal diffusion of beta-lactamase-producing *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol, 50 pp. 169-172.
- Schleifer, K. H., Kraus, 1., Dvorak, e., Kilpper-Biilz, R., Collins, M.D. and Fischer, W. (1985) Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. Systematic and Applied Microbiology, 6, 183-195.
- Schliefer, K. H. and Killper-Baltz, R. (1984) Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 34, 31-4.
- Sedláček I, Holochová P, Mašlaňová I, Kosina M, Spröer C, Bryndová H, Vandamme P, Rudolf I, Hubálek Z, Švec P. (2013). *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two urease-producing enterococci from the environment. Int J Syst Evol Microbiol. 63:2:502-10.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. (2009) Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. Clin Infect Dis 49(4):543–51
- Shankar, N., C. V. Lockatell, A. S. Baghdayan, C. Drachenberg, M. S. Gilmore, D. E. Johnson. 2001. Role of *Enterococcus faecalis* Surface Protein Esp in the Pathogenesis of Ascending Urinary Tract Infection. Infect. Immun. 69(7):4366-4372.
- Singh, K. V., S. R. Nallapareddy, J. Sillanpa, B. E. Murray. (2010). Importance of the Collagen Adhesin Ace in Pathogenesis and Protection against *Enterococcus faecalis* Experimental Endocarditis. PLoS Pathog 6(1): e1000716.
- Sistek V, Maheux AF, Boissinot M, Bernard KA, Cantin P, Cleenwerck I, De Vos P, Bergeron MG. (2012). *Enterococcus ureasiticus* sp. nov. and *Enterococcus quebecensis* sp. nov., isolated from water. Int J Syst Evol Microbiol. 62:6:1314-20.
- Soares, R. O., A. C. Fedi, K. C. Reiter, J. Caierão, P. A. d'Azevedo. (2014). Correlation between biofilm formation and gelE, esp, and agg genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. Virulence. 5 (5):634-637.

Sohn KM, Peck KR, Joo EJ et al (2013) Duration of colonization and risk factors for prolonged carriage of vancomycin-resistant enterococci after discharge from the hospital. *Int J Infect Dis* 17(4):e240-6.

Souli, M. , V. Sakka, I. Galani, A. Antoniadou, L. Galani, N. Siafakas, L. Zerva, H. Fytro, S. Tsiodras, H. Giamarellou. (2009). Colonisation with vancomycin- and linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in a university hospital: molecular epidemiology and risk factor analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 33(2):137-142.

Stepanovic, S., D. Vukovic, I. Dakic, B. Savic, M. Svabic-Vlahovic. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*. 40(2):175-9.

Stepanovic, S., D. Vukovic, V. Hola, G. Di Bonaventura, S. Djukic, I. Cirkovic, F. Ruzicka. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 115(8):891-9.

Stosor V, Peterson LR, Postelnick M, Noskin GA. (1998) *Enterococcus faecium* bacteremia: does vancomycin resistance make a difference? *Arch Intern Med* 158(5):522-7.

Sukontasing S, Tanasupawat S, Moonmangmee S, Lee JS, Suzuki K. (2007). *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*. 57:9:2151-4.

Svec, P., Devriese, L. A., Sedlacek, I., Baele, M., Vancanneyt, M., Haesebrouck, F., Swings, J. and Doskar, J. (2001) *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, 1567-74.

Svec P, Vancanneyt M, Devriese LA, Naser SM, Snauwaert C, Lefebvre K, Hoste B, Swings J. (2005). *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol*. 55:5:2183-7.

Svec P, Vancanneyt M, Koort J, Naser SM, Hoste B, Vihavainen E, Vandamme P, Swings J, Björkroth. J. (2005). *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *Int J Syst Evol Microbiol*. 55:6:2479-84.

Svec P, Vancanneyt M, Sedláček I, Naser SM, Snauwaert C, Lefebvre K, Hoste B, Swings J. (2006). *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 56:3:577-81.

Svec P, Vandamme P, Bryndová H, Holochová P, Kosina M, Maslanová I, Sedláček I. (2012) *Int J Syst Evol Microbiol*. *Enterococcus plantarum* sp. nov., isolated from plants. . 62:7:1499-505.

Tan SY, Tatsumura Y. Alexander Fleming (1881-1955) (2015): Discoverer of penicillin. *Singapore Med J*. ;56(7):366–367.

Tanasupawat S, Sukontasing S, Lee JS. (2008). *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*. 58:7:1630-4.

Teixeira, L. M., Carvalho, M. G., Espinola, M. M., Steigerwalt, A. G., Douglas, M. P., Brenner, D. J. and Facklam, R. R. (2001) *Enterococcus porcinus* sp. nov. and *Enterococcus ratti* sp. nov., associated with enteric

Teixeira, L. M. and Facklam, R. R. (2003) *Enterococcus*. In: *Manual of Clinical Microbiology* (Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., and Tenover, F. C.,) 8th edn, ASM, Washington, DC, pp. 422–429.

Tendolkar, P.M., A. S. Baghdayan, M. S. Gilmore, N. Shankar. 2004. Enterococcal Surface Protein, Esp, Enhances Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis* *Infect. Immun*. 72(10):6032–39.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, B. Swaminathan. 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing *J. Clin. Microbiol*. 33(9):2233-2239.

Thiercelin, M. (1899) Sur un diplocoque saprophyte de l'intestine susceptible de devenir pathogene. *C.R. Soc. Biol.*, 5, 269-71.

Toledo-Arana, A. , J. Valle, C. Solano, M.J. Arrizubieta, C. Cucarella, M. Lamata, B. Amorena, J. Leiva, J. R. Penadés, I. Lasa I. 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is

involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(10):4538-4

Top J, Willems R, Bonten M (2008) Emergence of CC17 *Enterococcus faecium*: from commensal to hospital-adapted pathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52:297–308.

Tyrrell, G. J., Turnbull, L., Teixeira, L. M., Lefebvre, J., Carvalho Mda, G., Facklam, R. R. and Lovgren, M. (2002) *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. isolated from human clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 40, 1140-5.

Uttley, A. H., C.H. Collins, J. Naidoo, R. C. George. (1988). Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*. 1(8575-6):57-8.

Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Cleenwerck, I., Baele, M., Descheemaeker, P., Goossens, H., Pot, B., Vandamme, P., Swings, J., Haesebrouck, F. and Devriese, L. A. (2001) *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51, 393-400.

Vancanneyt, M, Zamfir M, Devriese LA, Lefebvre K, Engelbeen K, Vandemeulebroecke K, Amar M, De Vuyst L, Haesebrouck F, Swings. (2004). *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. *J.Int J Syst Evol Microbiol.* 54:6:2175-9.

Van den Braak, N., Kreft, D., van Belkum, A., Verbrugh, H. and Endtz, H. (1997). Vancomycin-resistant enterococci in vegetarians. *Lancet*, 350, 146-7.

Van Schaik, W., J. Top, D. R. Riley, J. Boekhorst, J. EP. Vrijenhoek, C. ME. Schapendonk, A. PA. Hendrickx, I. J. Nijman, M. JM. Bonten, H. Tettelin, R. JL. Willems. 2010. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics*. 11:239.

Wells V.D., E.S. Wong, B.E. Murray, P.E. Coudron, D.S Williams and S.M. Markowitz. (1992). Infections due to beta-lactamase-producing, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Ann. Intern. Med.* 116: 285–292.

Werner, G., T. M. Coque, A. M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K. G. Kristinsson, R. Leclercq, C. H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L. V.

Peixe, E. Sadowy, G. S. Simonsen, J. Top, J. Vuopio-Varkila, R. J. Willems, W. Witte, N. Woodford. (2008). Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.* 13:47.

Wheeler AL, Hartel PG, Godfrey DG, Hill JL, Segars WI. (2002). Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *J Environ Qual.* 31(4):1286-93.

Willems, R. J. L., W. P. Hanage, D. E. Bessen, E. J. Feil. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35(5): 872–900

Willems, R. J., J. Top, M. van Santen, D. A. Robinson, T. M. Coque, F. Baquero, H. Grundmann, M. J. Bonten. 2005. Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *J Emerg Infect Dis* 11(6):821-8.

Willems, R. J., W. Homan, J. Top, M. van Santen-Verheuveld, D. Tribe, X. Manziros, C. Gaillard, C. M. Vandenbroucke-Grauls, E. M. Mascini, E. van Kregten, J. D. van Embden, M. J. Bonten. 2001. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet.* 357(9259):853–855.

Williams, A. M., Farrow, J. A. E. and Collins, M. D. (1989) Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 495-7.

Woodford N, Johnson AP, Morrison D, Speller DC, Woodford N, Johnson AP, Morrison D, Speller DC (1995): Current perspectives on glycopeptide resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 8 :585–615.

Woodford, N., M. Soltani, K. J. Hardy. (2001). Frequency of *esp* in *Enterococcus faecium* isolates. *Lancet.* 358(9281):584.

Xu, X., D. Lin, G. Yan, X. Ye, S. Wu, Y. Guo, D. Zhu, F. Hu, Y. Zhang, F Wang, G. A. Jacoby, M. Wang. (2010). *vanM*, a New Glycopeptide Resistance Gene Cluster Found in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(11):4643-4647.

Yang, J.X, T. Li, Y. Z. Ning, D.H. Shao, L. Jing, S-Q Wang, G.W. Liang.2015. Molecular characterization of resistance, virulence and clonality in vancomycin-resistant *Enterococcus*

faecium and *Enterococcus faecalis*: A hospital-based study in Beijing, China. *Infect. Genet. Evol.* 33:253-60.

Yean, C. Y., L. S. Yin, P. Lalitha, M. Ravichandran. (2007). A nanoplex PCR assay for the rapid detection of vancomycin and bifunctional aminoglycoside resistance genes in *Enterococcus* species. *BMC Microbiol.* 7:112.

Zhu, X., B. Zheng, S.Wang, R. J. L. Willems, F.Xue, X.Cao, Y.Li, S.Bo, J.Liu. 2009. Molecular characterisation of outbreak-related strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from an intensive care unit in Beijing, China. *J. Hosp. Infect.* 72(2):147-154.

Zurenko, G., W. M. Todd, B. A. Hafkin, B. Myers, C. Kaufman, J. Bock. 1999. Development of linezolid-resistant *Enterococcus faecium* in two compassionate use program patients treated with linezolid (abstract 848), Program and abstracts of the 39th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (San Francisco), D.C. American Society for Microbiology pg. 118.



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/357/2019.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Franyó Dorottya

Neptun kód: NWFL9M

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Franyó, D.**, Kocsi, B., Bukta, E., Szabó, J., Dombrádi, Z. R.: Assessing the intestinal carriage rates of vancomycin-resistant Enterococci (VRE) at a tertiary care hospital in Hungary.
Folia Microbiol. "Accepted by Publisher", 2019.
IF: 1.448 (2018)
2. **Franyó, D.**, Kocsi, B., Lesinszki, V., Pászti, J., Kozák, A., Bukta, E., Szabó, J., Dombrádi, Z. R.: Characterization of Clinical Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium Isolated in Eastern Hungary.
Microb. Drug Resist. 24 (10), 1559-1567, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2018.0074>
IF: 2.397





További közlemények

3. **Franyó, D.**, Dombrádi, Z. R.: MALDI-TOF tömegspektrometriás mérések optimalizálása, klinikai mintákból izolált *Staphylococcus lugdunensis* törzsek azonosításában.
In: Tavasz Szél 2015 / Spring Wind 2015. IV. kötet: Orvos- és egészségtudomány, pszichológia és neveléstudomány, szociológia és multidiszciplináris történelem és politikatudomány. Szerk.: Keresztes Gábor, Doktoranduszok Országos Szövetsége, EKF Líceum Kiadó, Budapest, Eger, 35-45, 2015.
4. **Franyó, D.**, Boros Oláh, B., Ozgyin, L., Bálint, B. L.: Befolyásolja-e az életmód génjeink működését?: az epigenetikai kutatások irányvonalai és eredményei.
LAM KID. 2 (1), 37-42, 2012.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 3,845

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
3,845**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.10.28.



11. TÁRGYSZAVAK-KEYWORDS

vancomycin-rezisztens enterococcus, antibiotikum rezisztencia, polimeráz láncreakció, multilokus szekvencia tipizálás, pulzálómezőű gélelektroforézis, rezisztencia gének, virulencia faktorok

vancomycin-resistant enterococcus, antibiotic resistance, polymerase chain reaction, multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, resistance genes, virulence factors

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni korábbi témavezetőmnek a Bakteriológiai Laboratórium vezetőjének Dr. Szabó Juditnak, hogy lehetőséget biztosított számomra a laboratóriumban a kísérletes munka elkezdéséhez.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Zudorné Dr. Dombrádi Zsuzsannának, aki munkám során értékes elméleti és gyakorlati tanácsokkal volt segítségemre és munkámat minden körülmények között támogatta és segítette.

Köszönet illeti Prof. Dr. Kónya Józsefet, hogy lehetővé tette számomra, hogy PhD tanulmányomat az Orvosi Mikrobiológia Intézetben végezhessem.

Köszönet illeti az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden munkatársát, különösen a Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumban dolgozók munkáját.

Köszönöm Dr. Tóth Ákosnak a vizsgálatainkhoz nyújtott kontroll törzs adományozását.

Köszönöm Dr. Pászti Juditnak és Lesinszki Virágnak az *Enretococcus* törzsek PFGE vizsgálatát.

Végezetül, de nem utolsó sorban szeretném köszönetem kifejezni férjemnek, családomnak és barátaimnak, akik minden körülmények között mellettem álltak és biztatásukkal folyamatosan támogattak.

13. FÜGGELÉK

Az értekezés témájához kapcsolódó fontosabb előadások listája:

Franyó Dorottya, Zelizi Dóra, Kozák Anita, Szabó Judit, Dombrádi Zsuzsanna. Vancomycin-rezisztens *Enterococcus* törzsek azonosítása, molekuláris biológiai és epidemiológiai vizsgálata a Debreceni Egyetem Klinikáin. Doktoranduszok Országos Szövetsége által rendezett Tavaszi szél Konferencia. 2016. április 15-17. Budapest.

Franyó Dorottya, Lesinszki Virág, Pászti Judit, Kocsi Balázs, Kozák Anita, Bukta Evelin Erzsébet, Szabó Judit, Dombrádi Zsuzsanna. Vancomycin-rezisztens *Enterococcus faecium* törzsek jellemzése a Debreceni Egyetemi klinikán. Magyar Mikrobiológiai Társaság 2018. évi Nagygyűlése és a XIII. Fermentációs Kollokvium. 2018. október 17-19. Eger.