

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Vancomycin-rezisztens enterococcusok
molekuláris biológiai vizsgálata**

Kocsiné Franyó Dorottya

Témavezető: Dr. Dombrádi Zsuzsanna Rita



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2019

VANCOMYCIN-REZISZTENS ENTEROCOCCUSOK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI VIZSGÁLATA

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a Gyógyszertudományok tudományágban

Írta: Kocsiné Franyó Dorottya okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Mikrobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Dombrádi Zsuzsanna Rita, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Rozgonyi Ferenc, az MTA doktora
Prof. Dr. Biró Sándor, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem GYTK, Gyógyszerhatástani Tanszék
könyvtára

2020. január 20. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Ujfalusi Anikó, PhD
Dr. Ostorházi Eszter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Tószaki Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Rozgonyi Ferenc, az MTA doktora
Prof. Dr. Biró Sándor, az MTA doktora
Dr. Ujfalusi Anikó, PhD
Dr. Ostorházi Eszter, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A”
épületének tanterme

2020. január 20. 13 óra

BEVEZETÉS

Napjaink egyik legsúlyosabb közegészségügyi problémája a különböző antibiotikumokkal szembeni rezisztens törzsek által okozott infekciók egyre gyakoribb előfordulása. A Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (CDC) 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. A súlyos, noszokomiális 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 és sebfertőzéseket, valamint húgyúti infekciókat. Klinikai szempontból releváns fajok az *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *E.gallinarum* és *E. casseliflavus*. Az enterococcusok közül a vancomycinnel szemben rezisztenciát mutató törzsek (VRE) a terápiás lehetőségek szűkössége miatt a legveszélyesebbek, az enterococcusok által okozott noszokomiális fertőzések kb. 30%-áért tehetők felelőssé. A CDC adatai alapján a VRE fertőzések 77%-át *Enterococcus faecium*, 9%-át pedig *Enterococcus faecalis* okozza. A VRE *faecium* (VRE_{fm}) növekvő előfordulása hazánkban is aggodalomra ad okot. Az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (ECDC) legfrissebb statisztikája alapján, Magyarországon 2011 óta figyelhető meg a VRE_{fm} törzsek folyamatos előretörése; 2011-2018 között: 0,8%-ról - 39,5%-ra nőtt az arányuk invazív mintákból származó izolátumok körében.

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, míg Európában az állattenyésztésben hozamnövelés céljából alkalmazott glikopeptid-analógoknak (például avoparcinnak) a használatával és az élelmiszerláncba történő bekerülésével magyarázzák. Az enterococcusok mindenütt megtalálhatóak a gyomor-bél traktusban, a normál bélflóra kb. 0,01%-át teszik ki, székletben található tipikus koncentrációjuk 10^8 Colony Forming Unit (CFU)/gramm. 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. A kolonizáltak rezervoárként funkcionálhatnak a többi bent lévő beteg megfertőzésében, mely megnövekedett morbiditást, mortalitást és újabb költségeket eredményezhet.

Ebben a helyzetben egyre fontosabb szerepet tölt be a rezisztens baktériumok surveillance-e. 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.

CÉLKITŰZÉSEK

Célunk volt a VRE előfordulásának felmérésre és karakterizálása klinikai mintákból, molekuláris biológiai és epidemiológiai módszerek segítségével. A megnövekedett számú fertőzések egyik lehetséges okaként feltételeztük a VRE törzsek székletben történő hordozását, ezért vizsgálatainkat széklet mintákból is elvégeztük illetve elemeztük a hordozást elősegítő rizikó faktorokat.

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.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgált izolátumok:

Mintáink a Bakteriológiai Diagnosztikai Laboratóriumában feldolgozott vizsgálati anyagok voltak. A 2012. január 1. és 2015. december 31. között beérkezett klinikai mintákból rutinszerűen a VRE szűrés 6 µg/l vancomycint tartalmazó VRE Screen lemez segítségével történt. 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 VRE Screen lemezre oltottuk a mintákat direkt módon üvegbot segítségével. A második periódusban 2016.07.06.-09.30 között (88nap, 971 minta) folyékony szűrő tápoldatot használtunk. Mindkét módszer esetén 24-48 órás inkubációs periódus következett 37°C-on. Az így növekvő fekete telepeket átoltottuk, illetve a feketére színeződő tápoldatból kioltást végeztünk 5%-os véres agarra.

A faji szintű azonosítást MALDI-TOF tömegspektrométerrel végeztük. Minden beteg esetében csak az első izolátumot vettük figyelembe, amennyiben későbbi mintájából is ugyanaz a faj tenyésztett ki.

Antibiotikum érzékenység meghatározása:

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat az EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) aktuális évi, érvényben lévő nemzetközi ajánlásai alapján végeztük. A Kirby-Bauer féle korongdiffúziós módszerrel szemikvantitatív módon lehet meghatározni a baktériumok antimikrobiális szerekekkel szembeni in vitro érzékenységét. Kísérleteink során az alábbi antibiotikum tartalmú korongokat (Bio-Rad) használtuk: ampicillin (2 mg), gentamicin (30 mg) és ciprofloxacín (5 mg). A minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározására 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, és gradiens alapján diffundál a táptalajba. Ezzel a módszerrel az alábbi antibiotikumok vizsgálatára került sor: vancomycin, teicoplanin, daptomycin, tedizolid, linezolid, quinupristin/dalfopristin és tigecyclin (BioMerieux, Liofilchem).

Molekuláris biológiai vizsgálatok:

Polimeráz láncreakció (PCR):

A PCR reakciók templatjaként a baktériumokból forralásos módszerrel nyert lizátumokat használtuk (Yean és mtsai. 2007) A *van* rezisztencia génekre (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*) illetve az *E. faecalis* és *E. faecium* D-alanin-D-alanin ligáz (*ddl*) génjeire specifikus primereket 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. Az MLST során a nemzetközi <https://pubmlst.org/> webhely szerint végeztük a szekvenálást megelőző PCR-eket (Homan és mtsai 2002).

A reakciók eredményét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

Biofilmképzés vizsgálata:

A VRE törzsek biofilm képzését Stepanovic és mtsai. (2007) által publikált, módosított mikrotiter-plate teszt segítségével vizsgáltuk, melyet kisebb mértékben optimalizáltunk. Ez a módszer mind az ELISA plate aljára mind pedig a falára kitapadt baktériumokat is képes lemérni. Az optikai denzitásokat (OD) ELISA Reader segítségével 540/620 nm hullámhosszon

határoztuk meg. A cut-off értéket (OD_c) a negatív kontroll átlagos OD értékéből számítottuk. Az eredmények kiértékelése során a leolvasott optikai denzitások átlagának cut-off értékhez (OD_c) való viszonya alapján a vizsgált törzseket az alábbi csoportokba soroltuk: $OD \leq OD_c \rightarrow$ nem biofilmképző; $OD_c < OD \leq 2 OD_c \rightarrow$ gyenge biofilmképző; $2 OD_c < OD \leq 4 OD_c \rightarrow$ közepes biofilmképző; $4 OD_c < OD \rightarrow$ erős biofilmképző.

Epidemiológiai tipizálási módszerek:

Pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE):

A VRE törzsek PFGE vizsgálatát a Nemzeti Népegészségügyi Központban Murray és mtsai. illetve McEllistrem és munkatársai által leírt protokoll alapján végezték kisebb módosításokkal. A dendrogramokat a Fingerprinting II. program 3.0 verziójával analizáltuk (Bio-Rad), Dice-koefficiens alkalmazásával az „unweighted pair group method with arithmetic means” (UPGMA) módszerrel, 1.0% sáv pozíció toleranciával és 1.0% optimalizációval. A PFGE mintázatokat Tenover és mtsai (1995) alapján elemeztük ki.

Multilokus szekvencia tipizálás (MLST):

Az *E. faecium* törzsek MLST vizsgálata során 7 háztartási gén (*adk*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *purK*, *pstS*) belső gén fragmentumának szekvenálása történt. Az így nyert fragmentek szekvenciáit összevettem a nemzetközi adatbázisban (<https://pubmlst.org>) található megfelelő alléllal, mely eredményeként megkaptam a törzsek allélikus profiljait és az ezekhez tartozó szekvencia típusokat (ST). A ST-k csoportosításához a goeBURST 1.2.1. algoritmust használtuk.

Epidemiológiai adatok elemzése:

A VRE széklet hordozók betegadatait a szűrést megelőző 6 hónapig visszamenőleg elemeztük az alábbi tényezőkre: életkor, nem, alapbetegség, a kórházi tartózkodás időtartama, antibiotikum-fogyasztás, intravénás katéter, dialízis, nazogasztrikus cső, tracheostoma, illetve lélegeztető gép használata, normál bélflóra hiánya valamint toxin pozitív *Clostridioides difficile* lelet jelenléte. A szűrővizsgálatot megelőző és az azt követő 6 hónapot figyelembe véve adatbázisunkban (MedBakter) elemeztük a VRE-t hordozók bármely más VRE pozitív klinikai mintáját is. A hordozást elősegítő rizikó faktorok meghatározása céljából a szűrés alatti időszakból 93 széklet VRE negatív beteg jellemzőit is vizsgáltuk. Ebbe a populációba a betegeket Monte-Carlo szimulációval választottuk ki véletlenszám-generáció alapján.

Az adatokat az SPSS szoftver 24.0 verziójával (SPSS Inc.) értékeltük ki. A VRE-vel történő kolonizáció eredményét bináris kategorikus változóként fejeztük ki. Az összes kategorikus változót Khi-négyzet próbával elemeztük. Ha az összes várható értékkérvencia 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 tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Esély hányados tesztet alkalmaztunk a kockázati tényezők és a VRE kolonizáció közötti kapcsolat meghatározására.

Esp és biofilmképzés közötti kapcsolat elemzése:

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 (SPSS Inc. v. 24.0).

EREDMÉNYEK

Klinikai mintákból származó VRE törzsek jellemzése

A négyéves vizsgálati időszak alatt összesen 7799 *Enterococcus* fajt izoláltunk különféle klinikai mintákból. Közülük 73 nőtt ki a VRE Screen lemezen melyek 43 betegből származtak. A MALDI-TOF MS-sel történő faji azonosításuk során az összes *E. faecium*-nak bizonyult, magas találati valószínűséggel. A *VREfm* törzsek legnagyobb hányadát sebből/decubitusból (26%), vizeletből (23,3%), vérből és kanülből (14-14%) izoláltuk. A betegek átlagéletkora 57 év volt, majdnem azonos nemek szerinti megoszlással (férfi: 51,2%, nő: 48,8%).

Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredményei

Az összes izolátum rezisztens volt vancomycinnel, ampicillinnel és ciprofloxacinnel szemben, míg 81,4%-uk gentamicinnel szemben is. A törzsek 7%-a mutatott rezisztenciát teicoplanin iránt. Az újabb antibiotikumokkal szemben: linezolid, tedizolid, tigecyclin és daptomycin mind érzékenyek voltak.

Vancomycin-rezisztencia gének illetve virulencia faktorok kimutatása

A 43 *VREfm* izolátum közül 40-nél mutattunk ki *vanB* (93%) 3 esetében pedig *vanA* (7%) rezisztencia gént. Az *Esp* fehérjét kódoló gén 7 (16,3%) izolátumban volt jelen, melyeket különféle invazív és nem invazív helyekről származó mintákból nyertünk: vérből, kanülből, cerebrospinális folyadékból, bronchusmosásból, köpetből, vizeletből és decubitusból. Egyik izolátum sem adott PCR-terméket a *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *ace* vagy *agg* specifikus primerekkel.

Biofilmképzés eredményei

A vizsgált izolátumok 40%-a volt biofilm képző. A 43 izolátum közül egyik sem bizonyult erős biofilm képzőnek, 4 (24%) volt közepes, míg 13 volt (76 %) gyenge biofilm képző. A biofilmet termelők 71,4%-a (5/7) invazív, 33,3% (12/36) nem invazív mintából származott. A Khi-négyzet próba alapján nem volt statisztikailag szignifikáns korreláció a biofilm termelése és az izolációs hely között. Összefüggést tudtunk kimutatni 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 biofilm termelésre, amennyiben 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.

Epidemiológiai vizsgálatok eredményei

PFGE vizsgálatokat a 2012 és 2013-ból származó összes törzs esetében, míg az ezt követő években csak az invazív törzsek illetve *vanA* pozitívak esetében végeztük el. Az így kiválasztott 23 *VREfm* izolátum 9 PFGE-típust tárt fel, $\geq 85\%$ -os hasonlósági határérték alapján. A fő pulzótípus az ENTCO-062 volt, ebbe a típusba 11 izolátum tartozott, mindegyikük a *vanB* rezisztencia gént hordozta. A második leggyakoribb az ENTCO-075 volt, melybe 4 izolátum tartozott, 3 hordozta a *vanB*, 1 a *vanA* rezisztencia gént. A harmadik az ENTCO-151 típus volt, 2 *vanA* izolátummal. A 6 további PFGE típus mindegyike egyetlen izolátummal jelent meg.

MLST vizsgálatra 14 *VREfm* izolátumot választottunk ki, mely alapján 6 különböző ST-t tudtunk elkülöníteni. A domináns az ST17 volt, melybe 6 *vanB* 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) tartozott, mely a nosokomiális *E. faecium* törzsekre jellemző.

Székletből izolált VRE törzsek jellemzése

Az első vizsgálati időszakban összesen 2050 széklet mintát vizsgáltunk szilárd VRE Screen lemezzel. Ezek közül 313 minta esetén tapasztaltunk fekete növekedést. Telepmorfológia alapján a MALDI-TOF mérésekhez 266 izolátumot választottunk ki. A második vizsgálati időszakban 971 széklet mintát szűrtünk VRE tápfolyadék használatával, melyből 469 okozta a dúsító feketedését, ezekből 264 izolátumot vizsgáltunk tovább.

A két vizsgálati időszak alatt összesen 102 VRE pozitív székletmintát találtunk, melyek 93 betegről származtak. A species szintű azonosítás alapján 71 törzs volt *Enterococcus faecium*, míg a második leggyakoribb az *E. gallinarum* (n = 23), melyet 5 *E. faecalis*, 2 *E. casseliflavus* és 1 *E. hirae* követett. Az *E. faecium* izolátumok közül 33 volt *vanA* és 38 *vanB* pozitív. 4 *vanA* és 1 *vanB* pozitív *E. faecalis* törzset mutattunk ki. Az egyetlen *E. hirae* törzs *vanA* pozitív volt. Az összes *E. gallinarum* *vanC1* míg az összes *E. casseliflavus* a *vanC2* gént hordozta.

A *VanB* pozitív izolátumok magas szintű rezisztenciát mutattak a vancomycinnel szemben és érzékenyek voltak teicoplaninra, míg a *vanA* pozitív izolátumok mindkét antibiotikummal szemben magas szinten rezisztensek voltak. Az összes *vanC* törzs alacsony szintű vancomycin rezisztenciát mutatott és mind érzékenyek voltak a teicoplaninra. Szerencsére az izolátumok érzékenyek voltak linezolidra, tigecyclinre és daptomycinre. Quinupristin/dalfopristin rezisztenciát négy *E. faecalis* izolátumban tudtunk detektálni.

VRE törzset hordozók epidemiológiai jellemzői:

A hordozók átlagéletkora 47 év volt. A szűrést megelőző 6 hónapban az átlagos kórházi tartózkodásuk 25 nap volt. A leggyakrabban előforduló alapterbetegségek 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%-ukban tapasztaltuk. 18 (19,4%) VRE hordozó esetében mutattunk ki *C. difficile* infekciót legalább egyszer (a szűrés időpontjában vagy az azt megelőző 6 hónapban).

A 93 VRE hordozó és azonos számú nem hordozó adatainak statisztikai elemzése kimutatta, hogy a cukorbetegség, a normál flóra hiány, a *C. difficile* pozitivitás, a hosszabb kórházi tartózkodás és az előrehaladott életkor szignifikánsan hozzájárult a VRE kolonizációhoz. Cukorbetegség esetében a VRE hordozás esélye 12,46-szoros. A kolonizált betegek 78,5%-a kapott legalább egyféle antibiotikumot, mely szerek közül a metronidazolt alkalmazták a leggyakrabban (47,3%), majd a különböző cefalosporinokat (40,9%).

Szűrőmódszerek jellemzése:

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 azonosítottunk.

MEGBESZÉLÉS

Korábban kutatócsoportunk felmérte a VRE prevalenciáját 2004 és 2009 között és megállapította, hogy a *vanC* pozitív *E. gallinarum* és *E. casseliflavus* törzsek domináltak a klinikai mintákban. Azóta ez a kép megváltozott. Az ECDC legfrissebb adatai rámutattak az invazív *VREfm* 2012 és 2018 közötti jelentős növekedésére. Az országosan emelkedő tendenciával összhangban mi is hasonlót figyeltünk meg. Kimutattuk, hogy az invazív és nem invazív *VREfm* aránya 2011 és 2015 között 1,7%-ról 11%-ra emelkedett.

Kutatásunkban a legújabb antibiotikumokat még hatásosnak találtuk az izolátumokkal szemben.

A vizsgált virulencia faktorok közül az *Ace-t* kódoló gén egyik törzsben sem fordult elő. Ez megegyezik más kutatócsoportok korábbi megállapításaival, akik csak *E. faecalis*-ban találták meg. Hasonló eredményt kaptunk az *agg* esetében. Vizsgálatunkban az *esp* volt az egyetlen virulencia faktor, amelyet a törzsek 16,3%-ában megtaláltunk. Számos korábbi tanulmány kimutatta, hogy az *esp* hordozás az egyik jellemzője a kórházakban elterjedt antibiotikum-rezisztens *E. faecium* törzseknek.

Kutatócsoportunk vizsgálta a biofilm képzést és annak kapcsolatát a virulencia gének jelenlétével. Gyenge összefüggést tudtunk kimutatni az *esp* gén jelenléte és a biofilm termelés között. 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.

A PFGE vizsgálat 9 különböző pulzótípust mutatott ki. A törzsek 74%-át 3 fő klaszterbe (ENTCO-062, ENTCO-075, ENTCO-151) lehetett csoportosítani, jelezve a monoklonalitást. Kísérleteink elején 2012-ben az ENTCO-062 pulzótípus volt az uralkodó, ám a következő években 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 pulzótípus volt gyakoribb.

MLST alapján a 14 *VREfm* izolátumot hat szekvencia típusba lehetett besorolni, melyek mindegyike a CC17-be tartozott. Közülük négy (ST17, ST117, ST78, ST203) képviseli a fő ampicillin-rezisztens kórházi eredetű klónt. Az ST412 és ST364 szekvencia típusokhoz tartozó *VREfm* izolátumokat a kutatócsoportunk írta le először a Közép-Európai régióban. Az ST364 kimutatása kivételesen jelentős. Először Zhu és mtsai. írták le Pekingben és tudomásunk szerint eddig csak egyetlen ilyen szekvencia típusú törzsről számoltak be Tajvanban. Az ST412 számos országban megtalálható, főleg az Egyesült Államokban és Nyugat-Európában, de a hivatalos adatbázisba mi küldtük be először Kelet-Európából. Érdekesség, hogy két, ST117 és *esp* negatív vér izolátum közül az egyik *VanA*, a másik *VanB* genotípusú volt. 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* gén megszerzése külön eseményként fordulhatott elő.

Mostanáig nem állt rendelkezésünkre információ a VRE székletben való hordozásáról annak ellenére, hogy a tünetmentesen kolonizáltak különböző nozokomiális fertőzések forrásaként szolgálhatnak. Kutatásom során 2016-ban két periódusban megvizsgáltuk a gastrointestinális VRE hordozás arányát; szilárd VRE Screent alkalmazva ez 2,2%-nak, míg folyékony dúsítót alkalmazva 5,8%-nak bizonyult.

Vizsgálatunk során 93 VRE hordozó epidemiológiai adatait elemeztük. 24,7%-uk esetében a rutin tenyésztés normál bélflóra hiányt mutatott ki. 18-nak volt *C. difficile* pozitív lelete a szűrés időpontjában vagy az azt megelőző 6 hónapban, de csak 12 részesült vancomycin kezelésben. 17 hordozó kapott vancomycint, de nem volt az anamnézisben *C. difficile* infekció (CDI). Statisztikai elemzéseink alapján megállapítottuk, hogy a CDI és VRE kolonizáció közötti kapcsolat statisztikailag szignifikáns volt ($p=0,0345$). A VRE pozitivitás esélye 2,55-szer nagyobb *C. difficile* pozitív betegekben. A vancomycin terápiában részesülő betegek esetén

megállapítottuk, hogy a VRE pozitívitas esélye 13,59-szer magasabb, mint ha nem adtak volna nekik vancomycint. Összegezve elmondhatjuk, hogy 5,39-nél nagyobb eséllyel válhat VRE hordozóvá valaki vancomycin kezelés után, mint a *C. difficile* fertőzés után.

Az irodalommal összhangban kutatócsoportunk is a leggyakoribb alapbetegségként a malignitást mutatta ki a VRE-t hordozók körében (22,6%). A hordozók 21,5%-ánál nem volt dokumentált alapbetegség a kórtörténetükben valamilyen jellegű fertőzésen kívül. A fertőzések illetve a hosszabb kórházi ápolás megnövekedett antibiotikum fogyasztást eredményez, a hordozók csupán 21,5%-a nem kapott antibiotikumot. A leggyakrabban alkalmazott szer a metronidazol volt (47,3%), ezt követték a cefalosporinok (40,9%) és a penicillinek (38,7%). A hordozók 31,2%-a kapott vancomycint, amely a karbapenemmel együtt a negyedik leggyakrabban alkalmazott gyógyszer volt.

Egy érdekes esetben egy betegnél *vanA E. hirae* kolonizációt tudtunk kimutatni, a szűrés előtt egy hónappal 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.

Az intestinális VRE izolátumok is érzékenyek voltak az újabb szerekkel szemben. 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.

A VRE kolonizáció gyakoriságát nehéz összevetni az irodalommal a betegpopuláció, a minta típusa, a különféle táptalajokat alkalmazó kimutatási módszerek és/vagy a glikopeptid-koncentrációk különbségei miatt. A rektális tenyésztésről korábban leírták, hogy nem azonosította a gastrointestinalis kolonizációk nagy részét, ezért vizsgálatainkhoz a tenyésztésre érkező széklet mintákat használtuk. Számos cikk írói azt tapasztalták, hogy a folyékony dúsítás javítja a kimutatás érzékenységét, ezt kívántuk mi is tesztelni. Azonban vizsgálatunk egyik korlátja, hogy két egymást követő időszakot szűrtünk a két különböző módszerrel, így a szilárd és a folyékony VRE szűrést direkt módon nem lehet elvégezni. Annak ellenére, hogy a szűrő tápfolyadékkal több VRE-t azonosítottunk, a szilárd screen alkalmazása kevésbé munka- és időigényes, így könnyebben megvalósítható a rutin diagnosztika során.

ÖSSZEFOGLALÁS

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. Szerencsére a legújabb antibiotikumokra 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 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 hasonlóknak 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 ellen kevésbé hatékony antibiotikumok használatának korlátozását, az alábbi rizikócsoportokba 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 *VREfm* fertőzések jelentős növekedése miatt kiemelt jelentősége van a megfelelő infekciókontrollnak, a fertőzött/kolonizált betegek elkülönítésének, és az antibiotikum terápia célzott és szakszerű alkalmazásának.



**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., Pásztai, 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: Tavaszi 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.



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, Pásztai 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.