

# **Klinikai *Bacteroides* izolátumok antibiotikum rezisztenciájának fenotípus és genotípus vizsgálata**

Doktori értekezés tézisei

**Eitel Zsuzsa M.Sc.**

Témavezető:  
Prof. Dr. Nagy Erzsébet



Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar  
Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet  
Interdiszciplináris Doktori Iskola

2016  
Szeged

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>1. BEVEZETÉS</b> .....	3
1.1. A <i>Bacteroides</i> genus.....	3
1.2. A bacteroidesek antibiotikum rezisztencia mechanizmusai .....	4
1.3. Antibiotikum érzékenység meghatározása anaerob baktériumok esetében .....	5
<b>2. CÉLKITŰZÉSEK</b> .....	6
<b>3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b> .....	7
3.1. Baktérium törzsek és tenyésztésük.....	7
3.2. A korong diffúziós módszer kiértékelése antibiotikum rezisztencia meghatározására <i>Bacteroides</i> törzseknél .....	7
3.3. Antibiotikum rezisztenciáért és enterotoxin termelésért felelős gének kimutatása Real-Time PCR (RT-PCR) módszerrel .....	8
3.4. <i>Bft</i> allélok meghatározása PCR-RFLP módszerrel .....	9
3.5. IS elemek vizsgálata .....	9
3.6. Plazmidok vizsgálata.....	9
3.7. Statisztikai kiértékelés .....	10
<b>4. EREDMÉNYEK</b> .....	10
4.1. Korong diffúziós módszer alkalmazása <i>Bacteroides</i> fajok antibiotikum érzékenységének megállapítására .....	10
4.2. A <i>cfiA</i> és <i>nim</i> gének előfordulási gyakoriságának meghatározása nagy számú európai klinikai mintából származó <i>Bacteroides</i> izolátumban .....	12
4.3. A <i>bft</i> gén előfordulási gyakoriságának megállapítása, valamint a <i>bft</i>	

allélok meghatározása nagyszámú európai klinikai mintából származó <i>Bacteroides</i> izolátumban .....	13
4.4. További antibiotikum rezisztencia gének előfordulási gyakoriságának vizsgálata az izolátumok egy szűkebb csoportjában .	14
4.4.1. A <i>cepA</i> , <i>cfxA</i> és <i>cfiA</i> gének előfordulása és az ampicillin, cefoxitin és imipenem rezisztencia közötti összefüggés vizsgálata a <i>B. fragilis</i> és nem-fragilis <i>Bacteroides</i> (NFB) törzsek között.....	14
4.4.2. A <i>ermB</i> , <i>ermF</i> , <i>ermG</i> , <i>linA</i> , <i>mefA</i> és <i>msrSA</i> gének előfordulása és a clindamycin rezisztencia közötti összefüggés vizsgálata a <i>B. fragilis</i> és NFB törzsek között .....	14
4.4.3. A <i>tetM</i> , <i>tetQ</i> , <i>tetX</i> , <i>tetX1</i> és <i>tet36</i> gének előfordulása és a tige cycline rezisztencia közötti összefüggés vizsgálata a <i>B. fragilis</i> és NFB törzsek között .....	15
4.4.4. A <i>bexA</i> gén előfordulása és a moxifloxacin rezisztencia közötti összefüggés vizsgálata a <i>B. fragilis</i> és NFB törzsek között.....	15
4.5. Romániában izolált <i>B. fragilis</i> csoportba tartozó izolátumok antibiotikum érzékenysége és a releváns rezisztencia gének kimutatása.....	15
<b>5. ÖSSZEFOGLALÁS</b> .....	16
<b>6. HIVATKOZÁSOK</b> .....	18
<b>PUBLIKÁCIÓS LISTA</b> .....	21
<b>KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS</b> .....	22
<b>TÁRSSZERZŐI NYILATKOZATOK</b> .....	23

## 1. BEVEZETÉS

### 1.1. A *Bacteroides* genus

A *Bacteroides* fajok a legjelentősebb humán anaerob patogének izolálási gyakoriságukat tekintve, és egyszersmind a normál humán bélflóra legabundánsabb ( $10^{11}$  sejt/g széklet) és ott hasznos aktivitást kifejtő fajai. Nem mozgó, spórákat nem képző, epetűró, Gram-negatív, pálcá alakú baktériumok. Az emberi szervezet már nagyon korai szakaszban találkozik velük, hüvelyi szüléskor az újszülött az anyától kapja meg ezeket a baktériumokat [Simon and Gorbach, 1984; Reid, 2004]. Kutatások bizonyították, a bacteroidesek számos hasznos tulajdonsággal rendelkeznek a humán szervezet számára: szerepük van a szénhidrát fermentációban, a rövid szénláncú zsírsavak előállításában (más mikroorganizmusokkal együttműködve), így hozzájárulnak a gazdaszervezet napi energia és tápanyag szükségletének biztosításához [Xu and Gordon, 2003]. Legújabb metagenomikai kutatások szerint csökkent jelenlétük különböző hátrányos élettani folyamatokat eredményezhet, mint például elhízás vagy akár gyulladásoz folyamatok megjelenése [Wu *et al.*, 2004; Ley *et al.*, 2005; 2006] a gazdaszervezetben.

Normál élettani körülmények között a humán bélflóra tagjai, azonban opportunistá patogén mikroorganizmusok. Egészséges egyének ritkán fertőződnék; a fertőzés oka általában egy már létező alapbetegség, vagy valamilyen intraabdominális sebészeti eljárás során kikerülhetnek a gastrointestinalis traktusból és opportunistá patogénként komoly mellkasi, agyi, viscerális szerveket érintő fertőzéseket okozhatnak.

Habár, mindössze a 0,5%-át képviselik a székletben előforduló baktérium populációnak, a *B. fragilis* csoport törzsei a leggyakrabban izolált fajok anaerob fertőzésekben. Gyakorlatilag az emberi test bármely fertőzött részéből izolálhatók *Bacteroides* fajok [Finegold, 1995]. Okozhatnak súlyos hasüregi fertőzéseket, műtét utáni fertőzéseket, bőr és lágyszövet fertőzéseket (akár más anaerob vagy aerob mikroorganizmusokkal együtt), illetve bacteraemia kórokozói is lehetnek.

A *Bacteroides fragilis* a legvirulensebb *Bacteroides* fajnak tekinthető. A leggyakrabban izolált intestinalis kórokozó; és a *Bacteroides* genus tagjai által okozott fertőzések mintegy 80 %-áért felelős. A *B. fragilis* számos anaerob infekcióban

megtalálható, a halálozási arány az általa okozott bacteraemiák esetében közel 19%. Megfelelő kezelés nélkül ez az arány eléri a 60%-ot [Goldstein, 1996].

1898-ban Veillon és Zuber volt az első, aki leírta *B. fragilis*-t, mint *Bacillus fragilis* [Veillon és Zuber, 1898]. Az azóta eltelt időben a *Bacteroides* csoport több taxonómiai változáson esett át. Jelenleg több mint 20 *Bacteroides* és 5 *Parabacteroides* fajt ismerünk [Wexler, 2007].

## 1.2. A bacteroidesek antibiotikum rezisztencia mechanizmusai

A *Bacteroides* törzsek körében előforduló antibiotikum rezisztencia 3 fő csoportba sorolható:

- 1) valódi, eredendő rezisztencia (aminoglycosidok, első és második generációs quinolonok, első és második generációs cephalosporinok)
- 2) megnövekedett rezisztencia ( $\beta$ -laktám antibiotikumok, mint például penicillin, ampicillin, illetve erythromycin, tetracycline, clindamycin)
- 3) kis mértékű rezisztencia (terápiában javasolt antibiotikumok) ( $\beta$ -laktám/  $\beta$ -laktamáz gátló kombinációk, carbapenemek, metronidazol, egyes harmadik és negyedik generációs quinolonok)

A különböző antibiotikum családokra nézve a bacteroidesek eltérő mértékű rezisztenciával rendelkeznek. A bacteroidesek körébe tartozó törzseknel az aminoglycosidokkal és a fluoroquinolokkal szemben eredendő rezisztencia figyelhető meg, hasonlóképpen az első és második generációs quinolonokhoz (tulajdonképpen a 3. és 4. generációs quinolonok az anaerob infekciókat okozó kórokozók ellen lettek kifejlesztve; a rezisztencia velük szemben az elmúlt néhány évben kezdett megjelenni) [Sutter and Finegold, 1976; Rasmussen *et al.*, 1993].

Bizonyos antibiotikumok esetében (ilyenek például a  $\beta$ -laktám antibiotikumok közül a penicillin és ampicillin, illetve az erythromycin, tetracycline és clindamycin is) a törzsek érzékenysége folyamatosan csökken, emiatt ezek a szerek terápiásan csak az izolátum előzőleg elvégzett antibiotikum érzékenységi profilja alapján javasolhatók [Rasmussen *et al.*, 1993; Nagy *et al.*, 2011].

A carbapenemek (imipenem, meropenem),  $\beta$ -laktám/  $\beta$ -laktamáz gátló kombinációk (amoxicillin/klavulánsav, piperacillin/tazobaktám), az újabb fluoroquinolonok (moxifloxacin, trovafloxacin, gemifloxacin) és a metronidazol azok a szerek, amelyek manapság is többségében biztonsággal alkalmazhatók a *B. fragilis* csoportba tartozó törzsek hatásos kezelésében [Wadsworth-KTL 6<sup>th</sup> edition, 2002; Löfmark *et al.*, 2010; Nagy *et al.*, 2011].

Az egyes baktérium törzsek rezisztencia értékei az adott törzs földrajzi elhelyezkedésének függvényében variálnak [Nagy *et al.*, 2011]. A jelenleg igen magas rezisztenciaértékek kialakulása az antibiotikumok széleskörű, és nem minden esetben indokolt használatára vezethető vissza [Rasmussen *et al.*, 1993; Edwards, 1997; Wexler, 2007]. Ezen felül, napjainkban egyre több helyen jelennek meg multi-rezisztens *Bacteroides* klinikai izolátumokról szóló beszámolók [Rotimi *et al.*, 1999; Wareham *et al.*, 2005; Hartmeyer *et al.*, 2012].

### 1.3. Antibiotikum érzékenység meghatározása anaerob baktériumok esetében

Az anaerob infekciókat kezelése általában empirikus módon, a közétett felmérések adatai alapján történik. Az indikációk az antibiotikum érzékenységi vizsgálat elvégzésére a következők: 1) néhány, a test specifikus helyén felbukkanó fertőzés, melyeknél megfontolandó az érzékenységi vizsgálat elvégzése (endocarditis, osteomyelitis, központi idegrendszer érintő fertőzés, makacs vagy visszatérő bacteraemia, csont fertőzés, protézis fertőzése, illetve steril testtájról izolált organizmus); 2) infekciók, melyek nem javulnak az empirikus terápia hatására vagy infekciók, melyek hosszú kezelési időt vesznek igénybe; 3) antibiotikum érzékenységi mintázatok meghatározása adott kórházban vagy egy bizonyos földrajzi területen, válogatott anaerob baktériumok egy csoportján keresztül végzett vizsgálatok által; 4) újonnan fejlesztett antibiotikumok hatékonyságának kiértékelése érdekében [Wadsworth-KTL, 2002].

A klinikai izolátumok antibiotikum rezisztencia mintázatai fontos befolyással bírhatnak a klinikai kimenetel szempontjából.

Napjainkban a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) célul tűzte ki, hogy kialakítson egy rendszert, mely alkalmassá teszi a korong diffúziós módszert az anaerob baktériumok antimikrobiális érzékenységi vizsgálatainak

használatára és a rezisztens anaerob törzsek elkülönítésére [<http://www.eucast.org/>].

A metronidazollal és vancomycinnel szemben folyamatosan csökkenő érzékenységgel fontos patogén, a *Clostridium difficile* miatt is egyre sürgetőbbé válik egy gyors és egyszerű érzékenységi vizsgálat kidolgozása. Az EUCAST módszerei alapján, a korong diffúziós módszer kidolgozását *C. difficile* antibiotikum érzékenységének meghatározására Erikstrup és munkatársai kezdték meg 2012-ben [Erikstrup *et al.*, 2012]. Kiváló korrelációt találtak a gátlási zóna átmérők (korong diffúziós módszer) és a MIC értékek (E-teszt) között. Korong diffúziós módszer segítségével lehetőségük nyílt a vad típusú (érzékeny), a rezisztens és a csökkent érzékenységgel *C. difficile* törzsek egymástól történő elkülönítésére metronidazol és vancomycin esetében. Ezen túl azonban szükség van további vizsgálatok elvégzésére a módszer alkalmazásának kiterjesztése érdekében a relatíve gyorsan növő anaerobok esetében is.

## 2. CÉLKITŰZÉSEK

- Kiértékelni az EUCAST korong diffúziós módszert nagyszámú *Bacteroides* izolátumon végzett, különböző, anaerob infekciók kezelésében használt antibiotikumok segítségével a korong diffúziós módszerrel kapott gátlási zóna átmérők, illetve E-teszttel vagy agar hígítással kapott MIC értékek összevetésével.
- Meghatározni a klinikailag igen fontos jelentőséggel bíró *cfiA* és *nim* gének gyakoriságát egy 640 izolátumból álló, 11 különböző európai országból származó törzsgyűjtemény tagjai között, a legnagyobb lehetséges mértékben. Ezen felül az enterotoxin termelésért felelős *bft* gén kimutatása a vizsgált mintákban, valamint a detektált *bft* gének tipizálása. Emellett a *bft* és *cfiA* gének együttes előfordulásának kimutatása.
- A korábban vizsgált 640 izolátum egy 161 törzset magába foglaló részhalmozásban vizsgálni további klinikailag fontos antibiotikum rezisztencia gének előfordulását.
- Tanulmányozni a kimutatott rezisztencia gének, és az általuk kiváltott

antibiotikum rezisztencia közötti kapcsolatot, mind a *B. fragilis* mind pedig a non-fragilis *Bacteroides* (NFB) törzsek között.

- Vizsgálni egy Romániából származó (mely ország nem vett részt a legutóbbi nagy európai antibiotikum érzékenységi felmérésben), *B. fragilis* csoport tagjait magában foglaló törzsgyűjtemény tagjai körében az antibiotikum rezisztencia szinteket és a rezisztencia gének előfordulását.

### 3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 3.1. Baktérium törzsek és tenyésztésük

A disszertációban leírt 640, *Bacteroides* és *Parabacteroides* nemzetségbe tartozó izolátum, egy nagy, 13 országot magába foglaló, antibiotikum rezisztencia felméréshez használt törzsgyűjtemény tagjai közül került kiválasztásra [Nagy *et al.*, 2011]. A törzsek a felhasználásukig -80 °C-on, a Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézetben, Szegeden voltak tárolva. Emellett vizsgáltunk 53 *B. fragilis* csoportba tartozó klinikai izolátumot (36 *B. fragilis*, 7 *B. thetaiotaomicron*, 7 *B. ovatus* és 3 *B. vulgatus*), melyeket a 2010 és 2013 közötti időszakban izolált a romániai Targu-Mures Megyei Kórház Sürgősségi Osztálya. Románia nem vett részt a fent említett európai antibiotikum érzékenységi felmérésben.

Az összes izolátum 15% glicerinnel kiegészített BHI (Brain Heart Infusion) tápfolyadékban 80°C-on került tárolásra. A vizsgálatainkra való tenyésztésük haeminnel (0.005 g/l) és K1-vitaminnal (0.01 g/l) kiegészített Brucella véres agaron (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) történt anaerob körülmények között, tenyésztő kamrában (Concept 400; Ruskin Technology Ltd., Bridgend, UK), 37 °C-on.

#### 3.2. A korong diffúziós módszer kiértékelése antibiotikum rezisztencia meghatározására *Bacteroides* törzseknél

A korong diffúziós vizsgálatban felhasznált törzsek 24 órás tenyészetéből 1 McFarland sűrűségű oldatot készítettünk fiziológiás sóoldatban. Kilenc antibiotikum esetében vizsgáltuk a MIC értékek és a korong diffúziós vizsgálatokkal kapott gátlási



zóna átmérők összehasonlíthatóságát. A korong diffúziós tesztekhez haeminnel (0.005 g/l) és K1-vitaminnal (0.01 g/l) kiegészített *Brucella* véres agaron (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) végeztük el, anaerob körülmények között, 37 °C-on. Az antibiotikum korongok a következők voltak: az amoxicillin/klavulánsav (20/10 g/korong), piperacillin/tazobaktám (30/6 g/ korong), cefoxitin (30 g/korong) imipenem/cilasztatin (10 g/korong), meropenem (10 g/korong), clindamycin (10 g/korong), tigecyclin (15 g/korong), metronidazol (5 g/korong), moxifloxacin (5 g/korong). A korongok a BioRad (Marnes-la-Coquette, Franciaország) cégtől származtak, kivéve a metronidazolt és a clindamycint, amelyeket az Oxoid (Basingstoke, Egyesült Királyság) cégtől vásároltuk.

### 3.3. Antibiotikum rezisztenciáért és enterotoxin termelésért felelős gének kimutatása Real-Time PCR (RT-PCR) módszerrel

Az agar lemezen 24 óráig anaerob körülmények között inkubált törzsekből 1 telepnyi bakteriális sejtet szuszpendáltunk 100 µl desztillált vízbe, 1,5 ml-es Eppendorf-csővekbe, majd inkubáltuk 100 °C-on 10 percig. A centrifugált (2 perc, 14000 rpm) szuszpenzió felülúszóját használtuk templát DNS-ként. Amennyiben nem azonnal történt meg a felhasználás, a csöveket -20 °C-on tároltuk. A felhasznált primerek szekvenciáit a Primer3 programmal (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) terveztük, vagy irodalmilag leírtak voltak. Mindegyik reakcióelegy tartalmazott 5 µl 2x PCR "Mastermix"-et (iQ, Bio-Rad vagy Brilliant II, Stratagene), 0,7 µM-t (35 pmol) az egyes primerekből, 1 µl templát DNS-t, 0,5 µl EvaGreen (Biotium) DNS-kötő fluoreszcens festéket (az iQ "Mastermix"-hez) steril vízben 10 µl végső térfogatra kiegészítve műanyag PCR-lemezen. A RT-PCR vizsgálatokat a MxPro3000 (Stratagene, USA) vagy StepOne (Life-Technologies) Real-Time PCR eszközökkel végeztük. Az amplifikációs és az olvadási görbéket („melting curve”) a SYBRGreen és EVAGreen fluoreszcens festékeknek megfelelő, 415 nm-es hullámhosszon vizsgáltuk. Az amplifikációs ciklusok 10 (iQ) ill. 5 (Brilliant II) perces kezdeti denaturációt tartalmaztak a „mastermix”-ektől függően. A pozitív reakciók azonosítása az amplifikációs ciklus kezdete alapján, illetve az olvadási görbe helyes olvadási hőmérséklete alapján történt. Néhány esetben az eredményeket 1.2%-os agaróz gélelektroforézissel is megerősítettük. Nukleotid szekvenálást a *tetX1* (*B. fragilis* BM13)

és *linA* (*B. fragilis* TR23) gének esetében végeztünk a korábban leírtak szerint [Brisson-Noel és Courvalin, 1986; Whittle *et al.*, 2001], majd összehasonlítottuk a referencia szekvenciákkal (*linAn2* AF251288 és *tetX1* AJ311171) BLAST analízissel (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 3.4. *bft* allélok meghatározása PCR-RFLP módszerrel

A *bft* gének alléljainak tipizálását PCR-RFLP módszerrel végeztük. A BTT1 (CATGTTCTAATGAAGCTGATTC) és BTT2 (ATCGCCATCTGCTGTTTCCC) primerek segítségével a teljes *bft* géneket amplifikáltuk normál PCR segítségével (95 °C 10 perc 1x; 95 °C 30 másodperc, 62 °C 1 perc, 72 °C 1 percig, 35x). A PCR-termékeket, agaróz-gélelektroforézis után, HighPure PCR Cleanup Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) segítségével tisztítottuk, majd a tiszta termékeket Mbol restriktációs enzimmal emésztettük. Ezután agaróz gélelektroforézist, 1,5 %-os gélkoncentrációkat alkalmazva TBE pufferben és 0,5 µg/ml ethidium bromid és 5 V/cm feszültség gradiens mellett, végeztük, majd UV fényvel tettük láthatóvá a kapott eredményt.

#### 3.5. IS elemek vizsgálata

A PCR templátok és a reakció körülményei, valamint az IS elemekkel kapcsolódó rezisztencia gének kimutatásának módszere megegyezett a már korábban Sóki és munkatársai által 2004-ben és 2006-ban leírtakkal [Sóki *et al.*, 2004; 2006]. A PCR-termékeket, és a teljes DNS-mintákat elektroforetizáltuk 0,7-1,5%-os agaróz gélen TAE (40 mM Tris-acetát és 1 mM EDTA) vagy TBE (45 mM Tris-borát és 1 mM EDTA) puffer használatával, 0,5 µg/ml etidium-bromiddal. A DNS-t láthatóvá tételéhez UV fényt használtunk, majd a kapott eredményeket elektronikusan tároltuk.

#### 3.6. Plazmidok vizsgálata

Az anaerob körülmények között tenyésztett bakteriális sejt massa feldolgozása a Qiagen Plasmid Mini Preparation Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével történt. A plazmid mintákat (200-300 ng) elektroforetizáltuk 0,7%-os agaróz gélen, 0,5

µg/ml etidium-bromiddal, TAE vagy TBE pufferben 5 V/cm feszültség gradiens mellett.

### 3.7. Statisztikai kiértékelés

A különböző gének előfordulási gyakoriságát a törzsek különböző csoportjai között chi-négyzet próbával, vagy Fisher egzakt tesztet alkalmazva teszteltük a Sigmaplot 12.0 statisztikai szoftverrel (Systat Software, Inc.). A rögzített szignifikancia küszöb (p) 0.5 volt.

## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. Korong diffúziós módszer alkalmazása *Bacteroides* fajok antibiotikum érzékenységének megállapítására

A korong diffúziós vizsgálatokba 381 *B. fragilis* csoportba tartozó klinikai izolátumot teszteltünk. Referencia törzsként a *B. fragilis* ATCC 25285 és *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741 használtuk, a CLSI ajánlásának megfelelően. Az antibiotikum érzékenységek meghatározása agar hígításos módszerrel történt.

Az imipenem esetében 4 rezisztens törzset találtunk (MIC >8 µg/ml) és 2 izolátum mutatott csökkent érzékenységet imipenemmel szemben (MIC 4-8 µg/ml). Minden MIC értékhez tartozó gátlási zóna átmérője 0 és 13 mm közé esett, 90% pedig 8 mm-en belül volt. A rezisztens izolátumokat élesen el tudtuk különíteni az érzékenyeketől: a rezisztens törzsek gátlási zónájának átmérője ≤ 20 mm-nek adódott, míg az érzékeny izolátumoknál ≥ 29 mm volt.

Metronidazol esetében mindössze 2 rezisztens törzset találtunk (az EUCAST rezisztencia „breakpoint”-jait alkalmazva), 8 µg/ml-es MIC értékekkel. Egy kivételével az összes érzékeny törzs gátlási zónája nagyobb vagy egyenlő volt mint 24 mm. Az egyes MIC értékekhez tartozó gátlási zónák átmérői 0 és 14 mm között váltakoztak; és 90%-uk esetében az értékek 6 mm-en belül maradtak.

Amoxicillin/klavulánsavval szemben rezisztens izolátum, a MIC adatok szerint, nem volt a vizsgált törzsek között. Azonos MIC értékekkel rendelkező törzsek gátlási zónái között nagy szórás tapasztaltunk (8-14 mm), ugyanakkor a csökkent érzékenységű törzsek (MIC 88 µg/ml) gátlási zónái 22 vagy ennél kevesebb mm-nek adódtak, mely egy

kis átfedést mutatott az amoxicillin/klavulánsavra érzékeny izolátumokkal.

Három piperacillin/tazobactamra rezisztens törzs volt a vizsgált csoportban, melyek gátlási zónái ( $\leq 16$  mm) élesen elkülönültek a csökkent érzékenyséű és érzékeny törzsektől. Ugyanakkor a csökkent érzékenyséű, illetve az érzékeny populáció gátlási zónáinak mérete között találtunk átfedést. Emiatt, a két csoport pontos elkülönítése érdekében, javasolt a 24 mm vagy ennél kisebb, illetve a 16 mm-nél nagyobb gátlási zónával rendelkező törzsek érzékenységének vizsgálatát E-teszttel megerősíteni. Az egyes MIC értékekhez tartozó gátlási zónák átmérői 0 és 17 mm között váltakoztak.

A törzsek clindamycin érzékenységének vizsgálatára 2  $\mu\text{g}$  antibiotikum tartalmú korongok helyett 10  $\mu\text{g}$ -os korongokat használtunk, mivel előzetes vizsgálatok alapján azt tapasztaltuk, hogy így teljesen el tudjuk különíteni a rezisztens populációt (gátlási zónák átmérői  $\leq 13$  mm). Az érzékeny törzsek gátlási zónáinak átmérői igen szélső értékek között mozogtak (14 és 42 mm), ugyanakkor általánosságban elmondható, hogy a különösen érzékeny törzsek (MIC  $\leq 0.125$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) jóval nagyobb zónaátmérővel rendelkeztek mint a kevésbé érzékeny izolátumok. Az egyes MIC értékekhez tartozó gátlási zónák átmérői 0 és 23 mm között váltakoztak.

Cefoxitin esetében csak CLSI által meghatározott érzékenységi szintek állnak rendelkezésre. Ennek alapján az érzékeny törzsek gátlási zónáinak átmérői 18 és 36 mm közé estek, a csökkent érzékenyséű törzsek (MIC 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) esetében pedig 18 és 27 mm közé, azonban ennek a csoportnak a zóna átmérői átfedést mutattak az érzékeny törzsekkel (MIC  $\leq 16$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Ugyanakkor a rezisztens populáció (MIC  $> 32$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) jól elkülönült az érzékeny izolátumoktól (gátlási zóna átmérők  $\leq 15$  mm). Az egyes MIC értékekhez tartozó gátlási zónák átmérői 0 és 15 mm között váltakoztak.

A cefoxitinhez hasonlóan, moxifloxacin esetében is csak CLSI által meghatározott érzékenységi szintek állnak rendelkezésre. Az összes általunk vizsgált moxifloxacinra érzékeny törzs gátlási zónájának átmérője megegyezett vagy nagyobb volt mint 19 mm. A kevés csökkent érzékenyséű törzs gátlási zónája 11 és 18 mm közé esett. Minden rezisztens izolátum (MIC  $> 4$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gátlási zónájának átmérőjét 11 mm-nél kisebbnek találtuk. Az egyes MIC értékekhez tartozó gátlási zónák átmérői 0 és 11 mm között váltakoztak, 95%-uk 6 mm belül volt.

Sem a CLSI, sem pedig az EUCAST nem állapított meg ez idáig rezisztencia

„breakpoint”-okat tigecyclinre vonatkozóan, emiatt ebben az esetben a rendelkezésünkre álló MIC értékeket hasonlítottuk össze a mért gátlási zóna átmérőjével. Az általunk vizsgált törzsek közül mindössze 3 esetben feltételezhetjük, hogy teljesen rezisztens lehet tigecyclinre: MIC  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$  és nem rendelkeztek mérhető gátlási zónával. A  $\leq 4$   $\mu\text{g/ml}$ -es MIC-val rendelkező populáció tagjai jól elkülönültek a többi izolátumtól a legalább 20 mm-es gátlási zónájukkal. Az egyes MIC értékekhez tartozó gátlási zónák átmérői 0 és 11 mm között váltakoztak, 90%-uk 6 mm belül volt.

Meropenem esetében nem rendelkezünk MIC értékekkel az előzőekben elvégzett európai antibiotikum érzékenységi felmérés által. A törzsek többségénél a gátlási zóna átmérőjét legalább 28 mm-nek találtuk, ezáltal néhány izolátumot el tudunk különíteni, melyek csökkent érzékenységgűnek, illetve rezisztensnek tekinthetők carbapenemekkel szemben. Ha összehasonlítjuk a gátlási zónák átmérőjét imipenem és meropenem esetében látható, hogy több izolátum nem tartozik a vad típusú csoportba (tehát nem teljes mértékben érzékeny), mely detektálható meropenem korongok segítségével.

Ezen eredmények alapján javasolunk, az általunk vizsgált antibiotikumok esetében (a cefoxitin kivételével) , kísérleti jelleggel, gátlási zóna átmérőkön alapuló lehetséges „breakpoint”-okat az antibiotikumra érzékeny *B. fragilis* csoportba tartozó izolátumok elkülönítésére.

#### 4.2. A *cfiA* és *nim* gének előfordulási gyakoriságának meghatározása nagyszámú európai klinikai mintából származó *Bacteroides* izolátumban

A vizsgált 640 *B. fragilis* csoportba tartozó izolátum közül 43 (6.7%) hordozta a *cfiA* gént és három izolátumban (0.5%) mutattuk ki a *nim* gént. Mivel mind a 43 *cfiA*-pozitív törzs *B. fragilis* volt, így a vizsgált 486 *B. fragilis* törzs 8.8%-áról mondható el, hogy hordozza ezt a carbapenemek elleni rezisztenciát okozó gént. Ugyanakkor a 43 *cfiA*-pozitív törzs közül 33 imipenemre érzékenynek mutatkozott (MIC  $< 4$   $\mu\text{g/ml}$ ), ami megmutatja, hogy a *B. fragilis* klinikai izolátumok jóval nagyobb részében van jelen a rezisztencia gén, mint ahány törzsben ténylegesen megjelenik a carbapenem rezisztencia.

A vizsgált 640 *Bacteroides* törzs közül 22 izolátum rendelkezett imipenemre csökkent érzékenységgel (MICs  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$ ) és ezek közül 7 törzs tekinthető rezisztensnek (MIC  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ ). A 22 törzs közül 10 hordozta a *cfiA* gént. 10 izolátum közül, melyeknek

az imipenem MIC értéke emelkedett volt (4–8 µg/ml), 4 (40.0%) volt *cfiA*-pozitív, míg a 7 imipenem rezisztens törzs közül 6 (85.7%) *B. fragilis* hordozta a *cfiA* gént. A NFB törzsek mindegyike érzékeny volt imipenemre. A *cfiA*-pozitív és imipenem-rezisztens (MIC  $\geq$ 16 µg/ml) törzsek közül 4 izolátumban találtuk meg az aktiváló IS elemet beépülve a rezisztencia gén upstream régiójába. A másik két izolátum, amely hasonló tulajdonságokkal rendelkezett, nem hordozta az aktiváló IS elemet, emiatt az imipenem E-teszttel végzett vizsgálatok során heterogén rezisztencia fenotípust mutatott.

A vizsgált 640 *B. fragilis* csoportba tartozó izolátum közül 21 rendelkezett csökkent érzékenységgel metronidazolra (MIC  $\geq$  4 µg/ml) és csupán 3 (*B. fragilis* IT724 and IT797 and *B. thetaiotaomicron* HU66) hordozott *nim* gént a következő metronidazol MIC értékekkel: 0.125 µg/ml (*B. fragilis* IT797), 1 µg/ml (*B. fragilis* IT724) and 256 µg/ml (*B. thetaiotaomicron* HU66). A *nim* gének tipizálására irányuló vizsgálataink során azt találtuk, hogy a *B. fragilis* IT797 és IT724 kromozómális *nimA* és *nimC* géneket hordozott. Továbbá, a *B. fragilis* IT797-ben kimutattunk egy IS1168 és egy IS1170 elemet, azonban a PCR mapping vizsgálatok azt mutatták, hogy ezek az inszerciós szekvenciák nem a *nimA* gén előtt helyezkednek el. A metronidazol-rezisztens és egyidejűleg *nim*-negatív izolátumok esetében más rezisztencia mechanizmusok sejthetők a háttérben.

4.3 A *bft* gén előfordulási gyakoriságának megállapítása, valamint a *bft* allélok meghatározása nagyszámú európai klinikai mintából származó *Bacteroides* izolátumban

A vizsgált 640 *Bacteroides* törzs közül 68 (10.6%) hordozta a *bft* gént. Az összes *bft*-pozitív törzs *B. fragilis* volt. A PCR RFLP módszerrel vizsgált *bft* allélok megoszlása a következő volt: 51 (75.0%) izolátum hordozta a *bft1* allélt, 15 (22.1%) izolátumban találtuk meg a *bft2* allélt és 2 (2.9%) törzs hordozta a *bft3* allélt. A vérmintákból származó izolátumok *bft* (9.2%) illetve *bft1-3* allélok (7.3%) tekintetében nem mutattak szignifikánsan emelkedett előfordulást, ugyanakkor a vérmintákból származó izolátum száma igen alacsony volt (n=5), ami magyarázhatja a nem szignifikáns eredményeket.

4.4. További antibiotikum rezisztencia gének előfordulási gyakoriságának vizsgálata az

izolátumok egy szűkebb csoportjában

Kutatásaink során részletesebb molekuláris vizsgálatokat végeztünk, hogy további információt nyerjünk az előzőekben leírt törzsek további antibiotikum rezisztencia géneinek előfordulása, illetve eloszlása tekintetében. A *cfiA* és *nim* gének előfordulására már vizsgált 640 törzs közül választottunk ki 128 *B. fragilist* és 33 NFB, összesen 161 törzset, hogy a következő rezisztencia gének előfordulását vizsgáljuk: *cepA*, *cfxA*, *ermB*, *ermF*, *ermG*, *linA*, *mefA*, *msrSA*, *tetM*, *tetQ*, *tetX*, *tetX1*, *tet36* és *bexA*. A leggyakrabban megtalálható gének a következők voltak: *tetQ* (80.1%), *cepA* (70.2%), *ermF* (24.2%) és *linA* (21.7%). Nem találtunk szignifikáns eltérést a vizsgált országok tekintetében. Nem volt egy pozitív *nim*, *tetM* vagy *tet36* izolátum sem a vizsgált 161 törzs között. *CfiA*, *ermB*, *ermG*, illetve *msrSA* géneket csak *B. fragilis* törzsek között találtunk, emellett nem volt szignifikáns különbség a gének előfordulásában a *B. fragilis* és a NFB törzsek között.

4.4.1. A *cepA*, *cfxA* és a *cfiA* gének előfordulása és az ampicillin, cefoxitin és imipenem rezisztencia közötti összefüggés vizsgálata a *B. fragilis* és NFB törzsek között

Az összes általunk vizsgált *B. fragilis* törzs (128) rezisztensnek mutatkozott ampicillinre (MIC  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$ ) és 78.9% (101 izolátum) hordozta a *cepA* gént. A 33 NFB törzs minden tagja szintén rezisztens volt ampicillinre, azonban mindössze 36.4% (12 izolátum) volt *cepA*-pozitív. A *cepA* gén eloszlása így szignifikáns eltérést mutatott a *B. fragilis* és a NFB törzsek között ( $p < 0.001$ ).

A 11 cefoxitin-rezisztens *B. fragilis* törzs közül 3 izolátumban (27.3%) mutattuk ki a *cfxA* gént, ugyanez az arány a NFB törzsek esetében mindössze 1 (11.1%) izolátum. Érdekes módon, a magasabb cefoxitin MIC (64  $\mu\text{g/ml}$ ) értékekkel rendelkező törzsek esetében gyakran hiányzott a *cfxA* gén.

4.4.2. Az *ermB*, *ermF*, *ermG*, *linA*, *mefA* és *msrSA* gének előfordulása és a clindamycin rezisztencia közötti összefüggés vizsgálata a *B. fragilis* és NFB törzsek között

A vizsgált 161 *Bacteroides* törzs közül 40 törzs (24.8%) volt rezisztens (MIC  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$ ) clindamycinre: 31 (24.2%) *B. fragilis* és 9 (27.3%) NFB izolátum. Az *ermF*, *linA*, *mefA*, *ermG*, *msrSA* és *ermB* rezisztencia gének előfordulása a következő volt: 39

(24.2%), 35 (21.7%), 20 (12.4%), 9 (5.6%), 9 (5.6%) és 1 (0.6%) izolátum. Ezeknek a géneknek az előfordulása a clindamycin-rezisztens populációban jóval magasabbnak adódott: 30 (75.0%), 14 (35.0%), 11 (27.5%), 9 (22.5%), 9 (22.5%) és 1 (2.5%). A leggyakoribb előfordulását az *ermF* génnek találtuk, különös tekintettel a clindamycin-rezisztens populációban: a 31 clindamycin-rezisztens *B. fragilis* törzs 74.2%-a (23 izolátum) volt *ermF*-pozitív, ugyanez az előfordulási gyakoriság a clindamycin-rezisztens NFB törzsek (9 izolátum) körében 77.8% (7 izolátum). Érdekes megfigyelés, hogy az *msrSA*- és *ermG*-pozitív törzsek, ezekkel a génekkel egyidejűleg, legalább egy másik clindamycin rezisztenciáért felelős gént is hordoztak.

4.4.3. A *tetM*, *tetQ*, *tetX*, *tetX1* és *tet36* gének előfordulása és a tigeicyclin rezisztencia közötti összefüggés vizsgálata a *B. fragilis* és NFB törzsek között

Vizsgálataink során a *tetQ*, *tetX* és *tetX1* gének előfordulási gyakorisága a következő volt: 129 (80.1%), 16 (9.9%) és 8 (5.0%) izolátum. *TetM*- vagy *tet36*-pozitív törzset nem találtunk a vizsgált 161 *Bacteroides* törzs között. Csupán 3 *B. fragilis* törzs (1.9%) volt tigeicyclin-rezisztens (MIC 16 µg/ml) és mindhárom törzs hordozta a *tetQ* gént.

4.4.4. A *bexA* gén előfordulása és a moxifloxacin rezisztencia közötti összefüggés vizsgálata a *B. fragilis* és NFB törzsek között

A moxifloxacin rezisztenciáért felelős *bexA* gén az általunk vizsgált 161 *Bacteroides* törzs közül 12 izolátumban (7.5%) volt jelen: 6 *B. fragilis* (4.7%) és 6 (18.2%) NFB törzsből ( $p=0.024$ ). A 18 moxifloxacin-rezisztens *B. fragilis* izolátum mindegyike *bexA*-negatív volt, emellett a 6 moxifloxacin-rezisztens NFB közül 1 törzs (16.7%) hordozta a *bexA* gént.

4.5. Romániában izolált *B. fragilis* csoportba tartozó izolátumok antibiotikum érzékenysége és a releváns rezisztencia gének kimutatása

A Romániából származó 53 vizsgált *Bacteroides* izolátum (36 *B. fragilis* és 17 NFB) nem szerepelt a 2008-2009-ben végzett európai antibiotikum érzékenységi felmérésben, mivel Románia nem volt a részvevő országok között.

Az ampicillinre-rezisztens törzsek (96.3%) 54.7%-a hordozta a *cepA* gént. A 8 cefoxitin-



rezisztens törzs közül kettőben mutattuk ki a *cfxA* gént. Az amoxicillin-klavulánsavval szembeni rezisztencia 13.0%-nak adódott. A *B. fragilis* törzsek 73.0%-a, a NFB izolátumok 82.4%-a bizonyult rezisztensnek tetracyclinre. 32 tetracyclin-rezisztens törzs (78.0%) volt *tetQ*-pozitív. Nem találtunk imipenem- vagy metronidazol-rezisztens izolátumok a vizsgált törzsek között, habár 3 *B. fragilis* törzsben kimutattuk a *cfiA* gént. 11 izolátum (20.4%) volt rezisztens clindamycinnel szemben. A clindamycin rezisztenciával összefüggésbe hozható rezisztencia gének előfordulása a vizsgált 53 törzsben következő volt: 4 *ermF*, 3 *linA*, 2 *msrSA* és 1 *ermB*. Az *ermF*-pozitív törzsek (4) 100%-a clindamycin-rezisztens volt. A moxifloxacinnal szembeni rezisztenciát 13.5%-nak találtuk a *B. fragilis*, és 17.6%-nak a NFB izolátumok között. 9 *bexA*-pozitív izolátumot detektáltunk, ezek mindegyike érzékeny volt moxifloxacinra.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

5.1. Vizsgálataink - melyeket Európa különböző országaiból származó klinikai izolátumokat felhasználva végeztünk - megerősítették, hogy a korong diffúziós módszer segítségével biztonsággal el tudjuk különíteni a vad típusú *Bacteroides* törzseket az anaerob infekciókban általában alkalmazott antibiotikumokra csökkent érzékenységgel rendelkező törzsektől. Sikertelt gátlási zóna határértékeket megállapítanunk az összes vizsgált antibiotikum esetében - a cefoxitin kivételével -, az EUCAST szabályainak szigorú betartása, standardizált táptalaj, inokulum, inkubálási idő és szigorúan anaerob körülmények biztosítása, valamint a meghatározott antibiotikum tartalmú korongok használata mellett. A gátlási zóna átmérők és a MIC értékek jó egyezését találtuk a clindamycin, imipenem, metronidazol, moxifloxacin és tigecyclin vonatkozásában. Meropenem tekintetében a vad típusúnak tekinthető törzsek gátlási zóna átmérői jól elkülönültek a többi izolátumtól. Amoxicillin/klavulánsav és piperacillin/tazobaktám esetében az érzékeny és a mérsékelten érzékeny törzsek gátlási zóna átmérői átfednek - a MIC adatokkal történő összehasonlítás szerint -, azonban ez nem akadályozza meg a rezisztens populációtól történő elkülönítésüket.

5.2. A jelen tézisben leírt, rendkívül nagyszámú (640), európai törzsgyűjtemény tagjain végzett vizsgálatok egy átfogó képet adtak a *cfiA*, *nim* és *bft* gének előfordulási gyakoriságát tekintve a *B. fragilis* csoport törzsei körében, amely adatok lehetőséget

adtak az előforduló emelkedett imipenem, illetve metronidazol MIC értékek genetikai hátterének kiértékeléséhez. Ezen felül elemezni tudtuk a négy különböző európai országból származó, igen ritka, *cfiA-bft* géneket együttesen hordozó *B. fragilis* izolátumokat. Ezeknek a törzseknek a jelenléte e virulens klón szélesebb elterjedését feltételezi. A 640 vizsgált *Bacteroides* törzs közül mindössze 3 izolátumban mutattuk ki a *nim* gének jelenlétét, mely igazolja más rezisztencia mechanizmusok meglétét az emelkedett metronidazol MIC értékkel rendelkező, azonban *nim*-negatív törzsek esetében. A 22 emelkedett imipenem MIC értékkel ( $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$ ) rendelkező izolátum közül 10 törzs bizonyult *cfiA*-pozitívnak és ezen törzsek közül 5 hordozott egyidejűleg aktiváló IS elemet is a *cfiA* gén upstream régiójában. Egyéb rezisztencia mechanizmus feltételezhető a többi, emelkedett imipenem MIC értékkel rendelkező törzs vonatkozásában.

## 6. HIVATKOZÁSOK

**Brisson-Noël** A and Courvalin P. Nucleotide sequence of gene *linA* encoding resistance to lincosamides in *Staphylococcus haemolyticus*. *Gene*, 43:247-53, 1986.

**CLSI** Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, 7th ed. Approved Standard, Document M11-A7, Wayne, PA: CLSI, 2007.

**Edwards** R. Resistance to beta-lactam antibiotics in *Bacteroides* spp. *J Med Microbiol*, 46:979-86, 1997.

**Erikstrup** LT, Danielsen TK, Hall V, *et al.* Antimicrobial susceptibility testing of *Clostridium difficile* using EUCAST epidemiological cut-off values and disk diffusion correlates. *Clin Microbiol Infect*, 18:E266-72, 2012.

**Finegold** SM. Anaerobic infections in humans: an overview. *Anaerobe*, 1:3-9,1995.

**Goldstein** EJ. Anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis*, 23:97–101, 1996.

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

**Ley** RE, Backhed F, Turnbaugh P, *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:11070-11075, 2005.

**Ley** RE, Turnbaugh PJ, Klein S, *et al.* Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444:1022-1023, 2006.

**Löfmark** S, Edlund C, Nord CE. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin Infect Dis*, 50:S16-23, 2010.

**Nagy** E, Urbán E, Nord CE on behalf of the ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. *Clin Microbiol Infect*, 17:371–379, 2011.

**Rasmussen** BA, Bush K, Tally FP. Antimicrobial resistance in *Bacteroides*. *Clin Infect*

Dis, 16:S390-400, 1993.

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

**Rotimi VO, Khoursheed M, Brazier JS, et al.** *Bacteroides* species highly resistant to metronidazole: an emerging clinical problem? *Clin Microbiol Infect*, 5:166–169, 1999.

**Simon GL and Gorbach SL.** Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology*, 86:174-193, 1984.

**Sóki J, Fodor E, Hecht DW, et al.** Molecular characterization of imipenem-resistant, *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates from the USA, Hungary and Kuwait. *J Med Microbiol*, 53:413-419, 2004.

**Sóki J, Gal M, Brazier JS, et al.** Molecular investigation of genetic elements contributing to metronidazole resistance in *Bacteroides* strains. *J Antimicrob Chemother*, 57:212-20, 2006.

**Sutter VL and Finegold SM.** Susceptibility of anaerobic bacteria to 23 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, 10:736–752, 1976.

**Toprak NU, Uzunkaya OD, Soki J, et al.** Susceptibility profiles and resistance genes for carbapenems (*cfiA*) and metronidazole (*nim*) among *Bacteroides* species in a Turkish University Hospital. *Anaerobe*, 18:169-71, 2012.

**Veillon MH and Zuber H.** Recherches sur quelques microbes strictement anaerobes et leur role en pathologie. *Arch Exp Med Path Anat*, 10:517-545, 1898.

**Wareham DW, Wilks M, Ahmed D, et al.** Anaerobic sepsis due to multidrug-resistant *Bacteroides fragilis*: microbiological cure and clinical response with linezolid therapy. *Clin Infect Dis*, 40:e67-8, 2005.

**Wexler HM.** *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev*, 20:593-621, 2007.

**Whittle G, Hund BD, Shoemaker NB, et al.** Characterization of the 13-kilobase *ermF* region of the *Bacteroides* conjugative transposon CtnDOT, *Appl Environ Microbiol*, 67:3488–3495, 2001.

**Wu S**, Powell J, Mathioudakis N, *et al.* *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces intestinal epithelial cell secretion of interleukin-8 through mitogen-activated protein kinases and a tyrosine kinase-regulated nuclear factor- $\kappa$ B pathway. *Infect Immun*, 72:5832-5839, 2004.

**Xu J** and Gordon JI. Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:10452-10459, 2003.

A tézisek alapjával az alábbi közlemények szolgálták:

I. Sóki J, Eitel Z, Urbán E, Nagy E on behalf of ESCMID Study Group on Anaerobic Infections: Molecular analysis of the carbapenem and metronidazole resistance mechanisms of *Bacteroides* strains reported in a Europe-wide antibiotic resistance survey. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41:122–125, 2013. (IF: 4.26)

II. Sóki J, Eitel Z, Terhes G, Nagy E, Urbán E on behalf of ESCMID Study Group on Anaerobic Infections: Occurrence and analysis of rare *cfiA-bft* doubly positive *Bacteroides fragilis* strains. *Anaerobe*, 23:70-73, 2013. (IF: 2.36)

III. Eitel Z, Sóki J, Urbán E, Nagy E on behalf of ESCMID Study Group on Anaerobic Infection: The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. *Anaerobe*, 21:43–49, 2013. (IF: 2.36)

IV. Székely E, Eitel Z, Molnár S, Szász IÉ, Bilca D, Sóki J: Analysis of Romanian *Bacteroides* isolates for antibiotic resistance levels and the corresponding antibiotic resistance genes. *Anaerobe*, 31:11-14, 2015.(IF: 2.48)

V. Nagy E, Justesen US, Eitel Z, Urbán E: Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group isolates. *Anaerobe*, 31:65-71, 2015. (IF: 2.48)

További közlemények:

I. Eitel Z, Terhes G, Sóki J, Nagy E, Urbán E: Investigation of the MICs of fidaxomicin and other antibiotics against Hungarian *Clostridium difficile* isolates. *Anaerob*, 31:47-49, 2015. (IF: 2.48)

## KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni őszinte hálámat témavezetőmnek, Nagy Erzsébet professzor asszonynak, a folyamatos támogatásért, türelméért, bátorításért, melyet a PhD tanulmányaim, kutatásaim és a dolgozatom megszületése során nyújtott. Köszönettel tartozom szigorú, de mindig segítő szándékú észrevételeiért és értékes javaslataiért.

Hálás köszönet illeti Dr. Sóki Józsefet a nélkülözhetetlen szakmai útmutatásaiért és gyakorlati tanácsaiért, valamint önzetlen támogatásáért az évek során.

Köszönettel tartozom Deák Judit professzor asszonynak és Dr. Urbán Editnek, akik lehetővé tették számomra, hogy a Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézetben végezzem el a PhD tanulmányaimat és biztosították a kutatások elvégzéséhez szükséges laboratóriumi háttérrel.

Hálás vagyok Dr. Terhes Gabriellának, Dr. Ulrik Stenz Justesennek, Dr. Bartha Noéminek, Dr. Bereczki Lászlónak, Fenyvesi Viktor Sándornak és Keszöcze Anikónak a segítőkész együttműködésükért és támogatásukért az évek során.

Köszönet illeti a Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet összes dolgozóját, akik munkájukkal lehetővé tették a napi feladataim elvégzését az Intézetben. Különösképpen köszönettel tartozom Bönde Anitának, Deák Tündének és Batki Szilviának a kiváló asszisztensi munkájukért.

Szeretném megköszönni Dr. Nadja Shoemakernek, Dr. Patrizia Spigaglianának és Dr. Hiroshi Nikaidonak, hogy kontroll törzseket biztosítottak számomra.

Hálásan köszönöm a Szüleimnek, Vőlegényemnek, családomnak és barátaimnak a folyamatos támogatást, bátorítást és szeretetüket.

## Társszerzői nyilatkozat

Alulírott, Prof. Dr. Nagy Erzsébet igazolom, hogy a:

- I. „Sóki J, Eitel Z, Urbán E, Nagy E on behalf of ESCMID Study Group on Anaerobic Infections: Molecular analysis of the carbapenem and metronidazole resistance mechanisms of *Bacteroides* strains reported in a Europe-wide antibiotic resistance survey. International Journal of Antimicrobial Agents, 41:122–125, 2013”
  - II. „Sóki J, Eitel Z, Terhes G, Nagy E, Urbán E on ESCMID Study Group on Anaerobic Infections: Occurrence and analysis of rare *cfiA-bft* doubly positive *Bacteroides fragilis* strains. Anaerobe, 23:70-73, 2013”
  - III. „Eitel Z, Sóki J, Urbán E, Nagy E on behalf of ESCMID Study Group on Anaerobic Infection: The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. Anaerobe, 21:43–49, 2013”
  - IV. „Nagy E, Justesen US, Eitel Z, Urbán E: Development of EUCAST disk diffusion method for susceptibility testing of the *Bacteroides fragilis* group isolates. Anaerobe, 31:65-71, 2015”
- c. tudományos közleményeket, a benne leírt tudományos eredmények eléréséhez szükséges munkában való részvétel alapján Eitel Zsuzsa doktori fokozatszerzéséhez felhasználhatja, azt más Ph.D. értekezéshez felhasználni nem kívánom.

Szeged, 2016. november 7.

Prof. Dr. Nagy Erzsébet



## Társszerzői nyilatkozat

Alulírott, Dr. Sóki József igazolom, hogy a: „Székely E, Eitel Z, Molnár S, Szász IÉ, Bilca D, Sóki J: Analysis of Romanian *Bacteroides* isolates for antibiotic resistance levels and the corresponding antibiotic resistance genes. *Anaerobe*, 31:11-14, 2015” c. tudományos közleményt, a benne leírt tudományos eredmények eléréséhez szükséges munkában való részvétel alapján Eitel Zsuzsa doktori fokozatszerzéséhez felhasználhatja, azt más Ph.D. értekezéshez felhasználni nem kívánom.

Szeged, 2016. november 7.

Dr. Sóki József