

Várandós nők *Streptococcus agalactiae* szűrése és methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* törzsek kimutatása MALDI-TOF tömegspektrometriával: alkalmazás és módszerfejlesztés

PhD disszertáció tézisei

Ábrók Marianna

Témavezető:

Prof. Emer. Dr. Deák Judit

Szegedi Tudományegyetem

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola



Szegedi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet

2020

Szeged

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
1. BEVEZETÉS.....	3
1.2 Baktériumok MALDI-TOF MS azonosítása a klinikai mikrobiológiai gyakorlatban.....	3
1.2.1 Fajsztípus azonosítás.....	3
1.2.2 Fajon belüli csoportok meghatározása – tipizálás.....	4
1.3 A <i>Streptococcus agalactiae</i> azonosítása.....	4
1.3.1 Általános jellemzés és klinikai jelentőség.....	4
1.3.2 Fajon belüli csoportok a <i>Streptococcus agalactiae</i> esetében.....	4
1.3.3 Várandós nők GBS szűrése.....	5
1.4 Methicillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) azonosítása.....	6
1.4.1 Általános jellemzés és klinikai jelentőség.....	6
1.4.2 Az MRSA kimutatása.....	6
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	7
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	7
3.1 Klinikai minták és baktérium törzsek.....	7
3.2 Standard tenyésztési és azonosítási módszerek.....	8
3.3 Antibiotikum érzékenységi vizsgálat.....	8
3.4 PBP2' latex agglutinációs teszt.....	8
3.5 MALDI-TOF MS analízis.....	8
3.6 Az ST-1 és ST-17 szekvenencia-típusok MALDI-TOF MS-alapú kimutatása.....	9
4. EREDMÉNYEK.....	9
4.1 MALDI-TOF MS-alapú módszer kidolgozása várandós nők <i>Streptococcus agalactiae</i> kolonizációjának gyors kimutatására (Ábrók <i>et al.</i> , 2015).....	9
4.2 Az SZTE Szent-Györgyi Albert Klinikai Központban 2012 és 2018 között várandós nők körében MALDI-TOF MS alkalmazásával végzett GBS szűrések eredményeinek összehasonlító elemzése (Ábrók <i>et al.</i> , 2020).....	10
4.3 A MALDI-TOF MS alkalmazása magas virulenciájú ST-1 és ST-17 <i>S. agalactiae</i> klónok kimutatására.....	11
4.4 MALDI-TOF MS-alapú módszer kidolgozása methicillin-rezisztens <i>S. aureus</i> törzsek gyors kimutatására (Ábrók <i>et al.</i> , 2018).....	11
5. MEGBESZÉLÉS.....	13
5.1 MALDI-TOF MS-alapú módszer kidolgozása várandós nők <i>Streptococcus agalactiae</i> kolonizációjának gyors kimutatására.....	13
5.2 Az SZTE Szent-Györgyi Albert Klinikai Központban 2012 és 2018 között várandós nők körében MALDI-TOF MS alkalmazásával végzett GBS szűrések eredményeinek összehasonlító elemzése.....	14
5.3 A MALDI-TOF MS alkalmazása magas virulenciájú ST-1 és ST-17 <i>S. agalactiae</i> klónok kimutatására.....	14
5.4 MALDI-TOF MS-alapú módszer kidolgozása methicillin-rezisztens <i>S. aureus</i> törzsek gyors kimutatására.....	15
6. KÖVETKEZTETÉSEK.....	15
IRODALOJEGYZÉK.....	17
SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE.....	19
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	22

1. BEVEZETÉS

A mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria (MALDI-TOF MS) hatékony módszernek bizonyult a baktériumok azonosítására és napjainkra a rutin klinikai mikrobiológiai diagnosztikai laboratóriumok diagnosztikai arzenáljának fontos részévé vált. Az adatbázisok folyamatos fejlesztése mellett napjainkban két fő területre fókuszálnak a fejlesztések: (i) az azonosításhoz szükséges idő lerövidítésére és (ii) a tömegspektrumok elemzésén alapuló különféle tipizálási eljárások fejlesztésére. Mivel a MALDI-TOF MS analízishez alapvetően tiszta tenyészetek szükségesek, az identifikáláshoz szükséges idő lerövidíthető a mintaelőkészítés optimalizálásával, vagy oly módon, hogy az azonosítás közvetlenül a mintából vagy a szelektív minta dúsítóból történik. A tipizálás a tömegspektrumban jellegzetes, specifikus csúcsok előfordulása, illetve típus-specifikus spektrum mintázatok azonosítása által valósulhat meg, amit például az antibiotikum rezisztencia meghatározása, vagy magas virulenciájú típusok detektálása során alkalmazhatnak.

1.2 Baktériumok MALDI-TOF MS azonosítása a klinikai mikrobiológiai gyakorlatban

1.2.1 Fajsztíű azonosítás

A baktériumok fajsztíű azonosítására alkalmas speciális fehérje mintázat létrehozásához folyamatosan termelődő, nagy mennyiségben jelenlévő, a 2-10 kDa tartományba eső méretű fehérjéket használnak [1]. Mivel az aktuálisan detektált spektrum sohasem egyezik meg teljesen a referencia adatbázisban található spektrumokkal, az elemzést végző szoftver a spektrumhoz egy ún. *score* értéket kalkulál (*log score*), amely a mért minta spektruma és a referencia spektrum hasonlóságát jelzi. A gyakorlatban a *score* értékeket az identifikálás során figyelembe kell venni. Általában a 2,0 fölötti értékek megbízható faji szintű, a 1,7-2,0 közötti értékek megbízható nemzetségi szintű azonosítást tesznek lehetővé [2].

Az elemzett minta általában az adott izolátum tiszta tenyészetének egy kis mennyisége. A minta vizsgálható úgy, hogy a baktérium telep mintahordozóra (*target plate*) történő felvitele és száradása után közvetlenül fedik a mátrixszal (direkt transzfer módszer) [3]. Bizonyos esetekben, az identifikálás hatékonyságának növelése érdekében a direkt transzfer kiterjeszhető egy gyors, 70%-os hangyasav alkalmazásával (direkt transzfer – hangyasavas preparálás) [3]. Más esetekben a target lemezen végzett alkoholos-hangyasavas extrakció is alkalmazható [4]. Bizonyos mikroorganizmusok esetében a MALDI-TOF MS analízishez szükséges fehérjék nem tárhatók fel megfelelően a mintahordozón végzett extrakcióval. Ehelyett a fehérje kivonást a mintalemezre történő felvitel előtt kell elvégezni [5]. A MALDI-

TOF MS identifikálás általában kevesebb mint egy órát vesz igénybe. Mivel a megbízható eredményhez tiszta tenyészetek használata ajánlott, a tenyésztési lépés az esetek többségében nem kihagyható. Ezért legkevesebb 18-48 óra, illetve a mikroorganizmus tenyésztési sajátosságaitól és a klinikai minta típusától függően, akár hosszabb tenyésztési idő és további dúsítás is szükséges lehet [4].

1.2.2 Fajon belüli csoportok meghatározása – tipizálás

Az elmúlt évtizedben számos erőfeszítés történt annak érdekében, hogy a MALDI-TOF MS identifikálást kiterjesszék a faj alatti csoportok azonosításának irányába, azaz olyan törzstipizálási módszereket fejlesszenek, amelyek képesek azonosítani a különféle szerotípusokat, toxin termelő, vagy magas virulenciájú, illetve antibiotikum rezisztenciával rendelkező törzseket. Az ilyen módszerek fejlesztésének kulcs lépése a tömegspektrum akkurátus elemzése és ezáltal specifikus csúcsok, vagy csúcs mintázatok felismerése [6-8]. Annak ellenére, hogy számos tanulmány igazolta a MALDI-TOF MS alkalmazhatóságát ezen a területen, az eddig kidolgozott módszerek többsége egyelőre kísérleti stádiumban van [9].

1.3 A *Streptococcus agalactiae* azonosítása

1.3.1 Általános jellemzés és klinikai jelentőség

A *Streptococcus agalactiae* vagy B csoportú *Streptococcus* (GBS) Gram-pozitív β -hemolizáló baktérium, amely egyike az újszülöttkori invazív fertőzések, az újszülöttkori szepszis és meningitis leggyakoribb kórokozóinak [10-12]. A GBS kommenzalistaként jelen lehet a gastrointestinalis és genitourinális traktusban, a várandós nők mintegy 10-30%-a tünetmentesen kolonizált *S. agalactiae*-val [10,13]. Ezen nők esetében ugyanakkor fokozott a koraszülés vagy halva születés kockázata [12].

1.3.2 Fajon belüli csoportok a *Streptococcus agalactiae* esetében

Napjainkban 10 GBS szerotípust (Ia, Ib, II-IX) különböztetünk meg a poliszacharid tok szerológiai jellemzői alapján [14,15]. Ezek közül a III. szerotípust hozzák legtöbbször összefüggésbe az újszülöttkori invazív fertőző megbetegedésekkel [16,17].

A szerológiai típusok mellett, multilókuszos szekvencia tipizálással (*multilocus sequence typing*; MLST) különféle szekvencia-típusokat (*sequence type*; ST) is megkülönböztetnek [18]. A humán eredetű GBS típusok 6 nagy klonális komplexbe sorolhatók [19]. A szekvencia-típusok közül az ST-17 jól ismert, mint olyan klón, amely erősen asszociált a kora újszülött kori meningitises, illetve a GBS okozta késői invazív fertőzésekkel [10]. Ezek főleg a III. szerotípusba tartozó törzsek és “magas virulenciájú” klónként definiálják őket. Több

tanulmány hangsúlyozza az ST-17 típusú törzsek gyors kimutatásának jelentőségét pozitív GBS-szűrés esetén [6]. Mint a korai újszülöttkori invazív fertőzések jelentős kórokozója, egy másik klón, az ST 1 is jelentős, amely főleg az V. szerotípushoz köthető [20].

1.3.3 Várandós nők GBS szűrése

A várandós nők körében végzett GBS-szűrést már számos országban bevezették [10]. A szűrés során a hüvelyi/rektális GBS-kolonizációt mutatják ki, amely szülés közben adandó intrapartum antibiotikum profilaxist (IAP) indikál az újszülöttkori invazív *S. agalactiae* fertőzések megelőzése céljából [10]. A standard módszer a kolonizáció meghatározására a tenyésztés, amely az ajánlások szerint egy szelektív dúsítási lépéssel indul (pl. nalidixsavval és colistinnel kezelt módosított Todd-Hewitt dúsító alkalmazásával), amit 18-24 óra inkubálás után a megfelelő táptalajra (pl. Columbia agar 5% birkavérrel) történő kioltás és újabb 24-48 órás inkubáció követ [21]. Alkalmanként további 24 óra tenyésztés is szükséges lehet, ha a szelektív tenyésztés nem jár egyértelmű eredménnyel. Ezért a teljes tenyésztésen alapuló identifikálási folyamat 2-3 napot is igénybe vehet.

A MALDI-TOF MS hatékony módszer a *S. agalactiae* és egyéb béta-hemolizáló streptococcusok azonosítására és rutinszerűen alkalmazzák a klinikai mikrobiológiai laboratóriumok [18]. Mivel ez a metodika tiszta tenyészetet igényel, a fent említett tenyésztési lépésekre szükség van az identifikálás előtt [18,22]. A MALDI-TOF MS ugyancsak alkalmasnak bizonyult egyes GBS MLST típusok meghatározására. Lartigue és munkatársai [6] leírtak egy, a tömegspektrumban található specifikus csúcsok detektálásán alapuló módszert az ST-17 és ST-1 klónok azonosítására.

Mivel a *S. agalactiae* törzsek érzékenyek β -laktámokra, a penicillin származékok az elsőként választandó szerek IAP, illetve GBS infekciók terápiaja során [23]. Penicillin érzékeny várandós nők esetében clindamycin alkalmazása javasolt, clindamycin rezisztens törzsek jelenléte esetén vancomycin terápia lehet az alternatíva [23]. Ugyanakkor a beta-laktám alternatívaként használt antibiotikumokra rezisztens törzsek előfordulási gyakorisága világszerte növekszik [23,24]. Ezért a várandós nők *Streptococcus agalactiae* szűrése során kitenyésztett GBS törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálata elengedhetetlen a rutin klinikai mikrobiológiai diagnosztikában.

1.4 Methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) azonosítása

1.4.1 Általános jellemzés és klinikai jelentőség

A *Staphylococcus aureus* egy Gram-pozitív baktérium, amely mind a normál mikrobióta tagjaként, mind patogén mikroorganizmusként előfordul. Az MRSA jelentős patogén, mely nagyon változatos nosocomialis és közösségben szerzett fertőzéseket okozhat a bőrfertőzésektől, az életveszélyes véráram fertőzéseken át, az endocarditis-ig, vagy a tüdőgyulladásig [25].

A methicillin rezisztencia általában olyan alternatív penicillinkötő fehérje (pl. PBP2a) jelenlétének következménye, amely alacsony affinitást mutat a beta-laktám antibiotikumok iránt, amelyek így nem tudják hatékonyan gátolni a baktériumsejtfal szintézisét [26]. A PBP2a nem a genom adott lókuszan kódolt PBP egy változata és nem található meg a methicillin-érzékeny *Staphylococcus aureus* törzsekben. Egy speciális gén, a *mecA* gén kódolja, amely egy mobilis genetikai elem helyezkedik el [27]. A methicillin rezisztencia a gyakorlatban valamennyi beta-laktám antibiotikummal szembeni rezisztenciát jelenti [26]. Továbbá az MRSA izolátumok egyéb antibiotikumokkal szemben is rezisztenssé válhatnak, köztük vancomycinnel szemben, amely, különösen súlyos infekciókban, az MRSA fertőzés kezelésére az egyik legalkalmasabb választás [28]. Mivel az ilyen fertőzéseket gyakran nehéz kezelni és a megfelelő antibiotikum terápia megindításának esetleges késlekedése komolyan befolyásolja a klinikai kimenetelt, az MRSA fertőzés gyors és megbízható kimutatása fontos feltétele a hatékony terápiának [29].

1.4.2 Az MRSA kimutatása

Az MRSA kimutatás standard módszere egy szelektív tenyésztéses szűrési stratégia, amely egy 24 órás szelektív dúsítási lépést és egy szelektív táptalajon történő tenyésztést foglal magába [25,30]. Így az identifikáció kb. két napot vesz igénybe. Ezután még további 24 órát igényelhet a methicillin érzékenység tesztelése, illetve a rezisztencia kimutatása. Az EUCAST ajánlása a törzs cefoxitinnel szembeni érzékenységi vizsgálatát javasolja a methicillin rezisztencia kimutatására.

A *mecA* génen kódolt PBP 2a szerológiai kimutatása is lehetséges, mivel ez a fehérje az MRSA törzsek sejtmembránjában található. Az e célra kifejlesztett gyors, latex agglutinációs vagy membrán immunoassay módszerek általánosan elterjedtek [25, 29].

A MALDI-TOF MS rendkívül megbízható és hatékony módszer a *S. aureus* törzsek azonosítására [31,32]. Mivel ez a technika tiszta tenyészetet igényel, a szelektív dúsítási és

kioltási lépéseket kell alkalmazni az analízis előtt. A tömegspektrum elemzése alapján történő MRSA kimutatásra többféle eljárást kidolgoztak, de ezek még nem terjedtek el a rutin klinikai mikrobiológiai diagnosztikai gyakorlatban [7].

2. CÉLKITŰZÉSEK

Célunk a MALDI-TOF MS módszer alkalmazása és fejlesztése volt egyes baktériumok fajszerű azonosítására és klinikailag releváns faj alatti csoportok meghatározására. Ennek megfelelően célkitűzéseink a következők voltak:

1. Olyan MALDI-TOF MS-alapú módszer kidolgozása, amely lehetővé teszi a várandós nők körében végzett *Streptococcus agalactiae* szűrés időtartamának lerövidítését, mely magában foglalja a minta preparálás optimalizálását.
2. A 2012-2018 közötti időszakban várandós nők körében intézetünkben végzett GBS szűrés és a kolonizáló GBS törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálati eredményeinek összehasonlító elemzése.
3. A Lartigue és munkatársai [6] által, magas virulenciájú ST-1 és ST-17 *S. agalactiae* klónok azonosítására leírt MALDI-TOF MS-alapú eljárás alkalmazása és tesztelése a várandós nők GBS szűrésére érkezett mintákból tenyésztett *S. agalactiae* izolátumokkal.
4. Gyors MALDI-TOF MS-alapú módszer kidolgozása methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* törzsek kimutatására. Ez magában foglalja a MALDI-TOF MS-hez szükséges mintaelőkészítés optimalizálását az MRSA törzsek detektálásához szükséges idő lerövidítése céljából, valamint a MALDI-TOF MS analízis kombinálását a PBP2a fehérje kimutatására alkalmas latex agglutinációs teszttel.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Klinikai minták és baktérium törzsek

A GBS szűréshez használt MALDI-TOF MS eljárás mintaelőkészítési módszerének optimalizálásához használt referencia törzsek a következők voltak: *S. agalactiae* ATCC 13813, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 és *Candida albicans* ATCC 14053. Az általunk kifejlesztett, szelektív Todd-Hewitt dúsító folyadékból végzett MALDI-TOF MS alkalmazás tesztelését 100 db, a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Szülészeti- és Nőgyógyászati Klinikájáról 2013-2014-ben várandós nők körében végzett *S. agalactiae* szűrésre

laboratóriumunkba érkezett hüvelyváladék mintából végeztük. A SZTE Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Szülészeti- és Nőgyógyászati Klinikáján gondozott gravidák hüvelyváladék mintáiból 2012. január és 2018. júliusa között laboratóriumunkban végzett GBS-szűrési eredményeit értékeltük (n=19267). A pozitív GBS-szűrés esetén a *S. agalactiae* izolátumok antibiotikum érzékenységi vizsgálatát is elvégeztük (n=3554). A 2017-2018-ban izolált GBS törzsek közül véletlenszerűen kiválasztottunk 260 izolátumot, melyek MALDI-TOF tömegspektrumát elemeztük az ST-1 és ST-17 típusok kimutatása céljából.

A SZTE Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ klinikáiról 2015 szeptembere és 2017 júniusa között MRSA-szűrésre laboratóriumunkba érkezett 255 mintát vontunk be az általunk kidolgozott, a MALDI-TOF MS és a PBP2a latex agglutinációs teszt kombinációján alapuló MRSA kimutatási eljárás tesztelésére; a minták megoszlása a következő volt: 92 orrváladék, 85 torokváladék, 34 axilla törlés, 32 inguinalis törlés és 12 egyéb minta.

3.2 Standard tenyésztési és azonosítási módszerek

A GBS szűrésre érkezett mintákat a CDC 2010-ben megjelent ajánlásának megfelelően a standardnak számító szelektív dúsítást alkalmazó tenyésztéses módszerrel dolgoztunk föl [21]. Az MRSA szűréseket a szintén standard módszernek számító, szelektív dúsításon alapuló tenyésztéses módszerrel végeztük [30,33].

3.3 Antibiotikum érzékenységi vizsgálat

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat az EUCAST aktuális ajánlásainak megfelelően végeztük korongdiffúziós, vagy MIC meghatározáson alapuló módszerrel (<http://www.eucast.org/>) [34].

3.4 PBP2' latex agglutinációs teszt

A *mecA*-gén által kódolt PBP2a fehérje termelő *S. aureus* törzsek kimutatását PBP2' latex agglutinációs teszttel végeztük (Oxoid, England), a gyártó előírásainak megfelelően.

3.5 MALDI-TOF MS analízis

A rutin mikrobiológiai diagnosztikában alkalmazott fajszerű azonosításhoz a minta preparálást direkt transzfert követő, mintahordozón végzett hangyasavas extrakcióval végeztük mind a GBS, mind a *S. aureus* törzsek esetében [3]. A MALDI-TOF MS analízist Wieser és munkatársai [31] által leírtaknak megfelelően Microflex MALDI Biotyper készülékkel végeztük (Bruker Daltonics, Németország).

3.6 Az ST-1 és ST-17 szekvencia-típusok MALDI-TOF MS-alapú kimutatása

Az ST-1 és ST-17 szekvencia-típusok kimutatását 260 GBS törzs tömegspektrumának elemzésével végeztük a Lartigue és munkatársai [6] által leírt módszerek megfelelően. A ST-1 törzsekre jellemző 6250 Da, valamint a ST-17 törzsekre jellemző 7625 Da tömegű fehérjék jelenlétének detektálását a flexAnalysis 3.4 szoftverrel (Bruker Daltonics, Németország) végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1 MALDI-TOF MS-alapú módszer kidolgozása várandós nők *Streptococcus agalactiae* kolonizációjának gyors kimutatására (Ábrók *et al.*, 2015) [35]

A várandós nők GBS-kolonizációjának kimutatására a tenyésztésen alapuló szűrési módszerek tekinthetők standard módszerek. Annak érdekében, hogy lerövidítsük az identifikáláshoz szükséges időt, a MALDI-TOF MS-t megelőző mintaelőkészítést optimalizáltuk, hogy a kimutatás közvetlenül a szelektív dúsító folyadékból elvégezhető legyen.

A tesztekhez 18 órán át módosított Todd-Hewitt szelektív dúsítóban inkubált mintákat használtunk. A módszer optimalizálása során az *S. agalactiae* és más baktériumok ismert törzseit inkubáltunk a szelektív dúsító folyadékban, majd MALDI-TOF MS analízist végeztünk a törzsek azonosítása céljából. E kísérletek tapasztalataira építve, az alábbi minta preparálási eljárást javasoljuk a szelektív dúsítóból közvetlenül megvalósítható GBS szűrésre:

1 ml mikrocentrifuga-csőbe mért szelektív dúsító folyadékot lecentrifugálunk ($15\,500 \times g$, 2 perc, $20\,^{\circ}\text{C}$), majd a baktérium üledéket $300\ \mu\text{l}$ desztillált ultra tiszta vízben feloldjuk. A baktérium szuszpenzióhoz $900\ \mu\text{l}$ abszolút etanolt adunk és alapos keverés után újra centrifugáljuk ($15\,500 \times g$, 2 perc, $20\,^{\circ}\text{C}$). A felülúszó eltávolítása után a keletkezett üledékhez $25\ \mu\text{l}$ 70%-os hangyasavat, majd keverés után $25\ \mu\text{l}$ acetonnitritet adunk és újra centrifugáljuk ($15\,500 \times g$, 2 perc, $20\,^{\circ}\text{C}$). A felülúszóból $1\ \mu\text{l}$ -t viszünk fel a mintahordozó lemez mintahelyére. A mintát szobahőmérsékleten száradni hagyjuk, majd $1\ \mu\text{l}$ mátrixszal fedjük, száradás után elvégezzük a MALDI-TOF MS analízist.

A fent leírt módszert 100 db hüvelyváladék mintán teszteltük és összehasonlítottuk az általunk kidolgozott módszerrel kapott eredményeket a standard GBS szűréssel kapott eredményekkel. A standard GBS szűréssel 27 minta bizonyult pozitívnak, ezek közül az általunk kidolgozott, szelektív dúsítóból végzett MALDI-TOF MS módszerrel 20 esetben

igazolódott *S. agalactiae* jelenléte (score value: 1,711-2,322). A 7 további, hagyományos szűréssel GBS pozitívnak bizonyult minta esetében az általunk kidolgozott módszer 6 esetben *Enterococcus faecalis*-t adott meg (log scores: 1,797-2,070), 1 esetben pedig *S. aureus*-t (log score: 1,636). Ezekben az esetekben az inkubáció után a szelektív dúsítóban *E. faecalis* és *S. aureus* volt a domináns baktérium, melyek a hagyományos tenyésztési módszerrel is kimutathatók voltak. Mind a 73, standard módszerrel GBS negatív minta negatívnak bizonyult az általunk kidolgozott gyors módszerrel is. Tehát az esetek 93%-ában a gyors MALDI-TOF MS módszer a standard szűréssel megegyező eredményt adott. A két módszerrel kapott eredmények közötti eltérés oka valamilyen B-csoportú *Streptococcus*-tól eltérő baktérium jelenléte volt a mintában. Az új MALDI-TOF MS alkalmazáson alapuló módszer pozitív prediktív értéke 100%, negatív prediktív értéke 91%, specificitása 100%, szenzitivitása pedig 74,1% volt.

4.2 Az SZTE Szent-Györgyi Albert Klinikai Központban 2012 és 2018 között várandós nők körében MALDI-TOF MS alkalmazásával végzett GBS szűrések eredményeinek összehasonlító elemzése (Ábrók *et al.*, 2020) [36]

Várandós nők körében 2012 januárja és 2018 júliusa között laboratóriumunkban végzett *Streptococcus agalactiae* szűrések eredményeit elemeztük. A vizsgált időszakban 19267 várandós nő hüvely/cervix váladék mintájából végeztünk GBS szűrést a CDC 2010-es ajánlásának megfelelő szelektív dúsítást és tenyésztést alkalmazó módszerrel. A kitenyésztett *S. agalactiae* törzsek azonosítását MALDI-TOF MS analízissel végeztük. A vizsgált populációban 3554 esetben mutattuk ki GBS jelenlétét a mintákban. A vizsgált időszakot tekintve az egyes években csak kis változások figyelhetők meg a kolonizációs rátákat tekintve, melyek 17,4% és 19,8% között változtak (átlag: 18,4%). A *S. agalactiae*-vel kolonizált terhes nők aránya valamennyi korcsoportban magasabb volt 10%-nál. Megemlítendő, hogy bár a 26-30 év közötti gravidák csoportjába tartozó nőktől jóval kevesebb mintát (n=3566) teszteltünk, mint a 31-35 éves korcsoportba tartozóktól (n=6510), a kolonizált várandós nők aránya ugyanannyi (19%) volt mindkét korcsoportban, és összehasonlítva a többi korcsoporttal ez az érték volt a legmagasabb.

A GBS szűrés során izolált *S. agalactiae* (n=3554) törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálatát is elvégeztük. Az izolátumok mindegyike érzékenyek bizonyult penicillinre, cefuroximra, vancomycinre és trimethoprim-sulfamethoxazolra. Az erythromycinre rezisztens törzsek aránya 34,9%, a clindamycinre rezisztens törzsek aránya 34,6% volt. Az erythromycinre

vagy clindamycinre rezisztens törzsek többsége korezisztensnek bizonyult a két antibiotikumra, így a GBS pozitív mintákból izolált *S. agalactiae* törzsek 33,2%-a rezisztens volt erythromycinre és clindamycinre egyaránt. Az izolátumok kis része volt rezisztens csak erythromycinre (1,9%), vagy csak clindamycinre (1,4%). A clindamycin rezisztencia többségében konstitutívnek bizonyult, csak az izolátumok 6,5 %-ánál igazolódott indukálható rezisztencia. A vizsgált időszakban egyértelműen emelkedett a rezisztens törzsek aránya. 2012 és 2018 között az erythromycinre rezisztens törzsek aránya 29,2%-ról 39,7 %-ra, a clindamycin rezisztens törzsek aránya 30,2%-ról 38,7%-ra nőtt, a korezisztens törzsek aránya pedig 28%-ról 35,7%-ra változott.

4.3 A MALDI-TOF MS alkalmazása magas virulenciájú ST-1 és ST-17 *S. agalactiae* klónok kimutatására

A Lartigue és munkatársai [6] által kidolgozott metodikát alkalmaztuk 260 véletlenszerűen kiválasztott, várandós nők 2017-2018-ban végzett GBS szűrése során izolált *S. agalactiae* törzs vizsgálatára. Célunk a magas virulenciájú invazív ST-1 és ST-17 *S. agalactiae* klónok kimutatása a rájuk jellemző fehérje mintázat jelenlétének detektálása révén. A 260 vizsgált törzs közül 71 (27,3%) bizonyult az ST-1, 50 (19,2%) pedig az ST-17 típusba tartozónak. Az ST-17 típusú törzsek 34%-a volt rezisztens erythromycinre és clindamycinre egyaránt. Hasonló arányt mutattak a “nem ST-1 és nem S-17” típusú törzsek is (30,9%). Ezzel szemben az ST-1 törzsek több, mint fele (52,1%) rezisztens volt ezen antibiotikumokra. Az ST-1 típusba sorolt erythromycin-clindamycin rezisztens izolátumok mindegyike korezisztens volt e két antibiotikumra. Az ST-17 típusba tartozó törzsek 2%-a, a “nem ST-1 és nem S-17” típusú törzsek 2,9%-a viszont csak clindamycinre bizonyult rezisztensnek. Az indukálható clindamycin rezisztens törzsek aránya minhárom csoportban alacsony volt: ST-17 típusú klónok esetében 4%, ST-1 esetében 5,6%, “nem ST-1 és nem S-17” esetében 7,9%. A 260 vizsgált izolátum egyike sem volt rezisztens csak erythromycinre.

4.4 MALDI-TOF MS-alapú módszer kidolgozása methicillin-rezisztens *S. aureus* törzsek gyors kimutatására (Ábrók *et al.*, 2018) [37]

A tenyésztésen alapuló MRSA szűrési eljárás idejének lerövidítését szolgáló módszer során, a szelektív dúsításból történő közvetlen MALDI-TOF MS identifikálást kombináltuk a PBP2' latex agglutinációs teszttel. Mivel a laboratóriumi diagnosztikában rutinszerűen használt PBP2' latex agglutinációs eljárás csak megfelelő mennyiségű bakteriális sejt tesztelése esetén ad eredményt [38], az MRSA szelektív dúsítót tápközeget az inkubálást követően centrifugáltuk

és a baktérium pelletet használtuk a kísérletekben. A kidolgozott eljárás a következő: az MRSA szűrésre érkezett klinikai mintákat szelektív MRSA dúsító folyadékban inkubáljuk 18-24 órán keresztül, majd a dúsított mintát tartalmazó folyadékból 1.5 ml-t lecentrifugálunk ($15\,500 \times g$, 2 perc, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) és az így keletkezett baktérium üledéket $50\ \mu\text{l}$ ultra tiszta vízben felvesszük. A szuszpenziót újra centrifugáljuk ($15\,500 \times g$, 2 perc, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) és ezt a baktérium üledéket használjuk a MALDI-TOF MS azonosításhoz. A MALDI-TOF MS analízishez szükséges mintaelőkészítés során a target lemezre felvitt baktérium üledéket 70%-os hangyasavval kezeljük. Ha az így előkészített minta MALDI-TOF MS analízise *S. aureus*-t identifikál, akkor a dúsítóból nyert baktérium üledék megmaradt részéből PBP2' latex agglutinációs tesztet végzünk. A dúsítóból történő gyors kimutatás kulcseleme a sejtszuszenziót koncentrálására szolgáló két centrifugálási lépés a MALDI-TOF MS analízist, illetve a hangyasavas extrakciót megelőzően.

A módszert 255, az intézetünkben végzett MRSA szűrések során 2015 és 2017 közt gyűjtött mintán teszteltük. Mind a standard módszer (azaz dúsítást követő szelektív tenyésztés és az így nyert telepek MALDI-TOF MS analízise), mind az általunk optimalizált, közvetlenül a dúsítóból végzett MALDI-TOF MS (log scores: 1,238-2,318) 49 mintában detektált *S. aureus*-t. Ezen belül az antibiotikum érzékenység vizsgálattal kombinált standard módszer 18 esetben azonosított MRSA-t. Ugyanakkor a PBP2' latex agglutinációs teszt 16 mintát talált MRSA pozitívnak. Két esetben, az üledék mennyisége nem volt elegendő a latex teszt elvégzéséhez. Néhány esetben a dúsító tápközeg centrifugálása olyan kevés üledéket eredményezett, hogy a MALDI-TOF MS identifikáció sikertelen volt: nem állapított meg spektrumot, vagy alacsony score értékű, azaz nem értékelhető eredményt adott. Minden ilyen esetben a standard MRSA szűrés ugyancsak negatív eredményt adott. Ha a közvetlenül a szelektív dúsítóból végzett MALDI-TOF MS *S. aureus*-tól eltérő baktériumot azonosított a mintában, a standard módszer eredménye szintén negatívnak bizonyult MRSA-ra nézve.

A minták 99%-a esetén, a közvetlenül a dúsító tápközegből végzett és PBP2' latex agglutinációs tesztel kombinált MALDI-TOF MS eljárás a standard MRSA szűréssel azonos eredményt adott. A valódi és a fals pozitív, valamint a valódi és fals negatív eredmények száma 16, 0, 237 és 2 volt. A módszer érzékenysége és specificitása 89 és 100%-nak adódott, míg a pozitív és a negatív prediktív érték 100 és 99% volt. Amennyiben egy minta a PBP2' latex agglutinációs tesztel kombinált gyors MALDI-TOF MS analízissel pozitívnak bizonyult, akkor a hagyományos eljárással szintén pozitív eredményt kaptunk.

5. MEGBESZÉLÉS

A MALDI-TOF MS analízis az elmúlt években hatékony és megbízható eleme lett a baktérium identifikálás eszköztárának [22] és intézetünk rutin diagnosztikai gyakorlatának is részét képezi [39,40].

5.1 MALDI-TOF MS-alapú módszer kidolgozása várandós nők *Streptococcus agalactiae* kolonizációjának gyors kimutatására

Positív GBS szűrési eredmény esetén a szülés közben megfelelő antibiotikum profilaxis alkalmazása javasolt [41]. A *S. agalactiae* törzsek identifikációjára a MALDI-TOF MS széles körben alkalmazott módszer, amely megbízhatóan alkalmas a baktérium azonosítására [18]. Mivel a MALDI-TOF MS módszerrel történő identifikálásra leginkább a tiszta baktériumtenyészet alkalmas, a standard GBS-szűrési metodikák 2-3 napos tenyésztési időt vesznek igénybe [18,22]. Mivel az általunk kidolgozott, közvetlenül a szelektív dúsító folyadék centrifugált üledékéből végzett, MALDI-TOF MS-alapú GBS szűrési módszer pozitív prediktív értéke 100%, ezért alkalmazása lehetőséget nyújt a GBS kolonizáció kimutatására már 18-24 órával a minta laboratóriumba érkezése után. Ez az esetek zömében jelentősen lerövidíti a GBS szűrés idejét.

Több tanulmány hangsúlyozza a mintaelőkészítési, illetve a tenyésztési idő rövidítésének szükségességét, de napjainkig csak néhány olyan alkalmazás született, amely hatékony megoldást kínál erre a problémára [42,43]. A szelektív dúsító folyadékból történő direkt azonosítás megfelelő hatásfokkal alkalmazható többek között *Salmonella* sp. kimutatására széklet mintából [44], *Listeria monocytogenes* jelenlétének igazolására élelmiszer mintákból [45]. Több tanulmány szerint a MALDI-TOF MS hatékonyan alkalmazható különféle baktériumok azonosítására pozitívvá vált hemokultúra mintákból [46-49]. Az általunk kidolgozott gyors GBS szűrési módszerrel kapott eredmények 93%-ban megegyeztek a hagyományos GBS szűrés alkalmazásával kapott eredményekkel. Hasonló tapasztalatokról (92,6%-os egyezés) számoltak be *Salmonella* sp. szelektív dúsítóból MALDI-TOF MS alkalmazásával történő direkt kimutatása során [44] és számos egyéb baktérium esetében (97-98%) [50]. Valamennyi közölt esetben a módszer kulcs lépése volt a minta előkészítés optimalizálása, különös tekintettel arra, hogy a MALDI-TOF MS analízisre alkalmas, megfelelő minőségű és mennyiségű baktériumfehérje álljon rendelkezésre, például a folyékony médiumok centrifugálása által [44,50].

5.2 Az SZTE Szent-Györgyi Albert Klinikai Központban 2012 és 2018 között várandós nők körében MALDI-TOF MS alkalmazásával végzett GBS szűrések eredményeinek összehasonlító elemzése

A GBS kolonizációs szint átlagosan 18.4%-nak adódott a várandós nők körében a 2012 eleje és 2018 közepe közötti időszakban [36]. Ez az érték megfelel a más európai országokban megfigyelteknek (6.5%-36%) [51]. Az általunk tapasztalt kolonizációs ráta valamivel magasabb a szomszédos Szerbiában nemrég leírt értéknél [52]. Valamennyi általunk izolált *S. agalactiae* törzs érzékeny volt penicillinre, cefuroximra és vancomycinra. A korábbi tanulmányok alapján közismert tény a GBS törzsek szinte kivétel nélküli érzékenysége β -laktámokra és vancomycinra [53,54]. Egyidejűleg viszonylag magas, és a vizsgálati időszak folyamán növekedő mértéket mutató erythromycin (34,9%) és clindamycin (34,6%) rezisztencia szint is megfigyelhető volt. Más tanulmányok is felhívják a figyelmet a makrolid és linkózamid rezisztencia terjedésére a *S. agalactiae* törzsek körében [24,55] és hangsúlyozzák a kolonizáló GBS izolátumok antibiotikum érzékenységi vizsgálatának jelentőségét a hatékony intrapartum antibiotikum profilaxis érdekében [23,51,52]. Vizsgálataink során az erythromycin, illetve clindamycin rezisztens törzsek többsége korezisztensnek bizonyult e két antibiotikumra és konstitutív clindamycin rezisztenciát figyeltünk meg az esetek zömében.

5.3 A MALDI-TOF MS alkalmazása magas virulenciájú ST-1 és ST-17 *S. agalactiae* klónok kimutatására

Az ST-1 és ST-17 GBS szekvencia-típusok közismerten gyakran asszociáltak újszülöttkori meningitisszel és egyéb invazív neonatális infekciókkal [51]. A Lartigue és munkatársai [6] által leírt módszer ezen szekvencia-típusok MALDI-TOF MS alkalmazásával történő azonosítását teszi lehetővé [51]. A módszer izolált törzs MALDI-TOF tömegspektrumának elemzése során a fenti szekvencia-típusokra specifikus fehérje csúcsok jelenlétének detektálásán alapul. A korábbi vizsgálatok [6] során a módszer szenzitivitása 100%, specificitása 95% volt az ST-1 és 100%, valamint 98% az ST-17 típusú törzsek esetében. Az MS spektrum elemzésén alapuló rutin diagnosztikában alkalmazható ST-17 szűrés lehetősége a 2013-ban megrendezett európai GBS konszenzus konferencián is felmerült a *S. agalactiae* szűréssel és peripartum antibiotikummal kapcsolatos témakörben [23].

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az általunk analizált GBS tömegspektrumok közel felében (46,5%) detektálható volt olyan fehérje mintázat, amely az ST-1 (27,3%), vagy az ST-17 (19,2%) klónokra jellemző. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a potenciálisan

virulens és invazív GBS törzsek prevalenciája magas a mi régióinkban. Más tanulmányok szerint az ST-1 szekvencia-típusba tartozó törzsek a várandós nőket kolonizáló leggyakoribb GBS klónok közé tartoznak, a hüvely mintákból végzett GBS szűrések esetén a leggyakoribb klónok egyikének bizonyultak [51]. Eredményeink az ST-17 típus prevalenciáját is magasnak (19,2%) jelzik a *S. agalactiae*-vel kolonizált várandós nők körében. Egy közelmúltban született tanulmány szerint Szerbiában az ST-17 klónok bizonyultak a leggyakoribbnak az általuk vizsgált populációban [52]. Amellett, hogy az ST-1 klónok előfordulási gyakorisága magas, az erythromycin és clindamycin korezisztens ST-1 törzsek prevalenciája különösen magasnak bizonyult (az ST-1 törzsek 52,1%-a). Az ST-1 törzsek körében előforduló magas erythromycin-clindamycin rezisztencia szintet figyelték meg korábban Bergseng és munkatársai [56] is.

5.4 MALDI-TOF MS-alapú módszer kidolgozása methicillin-rezisztens *S. aureus* törzsek gyors kimutatására

Az MRSA szűréshez szükséges idő rövidítésére irányuló módszerek kidolgozása intenzíven kutatott terület [57]. Ezt a célt általában különféle fenotípusos tesztek kombinálásával érik el. Azonban az ilyen, a mintából történő direkt kimutatásra alkalmas módszerek általában meglehetősen szofisztikált hátteret igényelnek. Például Rees and Barr (58) módszere fág amplifikáció detektálásán alapul cefoxitin jelenlétében, illetve hiányában és ezt kombinálják tripszin emésztett fág fehérjék MALDI-TOF analízisével. Egy másik, eljárás [57] egy új aptameralapú fluorometriás assay klinikai mintákon történő alkalmazását használja immunomágneses szeparációval párosítva. Munkánk során egy egyszerű mintaelőkészítési módszert dolgoztunk ki, mely alkalmas az MRSA baktériumok közvetlenül a szelektív dúsító folyadékból történő MALDI-TOF MS azonosítására az ugyanazon üledékből végzett PBP2' latex agglutinációs teszt kombinációjával [37]. Mivel az általunk kidolgozott módszer pozitív prediktív értéke 100%-nak adódott, ez a MALDI-TOF MS és a PBP2' latex agglutinációs teszt kombinációján alapuló metodika hatékony alternatívája lehet a molekuláris technikáknak a *mecA*-pozitív MRSA törzsek szűréséhez szükséges idő lerövidítésére. Ezt a módszert alkalmazva az MRSA hordozás már 18-24 órával a minta levétele után megállapítható, további előnye, hogy könnyen beilleszthető a tenyésztésen alapuló laboratóriumi rutin MRSA-szűrés munkafolyamatába.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk célja az volt, hogy a MALDI-TOF MS módszer alkalmazásán alapuló, a *S. agalactiae* és methicillin-rezisztens *S. aureus* szűrések során alkalmazható új módszereket

dolgozzunk ki és ezeket értékeljük, valamint elemezzük a GBS szűrés során izolált *S. agalactiae* törzsek prevalenciáját és antibiotikum érzékenységi mintázatát. Főbb eredményeink a következők:

1. Várandós nők *S. agalactiae* szűrése során alkalmazható gyors MALDI-TOF MS-alapú GBS kimutatási módszer dolgoztunk ki. Le tudtuk rövidíteni a GBS kimutatásához szükséges időt a MALDI-TOF MS közvetlenül a GBS szelektív dúsító folyadékból történő kivitelezése által. A standard tenyésztésen alapuló GBS szűrési eljárás 2-3 napot vesz igénybe, az általunk kidolgozott eljárással a kolonizáció tényét már 18-24 órával a mintavétel után megállapíthatjuk.

2. 2012 és 2018 között laboratóriumunk által várandós nők körében végzett GBS szűrési eredmények összehasonlító elemzése során a GBS kolonizációs ráta 18,4%-nak adódott. Ez a kolonizációs szint illeszkedik az Európában mért adatokhoz. A kolonizáció mértéke valamennyi korcsoportban meghaladta a 10%-ot, a legmagasabb értékeket a 26-30 és 31-35 éves korcsoportban találtuk.

3. A várakozásoknak megfelelően a 2012-2018 közötti időszakban izolált valamennyi GBS törzs érzékeny volt β -laktám antibiotikumokra és vancomycinre. Az erythromycinre és clindamycinre rezisztens törzsek aránya viszonylag magasnak bizonyult: átlagosan 34,9% és 34,6% volt a vizsgált időszakban. Továbbá a rezisztens törzsek aránya egyértelműen növekedett és elérte a 40%-ot az utolsó két évben. Tudomásunk szerint ez a vizsgálat az első olyan elemzés a régióinkban, amely a várandós nők körében végzett GBS szűrési és antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredményeit összegzi. A makrolid és linkozamid típusú antibiotikumokkal szembeni rezisztencia előfordulásának magas aránya ismételten felhívja a figyelmet arra, hogy a GBS kolonizáció megállapításán túl szükség van a kolonizáló törzsek antibiotikum érzékenységének tesztelésére a megfelelő intrapartum antibiotikum profilaxis érdekében.

4. Várandós nők GBS szűrése során 2017-2018-ban izolált 260 *S. agalactiae* törzs MALDI-TOF tömegspektrumának elemzését végeztük el az invazív ST-1 és ST-17 GBS szekvencia-típusokra jellemző fehérjecsúcsok detektálása céljából. A vizsgált izolátumok között nagy arányban fordultak elő a magas virulenciájú típusok: ST-1 27,3%-ban, ST-17 19,2%-ban. Ismeretink szerint a magas virulenciájú ST-1 és ST-17 klónok előfordulási gyakoriságával kapcsolatos általunk közölt eredmények az első magyarországi adatok e témában. Eredményeink megerősítik a MALDI-TOF MS azonosítás értékét a *S. agalactiae* szűrésben és demonstrálják, hogy a MALDI-TOF tömegspektrum vizsgálata hatékony módszer a magas virulenciájú ST-1 és ST-17 GBS klónok azonosítására. Az általunk vizsgált populációban a

GBS-pozitív várandós nők közel fele bizonyult kolonizáltnak e magas virulenciájú klónokkal, ami ugyancsak kiemeli a minél alaposabb, korszerű módszereket alkalmazó és nemzetközi ajánlásokat figyelembe vevő GBS-szűrés jelentőségét.

5. MALDI-TOF MS-alapú alkalmazást dolgoztunk ki az MRSA gyors kimutatására közvetlenül a szelektív dúsító folyadékból. Módszerünk magában foglalja a MALDI-TOF MS identifikációhoz szükséges mintaelőkészítés optimalizálását és a PBP2' latex agglutinációs teszt alkalmazását az azonosított *S. aureus* törzsek methicillin rezisztenciájának kimutatására. Metodikánk előnye, hogy egyszerű, megbízható és könnyen beilleszthető a rutin mikrobiológiai diagnosztikában alkalmazott MRSA-szűrés munkafolyamatába. Az általunk kidolgozott eljárás szenzitivitása és specifitása összemérhető más, komplexebb technikákéval, alkalmazásával a standard tenyésztésen alapuló MRSA szűréshez szükséges 2-3 nap 18-24 órára csökkenthető.

IRODALOJEGYZÉK

1. Maier, T., Klepel, S., Renner, U., *et al.* (2006) Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nature Methods* 3, i-ii.
2. Patel, R. (2013) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin Infect Dis* 57, 564-572.
3. Schulthess, B., Bloemberg, G.V., Zbinden, R., *et al.* (2014) Evaluation of the Bruker MALDI biotyper for identification of gram-positive rods: development of a diagnostic algorithm for the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 52, 1089-1097.
4. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K., *et al.* (2015) MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol* 6, 791.
5. Verroken, A., Janssens, M., Berhin, C., *et al.* (2010) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol* 48, 4015-4021.
6. Lartigue, M.F., Kostrzewa, M., Salloum, M., *et al.* (2011) Rapid detection of "highly virulent" Group B Streptococcus ST-17 and emerging ST-1 clones by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 86, 262-265.
7. Kostrzewa, M., Sparbier, K., Maier, T., *et al.* (2013) MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics Clin Appl* 7, 767-778.
8. Christner, M., Trusch, M., Rohde, H., *et al.* (2014) Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One* 9, e101924.
9. Welker, M., Van Belkum, A., Girard, V., *et al.* (2019) An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology. *Exp Rev Proteomics* 16, 695-710.
10. Furfaro, L.L., Chang, B.J., Payne, M.S. (2018) Perinatal *Streptococcus agalactiae* epidemiology and surveillance targets. *Clin Microbiol Rev* 31, e00049-18.
11. Brimil, N., Barthell, E., Heindrichs, U., *et al.* (2006) Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. *Int J Med Microbiol* 296, 39-44.
12. Melin, P. (2011) Neonatal group B streptococcal disease: from pathogenesis to preventive strategies. *Clin Microbiol Infect* 17, 1294-1303.
13. Caliot, É., Dramsi, S., Chapot-Chartier, M.P., *et al.* (2012) Role of the group B antigen of *Streptococcus agalactiae*: a peptidoglycan-anchored polysaccharide involved in cell wall biogenesis. *PLoS Pathog* 8, e1002756.
14. Le Doare, K., Kampmann, B. (2014) Breast milk and Group B streptococcal infection: vector of transmission or vehicle for protection? *Vaccine* 32, 3128-3132.
15. Teatero, S., Ferrieri, P., Martin, I., *et al.* (2017) Serotype distribution, population structure, and antimicrobial resistance of group B Streptococcus strains recovered from colonized pregnant women. *J Clin Microbiol* 55, 412-422.

16. Florindo, C., Damiao, V., Silvestre, I., *et al.* (2014) Epidemiological surveillance of colonising group B *Streptococcus* epidemiology in the Lisbon and Tagus Valley regions, Portugal (2005 to 2012): emergence of a new epidemic type IV/clonal complex 17 clone. *Euro Surveill* 19, 20825.
17. Alhhazmi, A., Hurteau, D., Tyrrell, G.J. (2016) Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in Alberta, Canada, from 2003 to 2013. *J Clin Microbiol* 54, 1774-1781.
18. Lartigue, M.F., Héry-Arnaud, G., Haguenoer, E., *et al.* (2009) Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 47, 2284-2287.
19. Da Cunha, V., Davies, M.R., Douarre, P.E., *et al.* (2014) *Streptococcus agalactiae* clones infecting humans were selected and fixed through the extensive use of tetracycline. *Nature Commun* 5, 4544.
20. Salloum, M., van der Mee-Marquet, N., Valentin-Domelier, A.S., *et al.* (2011) Diversity of prophage DNA regions of *Streptococcus agalactiae* clonal lineages from adults and neonates with invasive infectious disease. *PLoS One* 6, e20256.
21. Centers for Disease Control and Prevention (2010) Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease, 2010. Revised Guidelines from CDC. *MMWR* 59 (RR-10), 1-36.
22. Cherkaoui, A., Emonet, S., Fernandez, J., *et al.* (2011) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid identification of beta-hemolytic streptococci. *J Clin Microbiol* 49, 3004-3005.
23. Di Renzo, G.C., Melin, P., Berardi, A., *et al.* (2015) Intrapartum GBS screening and antibiotic prophylaxis: a European consensus conference. *J Matern-Fetal Neonat Med* 28, 766-782.
24. Capanna, F., Emonet, S.P., Cherkaoui, A., *et al.* (2013) Antibiotic resistance patterns among group B *Streptococcus* isolates: implications for antibiotic prophylaxis for early-onset neonatal sepsis. *Swiss Med Wkly* 143, w13778.
25. Marlowe, E.M., Bankowski, M.J. (2011) Conventional and molecular methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 49(S), S53-S56.
26. Peacock, S.J., Paterson, G.K. (2015) Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Biochem* 84, 577-601.
27. Katayama, Y., Ito, T., Hiramatsu, K. (2000) A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 1549-1555.
28. Kos, V.N., Desjardins, C.A., Griggs, A., *et al.* (2012) Comparative genomics of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their positions within the clade most commonly associated with methicillin-resistant *S. aureus* hospital-acquired infection in the United States. *mBio* 3, e00112-12.
29. Romero-Gómez, M.P., Quiles-Melero, I., Navarro, C., *et al.* (2012) Evaluation of the BinaxNOW PBP2a assay for the direct detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles. *Diagn Microbiol Infect Dis* 72, 282-284.
30. Safdar, N., Narans, L., Gordon, B., *et al.* (2003) Comparison of culture screening methods for detection of nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a prospective study comparing 32 methods. *J Clin Microbiol* 41, 3163-3166.
31. Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., *et al.* (2012) MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 965-974.
32. Østergaard, C., Hansen, S.G., Møller, J. K. (2015) Rapid first-line discrimination of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains using MALDI-TOF MS. *Int J Med Microbiol* 305, 838-847.
33. Wolk, D.M., Marx, J.L., Dominguez, L., *et al.* (2009) Comparison of MRSASelect Agar, CHROMagar Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Medium, and Xpert MRSA PCR for detection of MRSA in Nares: diagnostic accuracy for surveillance samples with various bacterial densities. *J Clin Microbiol* 47, 3933-3936.
34. Matuschek, E., Brown, D.F., Kahlmeter, G. (2014) Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 20, O255-O266.
35. Ábrók, M., Arcson, Á., Lázár, A., *et al.* (2015) Combination of selective enrichment and MALDI-TOF MS for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* colonisation of pregnant women. *J Microbiol Methods* 114, 23-25.
36. Ábrók, M., Tigyi, P., Kostrzewa, M., *et al.* (2020) Evaluation of the results of group B streptococcus screening by MALDI-TOF MS among pregnant women in a Hungarian hospital. *Pathogens* 9, 1.
37. Ábrók, M., Lázár, A., Szécsényi, M., *et al.* (2018) Combination of MALDI-TOF MS and PBP2' latex agglutination assay for rapid MRSA detection. *J Microbiol Methods* 144, 122-124.
38. Nakatomi, Y., Sugiyama, J. (1998) A rapid latex agglutination assay for the detection of penicillin-binding protein 2'. *Microbiol Immunol* 42, 739-743.

39. Virók, D.P., Ábrók, M., Szél, B., *et al.* (2014) *Chryseobacterium gleum* - a novel bacterium species detected in neonatal respiratory tract infections. *J Matern-Fetal Neonat Med* 27, 1926-1929.
40. Nagy, E., Ábrók, M., Urbán, E., *et al.* (2017) Transformation of anaerobic microbiology since the arrival of MALDI-TOF mass spectrometry. In: Shah HN, Garbia SE (eds.), *MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology*. John Wiley & Sons, New York, USA, pp. 123-146.
41. Schrag, S.J., Verani, J.R. (2013) Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine. *Vaccine* 31, D20-D26.
42. Byliński, H., Gębicki, J., Dymerski, T., *et al.* (2017) Direct analysis of samples of various origin and composition using specific types of mass spectrometry. *Crit Rev Anal Chem* 47, 340-358.
43. Tré-Hardy, M., Lambert, B., Despas, N., *et al.* (2017) MALDI-TOF MS identification and antimicrobial susceptibility testing directly from positive enrichment broth. *J Microbiol Methods* 141, 32-34.
44. Sparbier, K., Weller, U., Boogen, C., *et al.* (2012) Rapid detection of *Salmonella* sp. by means of a combination of selective enrichment broth and MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 767-773.
45. Jadhav, S., Seviar, D., Bhave, M., *et al.* (2014) Detection of *Listeria monocytogenes* from selective enrichment broth using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J Proteom* 97, 100-106.
46. Kohlmann, R., Hoffmann, A., Geis, G., *et al.* (2015) MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *Int J Med Microbiol* 305, 469-479.
47. Verroken, A., Defourny, L., le Polain de Waroux, O., *et al.* (2016) Clinical impact of MALDI-TOF MS identification and rapid susceptibility testing on adequate antimicrobial treatment in sepsis with positive blood cultures. *PLoS One* 11, e0156299.
48. Curtoni, A., Cipriani, R., Marra, E.S., *et al.* (2017) Rapid identification of microorganisms from positive blood culture by MALDI-TOF MS after short-term incubation on solid medium. *Curr Microbiol* 74, 97-102.
49. Chew, R., Otome, O., Harris, O., *et al.* (2019) Rapid micro-organism identification from blood and enrichment fluid cultures using MALDI-TOF mass spectrometry following abbreviated incubation on chocolate agar plates in a high-throughput regional microbiology laboratory. *Infect Dis* 51, 312-316.
50. Oviano, M., Rodríguez-Sánchez, B., Gomara, M., *et al.* (2018) Direct identification of clinical pathogens from liquid culture media by MALDI-TOF MS analysis. *Clin Microbiol Infect* 24, 624-629.
51. Shabayek, S., Spellerberg, B. (2018) Group B streptococcal colonization, molecular characteristics, and epidemiology. *Front Microbiol* 9, 437.
52. Gajic, I., Plainvert, C., Kekic, D., *et al.* (2019) Molecular epidemiology of invasive and non-invasive group B *Streptococcus* circulating in Serbia. *Int J Med Microbiol* 309, 19-25.
53. De Francesco, M.A., Caracciolo, S., Gargiulo, F., *et al.* (2012) Phenotypes, genotypes, serotypes and molecular epidemiology of erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, 1741-1747.
54. Morozumi, M., Wajima, T., Kuwata, Y., *et al.* (2014) Associations between capsular serotype, multilocus sequence type, and macrolide resistance in *Streptococcus agalactiae* isolates from Japanese infants with invasive infections. *Epidemiol Infect* 142, 812-819.
55. Capraro, G.A., Rambin, E.D., Vanchiere, J.A., *et al.* (2013) High rates of inducible clindamycin resistance among prenatal group B streptococcal isolates in one northwest Louisiana academic medical center. *J Clin Microbiol* 51, 2469.
56. Bergseng, H., Afset, J.E., Radtke, A., *et al.* (2009) Molecular and phenotypic characterization of invasive group B streptococcus strains from infants in Norway 2006-2007. *Clin Microbiol Infect* 15, 1182-1185.
57. Qiao, J., Meng, X., Sun, Y., *et al.* (2018) Aptamer-based fluorometric assay for direct identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical samples. *J Microbiol Methods* 153, 92-98.
58. Rees, J.C., Barr, J.R. (2017) Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using phage amplification combined with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 409, 1379-1386.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertáció alapját képező közlemények

- I. **Ábrók M,** Tigyi P, Kostrzewa M, Burián K, Deák J (2020) Evaluation of the results of group B streptococcus screening by MALDI-TOF MS among pregnant women in a Hungarian hospital. *PATHOGENES* 9: 1. **IF: 3.405**

- II. **Ábrók M**, Lázár A, Szécsényi M, Deák J, Urbán E (2018) Combination of MALDI-TOF MS and PBP2' latex agglutination assay for rapid MRSA detection. *JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS* 144: 122-124. **IF: 1.701**
- III. **Ábrók M**, Arcson Á, Lázár A, Urbán E, Deák J (2015) Combination of selective enrichment and MALDI-TOF MS for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* colonisation of pregnant women. *JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS* 114: 23-25. **IF: 1.857**
- IV. Virók DP, **Ábrók M**, Szél B, Tajti Zs, Mader K, Urbán E, Tálosi Gy (2014) *Chryseobacterium gleum* - a novel bacterium species detected in neonatal respiratory tract infections. *JOURNAL OF MATERNAL-FETAL & NEONATAL MEDICINE* 27: 1926-1929. **IF: 1.367**
- V. Nagy E, **Ábrók M**, Bartha N, Bereczki L, Juhász E, Kardos G, Kristóf K, Miszti C, Urbán E (2014) Mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésen alapuló tömegspektrometria speciális alkalmazása a klinikai mikrobiológiai diagnosztika területén *ORVOSI HETILAP* 155: 1495-1503. (in Hungarian) **IF: -**

A disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények

- I. Gajdács M, **Ábrók M**, Lázár A, Terhes G, Urbán E (2020) Anaerobic blood culture positivity at a University Hospital in Hungary: A 5-year comparative retrospective study. *ANAEROBE* 63: 102200. **IF: 2.704**
- II. Gajdács M, Bátor Z, **Ábrók M**, Lázár A, Burián K (2020) Characterization of resistance in Gram-negative urinary isolates using existing and novel indicators of clinical relevance: a 10-year data analysis. *LIFE* 10: 16. **IF: -**
- III. Gajdács M, **Ábrók M**, Lázár A, Burián K (2019) Széles spektrumú béta-laktamáz-termelő (ESBL) húgyúti patogének kezelési lehetőségei: tapasztalatok a SZTE Szent-Györgyi Albert Klinikai Központban. *GYÓGYSZERÉSZET* 63: 405-411. **IF: -**
- IV. Gajdács M, **Ábrók M**, Lázár A, Burián K (2019) Comparative epidemiology and resistance trends of common urinary pathogens in a tertiary-care hospital: a 10-year surveillance study. *MEDICINA-LITHUANIA* 55: 356. **IF: 1.467**
- V. Gajdács M, Dóczi I, **Ábrók M**, Lázár A, Burián K (2019) Epidemiology of candiduria and *Candida* urinary tract infections in inpatients and outpatients: results from a 10-year retrospective survey. *CENTRAL EUROPEAN JOURNAL OF UROLOGY* 72: 209-214. **IF: -**
- VI. Gajdács M, **Ábrók M**, Lázár A, Burián K (2019) Microbiology of urine samples obtained through suprapubic bladder aspiration: a 10-year epidemiological snapshot. *DEVELOPMENTS IN HEALTH SCIENCES* 2: 76-78. **IF: -**
- VII. Tóth EJ, Nagy GR, Homa M, **Ábrók M**, Kiss IÉ, Nagy G, Bata-Csörgő Z, Kemény L, Urbán E, Vágvölgyi C, Papp T (2017) Recurrent *Scedosporium apiospermum* mycetoma successfully treated by surgical excision and terbinafine treatment: a case report and review of the literature. *ANNALS OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND ANTIMICROBIALS* 16: 31. **IF: 3.155**
- VIII. Fenyvesi VS, Urbán E, Bartha N, **Ábrók M**, Kostrzewa M, Nagy E, Minárovits J, Sóki J (2014) Use of MALDI-TOF/MS for routine detection of *cfiA* gene-positive *Bacteroides fragilis* strains. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS* 44: 474-475. **IF: 4.296**
- IX. Kele B, **Ábrók M**, Deák J (2009) Sporadic norovirus infections among hospitalized and non-hospitalized 0-3-year-old infants. *SCANDINAVIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES* 41: 67-69. **IF: 1.700**

Kumulatív IF: 21.652

A disszertáció témájához kapcsolódó könyvfejezet

- I. Nagy E, **Ábrók M**, Urbán E, Veloo ACM, Winkelhoff AJ, Dekio I, Gharbia SE, Shah HN (2017) Transformation of Anaerobic Microbiology since the Arrival of MALDI-TOF Mass Spectrometry In: Shah HN, Garbia SE (eds.) MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology. New York: Wiley, pp. 123-146. (ISBN:9781118960257)

A disszertáció témájához kapcsolódó konferencia előadások, poszterek

- I.** **Ábrók M**, Tigyi P, Kostrzewa M, Lange C, Lázár A, Urbán E, Deák J (2018) Prevalence of *Streptococcus agalactiae* ST-17 and ST-1 clones detected by MALDI-TOF MS in pregnant women in a Hungarian hospital. In: ESCMID 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Paper P0808. (Madrid, Spain: 21.04.2018-24.04.2018)
- II.** **Ábrók M**, Lázár A, Szécsényi M, Urbán Edit (2016) Application of MALDI-TOF MS combined with PBP2' latex agglutination test for MRSA screening In: ESCMID 2016: 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Paper EV0526. (Amsterdam, The Netherlands: 09.04.2016-12.04.2016)
- III.** **Ábrók M**, Kostrzewa M, Lange C, Lázár A, Urbán E, Deák J (2016) Magas virulenciájú *Streptococcus agalactiae* ST-17 és ST-1 klónok kimutatása MALDI-TOF MS alkalmazásával várandós nők szűrése során. In: A Magyar STI Társaság XXI. Nagygyűlése, X. Venerológiai Továbbképző Tanfolyama és 30th IUSTI Europe Conference: Program and Abstract. p. 40. (Budapest, Hungary: 14.09.2016-17.09.2016) (*in Hungarian*)
- IV.** Szécsényi M, Lázár A, Sárvári KP, **Ábrók M**, Urbán E (2017) MRSA epidemiology: what happened in the southern part of Hungary since 2011? *ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA* 64:(Suppl. 1) 81-82. Annual Meeting of the Hungarian Society for Microbiology. (Budapest, Hungary: 19.10.2016-21.10.2016)
- V.** **Ábrók M**, Kostrzewa M, Lange C, Lázár A, Urbán E, Deák J (2016) Application of MALDI-TOF MS for detection of highly virulent *Streptococcus agalactiae* ST-17 and ST-1 clones in Group B *Streptococcus* screening of pregnant women *CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE* 54:(10) eA194. (Szeged, Hungary: 25.08.2016-27.08.2016)
- VI.** **Ábrók M**, Arcson Á, Lázár A, Urbán E, Deák J (2014) MALDI-TOF MS in *Streptococcus agalactiae* screening of pregnant women. In: Drancourt M, Raoult D (eds.) 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Paper eP482. (Barcelona, Spain: 10.05.2014-13.05.2014)
- VII.** **Ábrók M**, Urbán E, Lázár A, Deák J (2011) Screening of pregnant women for *Streptococcus agalactiae* between 2008 and 2010. In: Várkonyi V, Tisza T (eds.) A Magyar STD Társaság XVI. Nagygyűlése, V. Venerológiai Továbbképző Tanfolyama, XVII. Alpok-Duna-Adria STD és Genitalis Dermatológiai Konferencia. pp. 79-80. (Budapest, Hungary: 17.11.2011-19.11.2011) (*in Hungarian*)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek Prof. Emer. Dr. Deák Juditnak, munkám során nyújtott támogatásáért és értékes tanácsaiért.

Köszönöm Dr. Burián Katalinnak, a Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai és az Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet vezetőjének, valamint Prof. Dr. Urbán Editnek, a Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet korábbi vezetőjének, hogy doktori munkámat az intézetben lehetővé tették és mindvégig támogatták.

Hálás vagyok Prof. Emer. Dr. Nagy Erzsébetnek folyamatos támogatásáért és sokrétű segítségéért, valamint a publikációim elkészítése során adott tanácsaiért és javaslataiért.

Köszönet illeti Dr. Markus Kostrzewát a MALDI-TOF MS alkalmazása során nyújtott tanácsaiért és segítségéért.

Köszönettel tartozom kollégáimnak, Dr. Lázár Andreának, Ocskóné Kis Edinának, Szappanos Edinának, Komjáti Editnek, Batki Szilviának, Tóth Zsuzsannának, Balogné Horváth Anitának, Deák Tündének, Redetzky Andreának, Marincusné Karasz Erikának, Zsótér Mónikának, valamint hallgatóimnak, Arcson Ágnesnek és Tigyi Petrának, akik segítettek az izolátumok és az adatok összegyűjtésében, részt vettek a vizsgálatokban, vagy közreműködtek a MALDI-TOF MS identifikációban.

Köszönöm a Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet minden munkatársának segítő együttműködését, türelmét és támogatását.

Hálás vagyok szüleimnek és gyermekeimnek szeretetükért és az évek során nyújtott támogatásukért.

Köszönöm férjemnek, Prof. Dr. Papp Tamásnak értékes tanácsait és feltétlen támogatását, türelmét és szeretetét.