

**Hazai invazív mintákból származó,
multirezisztens *Escherichia coli* ST131
törzsek összehasonlítása és molekuláris
vizsgálata**

Doktori tézisek
Tóth Kinga

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szabó Dóra, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Zsoldiné Dr. Urbán Edit, DSc, egyetemi tanár

Dr. Kenesei Éva, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Törő Klára, DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Kiss András, DSc, egyetemi tanár

Dr. Csire Márta, Ph.D., laboratórium vezető

Budapest
2024

1. Bevezetés

Az antimikrobiális szerekkel szemben rezisztens kórokozók növekvő száma, különösen a multidrog-rezisztens (MDR) organizmusok által okozott fertőzések, jelentős betegségterhet (magas morbiditási és mortalitási arányokat) jelentenek, súlyosan terhelik az egészségügyi rendszereket, és e fertőzések kezelésére és megelőzésére irányuló intézkedések globális gazdasági költségei is jelentősek.

Az *Escherichia coli* (*E. coli*) az egyik leggyakrabban előforduló baktérium, amely az emberi bélmikrobióta természetes tagja. Bár a legtöbb *E. coli* törzs fontos szerepet játszik a bélrendszer egészségében, bizonyos törzsek, mint például az extraintestinális patogén *E. coli* (ExPEC) törzsek, számos humán fertőzésért felelősek (pl: véráramfertőzés, húgyúti fertőzés, tüdőgyulladás és újszülött kori agyhártyagyulladás). Az ExPEC fertőzések kezelése a növekvő antibiotikum rezisztencia miatt egyre nagyobb kihívást jelent. A 2010-es évek közepére a multidrog-rezisztens baktériumok közül a harmadik

generációs cefalosporin-rezisztens (3GCR) *E. coli* okozta megbetegedések terhe nőtt a legnagyobb mértékben a fertőzések és a halálesetek számát tekintve Európában. Ebben jelentős szerepet játszott az ST131 magas kockázatú klón fluorokinolonokkal és a legtöbb β -laktám antibiotikummal szemben rezisztens C/H30 kládjának globális elterjedése. A C klád két alkládból áll, és mindkettőben van egy-egy jellegzetes multidrug-rezisztens változat: a C2/H30Rx-ba tartozó izolátumok főként a *bla*_{CTX-M-15} ESBL-gént hordozzák, míg a C1/H30R-ba tartozó C1-M27 izolátumok a *bla*_{CTX-M-27-t}. Ezek a gének felelősek a kiterjedt spektrumú β -laktamázok (ESBL) termeléséért, amelyek képesek lebontani a széles spektrumú cefalosporinokat. Az antibiotikum rezisztenciája, virulenciája és globális elterjedése miatt is az MDR ST131 az egyik legjelentősebb magas kockázatú klón jelenleg a világon.

Az ST131 klón esetében a mobilis genetikai elemek (pl. az inszerciós elemek (IS), kompozit transzpozonok, plazmidok), kulcsszerepet játszanak a rezisztencia gének terjedésében. Az ST131 klónban az ESBL-gének

elsősorban IncF plazmidokon találhatóak meg: míg a C2/H30Rx alkládot az F2:A1:B- plazmid, addig a C1-M27 alkládot az F1:A2:B20 plazmid jellemzi.

Az Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központ (NNGYK) adatai szerint Magyarországon 2014-óta az invazív mintából izolált ESBL-termelő *E. coli* izolátumok közel felét az ST131 tette ki.

2. Célkitűzések

Munkám során a népegészségügyi szempontból kiemelkedő jelentőségű *E. coli* ST131 izolátumainak részletes jellemzése volt a célom, beleértve a fenotípusos és genotípusos elemzésüket, valamint populációs struktúrájuk vizsgálatát.

Ehhez az alábbi célokat tűztem ki:

- 1, Egy prospektív, monocentrikus felmérés keretében gyűjtött invazív mintákból származó harmadik generációs cefalosporin-rezisztens *E. coli* izolátumok molekuláris epidemiológiai jellemzése.

2, 2015-2018 között, illetve 2021-ben izolált, hazai invazív mintákból származó multirezisztens C2/H30Rx és C1-M27 alkládokba tartozó reprezentatív magyar törzskollekció populáció szerkezetének feltérképezése genomikai módszerekkel: genotípus, fenotípus, mobilis genetikai elemek jellemzése.

3, Karbapenemáz-termelő *E. coli* ST131 izolátumok összehasonlítása korábbi hazai ESBL-termelő *E. coli* ST131 törzsekkel, illetve a rezisztencia géneket hordozó mobilis genetikai elemek jellemzése és összevetése Magyarországon elterjedt más karbapenemáz-termelő izolátumokéval.

3. Módszerek

3.1. Felhasznált baktériumtörzsek

A prospektív, monocentrikus vizsgálatba bevontuk a Dél-Pesti Centrumkórház, 2018. október-november között, invazív mintákból származó *E. coli* izolátumok közül az ESBL-termelő törzseket.

A retrospektív vizsgálathoz az invazív mintákból származó, országos helyzetet bemutató 63 reprezentatív *E. coli* ST131 izolátumot (30 db C2/H30Rx és 33 db C1-M27 alkládhoz tartozót) választottunk ki, amely 21 egészségügyi intézményből, 2015-2018 és 2021 évekből származott.

Az 2018-2023 közötti időszakra vonatkozó vizsgálatba bevontuk a karbapenemáz-termelő *E. coli* izolátumok közül az összes ST131 izolátumot.

3.2. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok

Az antibiotikum érzékenység meghatározását korongdiffúziós, MIC gradiens tesztcsíkos és mikrolevess hígítási módszerrel végeztük el az EUCAST aktuális ajánlásai alapján.

3.3. Molekuláris vizsgálatok

A ST131 specifikus multiplex PCR módszert alkalmaztuk az ST131 kládjainak, valamint a C1-M27 és C2 alkládjainak kimutatására. Majd a genominális DNS

kivonását és génkönyvtár elkészítését követően az összes izolátumot Illumina MiSeq platformon (2x150 bp pair-end, short-read szekvenálással) szekvenáltuk meg. A nyers DNS szekvencia adatok feldolgozását az EnteroBase pipeline segítségével végeztük el. Reprezentatív kiválasztott izolátumokat MinION Mk1C (Oxford Nanopore, long-read) platformon szekvenáltuk meg. A nyers long-read adatok feldolgozását a GalaxyEU online eszközkészlet segítségével végeztük el.

3.4. Izolátumok filogenomikai rekonstrukciója és klaszterezése

Az izolátumok core-genom rekonstrukciójához és összehasonlításához Panaroo-t használtunk, a filogenetikai kapcsolatok rekonstrukciójához pedig az IQtree-t. A fastBAPS R csomagot használtuk a populáció struktúrában levő klaszterek azonosítására. A prospektív és karbapenem rezisztens izolátumok vizsgálatában szereplő izolátumok esetén a lehetséges klonális kapcsolatokat core genom (cg)MLST (SeqSphere+) segítségével vizsgáltuk.

3.5. Virulencia és antibiotikum rezisztencia gének elemzése

Az antibiotikum rezisztencia géneket a ResFinder CGE (Center for Genomic Epidemiology) online eszközökkel azonosítottuk. A virulencia géneket a VirulenceFinder és a Virulence Factors Database (VFDB a SeqSphere+) online eszközök segítségével elemeztük. A *bla*_{CTX-M} és genetikai környezetének szekvencia homológia összehasonlításához és vizualizálásához a Clinker programot használtuk.

3.6. Plazmid szekvenciák jellemzése

A plazmid replikonokat, típusokat PlasmidFinder vizsgáltuk, a plazmid MLST-t a pMLST programmal határoztuk meg, amivel megkaptuk a plazmidok szekvencia típusát. A további mobilis genetikai elemek azonosításához a MGE online eszközt használtuk. A plazmid szekvenciák összehasonlításához és vizualizálásához a BRIG és Clinker programokat használtuk.

3.7. Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzéshez a Fisher-féle egzakt tesztet végeztünk. Minden egyes összehasonlításnál a $p < 0,05$ értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

A prospektív monocentrikus vizsgálat során az *E. coli* okozta invazív fertőzések incidenciáját illetve incidencia sűrűségét 1000 kórházi felvételre, illetve 1000 betegnapra számítottuk ki.

4. Eredmények

4.1. Egy prospektív, monocentrikus felmérés keretében gyűjtött *Escherichia coli* izolátumok vizsgálata, 2018. október-november

A vizsgálati időszakban kitenyészett 25 *E. coli* izolátumból hat (24%) bizonyult rezisztensnek a harmadik generációs cefalosporinokkal szemben: Ec1-Ec6. A 3GCR *E. coli* incidencia sűrűsége 0,11 volt 1000 betegnapra viszonyítva, míg az 1000 kórházi felvételre számított incidencia 0,79 volt. A vizsgált izolátumokat az MLST

alapján két szekvencia típusba soroltuk: egy izolátum az ST1193-hoz, öt izolátum (Ec1-Ec5) a globálisan domináns ST131 klónhoz (O25:H4 szerotípus) tartozott. Az Ec1, Ec2, Ec3 izolátumok az ST131 C2/H30Rx alkládjába tartoztak, az Ec4, Ec5 izolátumok a C1-M27 alkládba. A három C2/H30Rx alkládba tartozó *E. coli* ST131 izolátum szoros genetikai rokonságot mutatott.

4.2. Retrospektív, multicentrikus vizsgálat a C2/H30Rx és C1-M27 ST131 izolátumok populáció struktúrájának feltérképezésére, 2015-2018, 2021

Mind a 63 izolátum rezisztensnek bizonyult a ceftriaxonnal és a ciprofloxacinnal szemben. A C2/H30Rx izolátumok szignifikánsan magasabb rezisztencia arányt mutattak a ceftazidimmal, amikacinnal, tobramycinnal és gentamicinnel szemben, mint a C1-M27 izolátumok. Két C1-M27 izolátum rezisztensnek bizonyult colistinnel szemben. Az izolátumok érzékenyek bizonyultak ceftazidim/avibactammal, és karbapenemekkel szemben.

A két alkládban összesen 63 féle virulencia gént és 29 féle antibiotikum rezisztencia gént mutattuk ki. A C1-M27

izolátumok mindegyike hordozta a *bla*_{CTX-M-27}-et és C virotípusa volt. A *traT* szerum rezisztencia gén, *senB*, *mcbA*, *pic* toxin gének és néhány antibiotikum rezisztencia gén (*bla*_{CTX-M-27}, *sul2*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *mph(A)*) szignifikánsan gyakoribb volt a C1-M27 izolátumokban, mint a C2/H30Rx izolátumokban ($p < 0,05$). Néhány adhezín (*afa* operon, *nfaE*, *pap* operon), toxin (*cnf1*, *hly* operon, *aslA*), invazín (*daaA-F*, *draA-D*) és a *hra* protectin virulencia gén, valamint néhány rezisztencia gén (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrB19*, *catB3*) csak a C2/H30Rx izolátumokban volt jelen ($p < 0,01$). Az *aac(3)-IIa* nagyobb gyakorisággal fordult elő a C2/H30Rx alklád izolátumai között mint a C1-M27 izolátumoknál (26,7% vs. 6,1%, $p < 0,05$). A C2 alklád 30 izolátumából hatnál az A virotípus, egynél a B virotípus és 23-nál a C virotípust találtuk.

A C1-M27 izolátumokat egy (klaszter A), míg a C2/H30Rx izolátumokat öt klaszterbe (klaszter B-F) tudtuk besorolni. A C1-M27 izolátumok 18 egészségügyi intézményből származtak. A fő plazmid replikon típus az IncF (33/33), és a leggyakoribb FAB-formula a

F1:A2:B20 volt (31/33). A C2/H30Rx alklád izolátumait 15 egészségügyi intézményből küldték be: két izolátum 2015-ből, kettő 2016-ból, három 2017-ből, öt 2018-ból és 18 izolátum 2021-ből. A fő plazmid replikon típus az IncF (28/30), és a leggyakoribb FAB-formula az F31/F36:A4:B1 (10/30) volt és ezt követte az F2:A1:B-(6/30).

Tizenegy C1-M27 izolátum vizsgálata alapján a *bla*_{CTX-M-27} gén egy kópiában, minden esetben plazmidon helyezkedett el, és a közvetlen genetikai környezetében lévő rezisztencia génekkel együtt három féle kompozit transzpozont (régiók) lehetett megkülönböztetni: I. régió a IS6-*bla*_{CTX-M-27}-IS6; II. régió a IS6-*tetA-aph(6)-Id-aph(3'')*-*Ib-sul2*-IS6; III. régió a IS6-*dfrA17-aadA5-qacEΔ1-sul1-mph(A)*-IS6 génekből állt.

Tizenkilenc C2/H30Rx izolátum vizsgálata alapján elmondhatjuk, hogy a *bla*_{CTX-M-15} csak egyetlen esetben, egy 2015-ből származó izolátumnál volt plazmidon (F2:A1:B-) megtalálható. A többi 18 izolátumban a *bla*_{CTX-M-15} az *ISEcp1* (n=7) vagy IS26 (n=11) inszerciós

elemekhez kapcsolódva a kromoszómába integrálódott. A *bla*_{CTX-M-15} gén 14 esetben egy kópiában fordult elő (13 kromoszális, egy plazmid lokalizáció), négy esetben két kópiában fordult elő (kromoszómálisan, ugyanabba a klaszterbe tartoztak) és egy esetben három kópiában fordult elő (kromoszómálisan).

A *bla*_{CTX-M-15} genetikai környezete és a hozzá kapcsolódó IS elemek alapján 10 csoportot (*A-I csoport*) tudunk elkülöníteni, amelyek az antibiotikum rezisztencia gének különböző transzpozonjaiból (szegmensek) állnak: 1. szegmenst az *ISEcp1-bla*_{CTX-M-15} vagy *IS26-bla*_{CTX-M-15} alkotta. Ezt követhette egy második szegmens: *IS26-ΔcatB3-bla*_{OXA-1}-*aac*(6')-*Ib-cr-IS26* vagy *IS26-aac*(3)-*IIa-IS26*, amit további 3-4. szegmens követhetett: *IS26-ΔcatB3-bla*_{OXA-1}-*aac*(6')-*Ib-cr-IS26*.

4.3. Karbapenemáz-termelő *Escherichia coli* ST131 izolátumok, 2023

2023-ban azonosítottunk először karbapenemáz-termelő *E. coli* ST131 izolátumokat hazánkban: egy NDM-1 és

CTX-M-27-termelő izolátumot (CE9), és egy OXA-244 és CTX-M-15-termelő izolátumot (CE35).

A két izolátum antibiotikum érzékenysége jelentős különbséget mutatott: míg a CE9 rezisztensenk bizonyult a cefalosporinok mellett a vizsgált karbapenemekre (ertapenem, meropenem, imipenem), aminoglikozidokra és flourokinolonokra, addig a CE35 ezzel szemben cefalosporinokon kívül a ciprofloxacinnra a karbapenemek közül csak az ertapenemre volt rezisztens.

A cgMLST vizsgálat alapján a *bla*_{NDM-1}-hordozó CE9 izolátum a C1-M27 alklád korábban azonosított klaszterébe tartozott, és őt, a retrospektív vizsgálatba bevont *E. coli* izolátummal mutatott szorosabb genetikai rokonságot. A *bla*_{OXA-244}-hordozó CE35 izolátum az ST131 A kládjába tartozott.

A CE9 izolátumban mind a *bla*_{CTX-M-27}, mind a *bla*_{NDM-1} az alkládra jellemző F1:A2:B20 plazmidon volt megtalálható. A plazmidon azonosított öt kompozit transzpozonból három megegyezett a *bla*_{CTX-M-27} termelő izolátumok plazmidjánál leírt régió I-III-al, míg a másik

kettő (*IS6-armA-msr(E)-mph(E)-IS6* és *IS6-qnrS1-aph(3')-VI-bla_{NDM-1}-IS6*) megegyezett a CE9-cel azonos évben és ugyanabban az egészségügyi intézményben izolált három NDM-1-termelő *Klebsiella pneumoniae* izolátum plazmidján található kompozit transzpozonokkal.

A CE35 esetében a *bla_{CTX-M-15}* (két kópiában, *ISEcp1*-hez társulva) és a *bla_{OXA-244}* gén (*IS1-bla_{OXA-244}-DmlR-IS1* kompozit transzpozonon) is a kromoszómán helyezkedtek el, míg több más rezisztencia gén plazmidon volt jelen.

5. Következtetések

1. A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a 2018 októbere és novembere között egy budapesti kórházban véráramfertőzésből izolált invazív *E. coli*-k 24%-a ESBL-termelőnek bizonyult. Már ez a rövid távú vizsgálat is az ST131 dominanciáját mutatta, és azt, hogy mindkét C alkád jelen volt ebben az időszakban. A vizsgálat során sikerült azonosítanunk először az ST1193 hazai jelenlétét, amit külföldön már számos helyen leírtak. Emellett sikerült megállapítani a harmadik generációs

cefalosporin-rezisztens *E. coli* invazív fertőzések incidenciáját (0,79 volt 1000 kórházi felvételenként) és incidencia sűrűségét (0,11 volt 1000 betegnaponként), amelyről vonatkozóan nem találtunk korábbi hazai adatokat.

2. Ez volt az első vizsgálat Magyarországon, mely a hazai *E. coli* ST131 C2/H30Rx és C1-M27 alkládjába tartozó, izolátumok populáció struktúráját vizsgálta genom-szinten. Ennél a vizsgálatnál vezettük be a long-read szekvenálást a laboratóriumunkban, amely kulcsfontosságúnak bizonyult a *bla*_{CTX-M} genetikai környezetének jellemzéséhez. Az eredményeink arra utalnak, hogy az IS6/IS26 és *ISEcp1* által közvetített génszakaszok többször bekövetkezett transzpozíciója evolúciós előnnyel bírhatnak. A C2 alkládban a *bla*_{CTX-M-15} gén főként kromoszómálisan lokalizálódott, addig a C1-M27 alklád izolátumai plazmidon hordozták a *bla*_{CTX-M-27} rezisztencia gént. Mindkét alklád egyaránt képes volt fennmaradni és terjedni, de eltérő evolúciós utakat követett. A C1-M27 izolátumokat egy klaszterbe tudtuk besorolni (klaszter A), míg a C2/H30Rx izolátumokat öt

klaszterbe, amelyek feltételezéseink szerint egymástól függetlenül jelenhettek meg.

3. 2023-ban Magyarországon két különböző karbapenemáz-termelő *E. coli* ST131 izolátumot azonosítottunk. A két ST131 izolátum különböző leszármazási vonallal, AMR géekkel rendelkezett és különböző módon jelenhettek meg. Ezek az izolátumok általánosan jellemzik az új rezisztens izolátumok megjelenésének két fő mechanizmusát: új törzs behurcolása (OXA-244 és CTX-M-15-termelő izolátum) vagy a már jelen lévő baktérium törzsek AMR génjeinek kombinálódása (NDM-1 és CTX-M-27-termelő izolátum). A multirezisztens *E. coli* mikorevolúciójának megértéséhez elengedhetetlen a klonális változások mellett a mobilis genetikai elemek vizsgálata, mivel az AMR gének terjedése több útvonalon is végbemehet. Ez a vizsgálat rámutat az ST131 klón evolúciójának következő szakaszára, ami a karbapenemáz-termelő izolátumok megjelenését okozta, és ez előre vetíti azoknak a hazai elterjedését egy olyan szelektív környezetben, ahol a karbapenemek használata egyre gyakoribbá vált.

6. Saját publikációk jegyzéke

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

1. **Kinga Tóth**, Ivelina Damjanova, Levente Laczkó, Lilla Buzgó, Virág Lesinszki, Erika Ungvári, Laura Jánvári, Adrienn Hanczvikkel, Ákos Tóth, Dóra Szabó. Genomic Epidemiology of C2/H30Rx and C1-M27 Subclades of *Escherichia coli* ST131 Isolates from Clinical Blood Samples in Hungary. *Antibiotics*. 2024; 13(4): 363.

IF: 4.3

2. **Kinga Tóth**, Ákos Tóth, Katalin Kamotsay, Viktória Németh, Dóra Szabó. Population snapshot of the extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* invasive strains isolated from a Hungarian hospital; *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2022; 21(1): 1-13.

IF: 5.7