SEMMELWEIS EGYETEM

DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

3586.

HENCZKÓ JUDIT

Nép- és közegészségtudományok
című program

Programvezető: Dr. Ács Nándor, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Kis Zoltán, tudományos munkatárs

Genomikai módszerek alkalmazása ismeretlen etiológiájú és emerging fertőző betegségek diagnosztikájában

Doktori értekezés

Henczkó Judit

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola
Egészségtudományi Tagozat

Témavezető: Dr. Kis Zoltán, PhD., tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Kádár Béla PhD., tudományos segédmunkatárs
Dr. Jakab Szilvia PhD., biológus

Komplex vizsga szakmai bizottság:
Elnök: Dr. Nagy Károly PhD., egyetemi tanár
Tagok: Dr. Kristóf Katalin PhD., egyetemi tanár
Dr. Endrész Valéria PhD., egyetemi tanár

Budapest
2026

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék 1
Rövidítések jegyzéke 4
1.Bevezetés 7
1.1 Klinikai mikrobiológiai diagnosztika módszertani fejlődése 8
1.2 A szekvenálási módszerek osztályozása 9
1.2.1 Teljesgenom szekvenálás 11
1.2.2 Metagenomikai szekvenálás 12
1.2.2.1 Shotgun szekvenálás 15
1.2.2.2 Targetált szekvenálási módszerek 16
1.3 A metagenomika klinikai és járványügyi mikrobiológiai alkalmazásai 18
1.3.1 Alkalmazási területek és klinikai indikációk 18
1.3.2 A metagenomikai újgenerációs szekvenálási adatok klinikai interpretációjának kihívásai és megoldásai 20
1.4 A metagenomikai szekvenálás szerepe az emerging és magas biológiai kockázatú kórokozók diagnosztikájában 22
1.5 *Burkholderia pseudomallei* infekciók azonosítása újgenerációs szekvenálással Magyarországon 24
1.5.1 *Burkholderia pseudomallei* evolúciója és járványtana 24
1.5.2 *Burkholderia pseudomallei* genomikai jellemzői és patogenezise 25
1.5.3 *Burkholderia pseudomallei* klinikuma és terápiája 27
1.5.4 *Burkholderia pseudomallei* diagnosztikája 30
1.6 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* infekciók azonosítása újgenerációs szekvenálással Magyarországon 32
1.6.1 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* evolúciója és járványtana 32
1.6.2 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* genomikai jellemzői és patogenezise 33
1.6.3 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* klinikuma és terápiája 35
1.6.4 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* diagnosztikája 36
2. Célkitűzések 39
3. Anyag és módszer 40
3.1 Klinikai metagenomikai szekvenálás 40
3.1.1 Légúti metagenomikai vizsgálatok 40
3.1.2 Egyéb (nem-légúti) metagenomikai vizsgálatok 40
3.1.3 Légúti minták metagenomikai újgenerációs szekvenálása 41
3.1.4 Az egyéb klinikai minták metagenomikai újgenerációs szekvenálása 42

3.1.5 A metagenomikai újgenerációs szekvenálás eredményeinek bioinformatikai analízise és az eredmények interpretációja ... 43
3.1.6 Illesztés, konszenzus-szekvencia hívás és variáns-analízis ... 44
3.1.7 A metagenomikai újgenerációs szekvenálási eredmények klinikai interpretációja ... 44
3.2 A *Burkholderia pseudomallei* és nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* vizsgálatokban felhasznált izolátumok ... 46
3.2.1 *Burkholderia pseudomallei* ... 46
3.2.2 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* ... 46
3.3 *Burkholderia pseudomallei* és a nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* izolátumok identifikálása ... 47
3.4 Molekuláris megerősítő vizsgálatok ... 47
3.4.1. *Burkholderia pseudomallei* molekuláris vizsgálatai ... 47
3.4.2 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* molekuláris vizsgálatai ... 48
3.5 *Burkholderia pseudomallei* és a nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* teljesgenom szekvenálása és bioinformatikai elemzése ... 48
3.6 Alkalmazott statisztikai elemzések ... 51
4. Eredmények ... 52
4.1 Klinikai metagenomikai vizsgálatok eredményei ... 52
4.1.1 Légúti metagenomikai vizsgálatok eredményei ... 52
4.1.1.1 Diagnosztikai eredmények ... 52
4.1.1.2 A célzott PCR-panel és a metagenomikai újgenerációs szekvenálási eredmények összehasonlítása ... 53
4.1.1.3 Genomikai karakterizálás ... 55
4.1.2 Egyéb klinikai minták metagenomikai szekvenálásának eredményei ... 56
4.1.3 Akut nekrotizáló encephalopathia metagenomikai újgenerációs szekvenálási eredményei ... 59
4.2 Magyarországon diagnosztizált *Burkholderia pseudomallei* fertőzések genomikai elemzésének eredményei ... 59
4.2.1 Magyarországon azonosított *Burkholderia pseudomallei* megbetegedések jellemzői ... 59
4.2.2 *Burkholderia pseudomallei* izolátumok genomikai eredményei ... 60
4.2.3 *Burkholderia pseudomallei* in silico multilokusz szekvencia tipizálás ... 62
4.2.4 *Burkholderia pseudomallei* cgMLST összehasonlító analízise ... 66
4.2.5 *Burkholderia pseudomallei* virulencia- és rezisztenciaprofil eredményei ... 68
4.3 Magyarországon izolált nem-O1, nem-O139 Vibrio cholerae izolátumok genetikai jellemzése ... 71

4.3.1 Magyarországon azonosított nem-O1, nem-O139 Vibrio cholerae klinikai minták összefoglaló adatai ... 71
4.3.2 Nem-O1, nem-O139 Vibrio cholerae izolátumok molekuláris és genomikai eredményei ... 74
4.3.3 Nem-O1, nem-O139 Vibrio cholerae izolátumok cgMLST eredményei ... 77
4.3.4 Klinikai és környezeti izolátumok genomikai kapcsolatának bizonyítéka ... 78
5. Megbeszélés ... 80
5.1 Klinikai metagenomikai eredmények megbeszélése ... 80
5.1.1 Légúti metagenom minták eredményeinek megbeszélése ... 80
5.1.2 Egyéb klinikai minták eredményeinek megbeszélése ... 84
5.1.3 Akut nekrotizáló encephalopathia eredmények megbeszélése ... 87
5.2 *Burkholderia pseudomallei* eredmények megbeszélése ... 88
5.3 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* eredmények megbeszélése ... 94
6.Következtetések ... 99
7. Összefoglalás ... 102
8. Summary ... 103
9.Irodalomjegyzék ... 104
10. Saját publikációk jegyzéke ... 140
10.1 Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények ... 140
10.2 Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények ... 141
11. Köszönetnyilvánítás ... 147
Függelék ...

Rövidítések jegyzéke

AdjRPM-Adjusted Reads Per Million; Korrigált; egymillió olvasatra normalizált olvasatszám

ANE- Acute Necrotizing Encephalopathy; Akut necrotizáló encephalopathia

ARI- Acute Respiratory Infection; Akut légúti fertőzés

BAL- Bronchoalveolar lavage; Bronchoalveoláris mosófolyadék

BIM-A- Burkholderia intracellular motility protein A; Burkholderia intracelluláris mozgási fehérje A

BSL- Biosafety Level; Biológiai biztonsági szint

BTFC-*Burkholderia thailandensis*-like flagellum and chemotaxis; *Burkholderia thailandensis*-szerű flagellum és kemotaxis

CAP- Community-Acquired Pneumonia; Közösségben szerzett tüdőgyulladás

cfDNS- Cell-free DNA; Sejtmentes DNS

cgMLST-Core genome Multilocus Sequence Typing; Core genom multilókusz szekvenciatipizálás

CRISPR-Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; Klaszterezett, szabályosan köztes rövid palindrom ismétlődések

CRP-C-reactive protein; C-reaktív fehérje

CSF -Cerebrospinal fluid; Cerebrospinális folyadék (liquor)

DNS - Dezoxiribonukleinsav; Deoxyribonucleic acid

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

ELISA-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Enzimhez kötött immunszorbens vizsgálat

***feo*ABC**- Ferrous iron uptake/transport system; ferrovas (Fe^{2+}) felvételi rendszer

***fha*B-**Filamentous haemagglutinin gene B; Filamentózus hemagglutinin gén B

hAdV-B-*Mastadenovirus blackbeardi,* Humán mastadenovirus B; Humán mastadenovírus B

hCNGS-Hybrid Capture Next-Generation Sequencing; Hibrid befogáson (capture) alapuló újgenerációs szekvenálás

HIV-Human Immunodeficiency Virus; Humán immundeficiencia vírus

hCoV-HKU1-*Betacoronavirus hongkongense,* Human coronavirus HKU1; Humán koronavírus HKU-1

hMPV-*Metapneumovirus hominis,* Human metapneumovirus*;* Humán metapneumovírus

hPIV-2-*Orthorubulavirus laryngotracheitidis*, Human rubulavirus 2; Humán rubulavírus 2

IL-Interleukin

ITS-Internal Transcribed Spacer - Belső transzkribált spacer régió

KIR-Központi idegrendszert érintő fertőzés

LAMP-Loop-Mediated Isothermal Amplification; Hurok közvetítette izotermikus amplifikáció

LPS-Lipopolysaccharide; Lipopoliszacharid

MALDI-TOF MS-Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; Mátrix-asszisztált lézerdeszorpciós/ionizációs repülési idő tömegspektrometria

MDA -Multiple Displacement Amplification; Többszörös Szálkiszorításos Amplifikáció

MLST-Multilocus Sequence Typing; Multilókusz szekvenciatipizálás

mNGS-Metagenomic Next-Generation Sequencing; Metagenomikai újgenerációs szekvenálás

MPXV-*Orthopoxvirus monkeypox,* Mpox virus/Monkeypox virus; Mpox vírus / majomhimlő vírus

MRI -Magnetic Resonance Imaging; Mágneses rezonancia képalkotás

MRLF-Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztály

MST-Minimum Spanning Tree; minimális feszítőfa

NCBI-National Center for Biotechnology Information; Egyesült Államok Nemzeti Biotechnológiai Információs Központja

NGS-Next-Generation Sequencing; Újgenerációs szekvenálás

NNGYK-National Center for Public Health and Pharmacy; Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központ

NTVC-Non Toxigenic *Vibrio cholerae;* Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae*

PAS-Periodic acid–Schiff; perjódsavas Schiff-reakció

PCR-Polymerase Chain Reaction; Polimeráz láncreakció

qPCR-Quantitative Polymerase Chain Reaction; Kvantitatív polimeráz láncreakció

RNS-Ribonukleinsav

RPA-Recombinase Polymerase Amplification; Rekombináz polimeráz amplifikáció

RPM-Reads per million; Egymillió olvasatra normalizált olvasatszám

RPM-r-Reads per million ratio; A mintában és a negatív kontrollban mért taxonspecifikus RPM-értékek aránya

RSV- *Human orthopneumovirus*, Respiratory Syncytial Virus; Légúti óriássejtes vírus

SARI-Severe Acute Respiratory Infection; Súlyos akut légúti fertőzés

SARS-CoV-2- *Betacoronavirus pandemicum*, Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2; Súlyos akut légzőszervi szindróma-koronavírus 2,

SISPA-Sequence-Independent Single-Primer Amplification; Szekvenciafüggetlen egyprimeres amplifikáció

ST-Sequence type; Szekvenciatípus

T3SS-Type 3 Secretion System; 3-as típusú szekréciós rendszer

T6SS-Type 6 Secretion System; 6-os típusú szekréciós rendszer

TCBS-Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose Agar**;** Tioszulfát-citrát-epesó-szacharóz agar

ToxA-Dermonecrotic Toxin; Dermonekrotikus toxin A

YLF-Yersinia-Like Fimbria; Yersinia-szerű fimbria

VBNC-Viable but nonculturable; Életképes, de nem tenyészthető

WGS-Whole Genome Sequencing; Teljesgenom-szekvenálás

WHO-World Health Organization; Egészségügyi Világszervezet

1. **Bevezetés**

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) becslése szerint az újonnan megjelenő fertőző betegségek (emerging infectious diseases) mintegy 60%-a zoonotikus eredetű, míg a humán patogének közel háromnegyede állati rezervoárokból származik (1,2). Az elmúlt évtizedekben a *Betacoronavirus pandemicum* (súlyos akut légzőszervi szindróma-koronavírus, Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus, SARS), az *Alphainfluenzavirus influenzae (*influenza A vírus, Influenza A virus), az *Orthoebolavirus* (Ebola virus)-járványok, a COVID–19 (*Betacoronavirus pandemicum*, súlyos akut légzőszervi szindróma-koronavírus 2, Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2, SARS-CoV-2) világjárvány, valamint a *Orthopoxvirus monkeypox* (majomhimlő vírus, mpox virus, MPXV) nemcsak arra hívták fel a figyelmet, hogy a fertőző betegségek továbbra is az egyik legjelentősebb globális egészségügyi kihívást jelentik, hanem arra is, hogy a klasszikus diagnosztikai és járványügyi megközelítések önmagukban már nem minden esetben elegendőek (2–5). A XXI. század fertőző betegségeinek epidemiológiáját ugyanakkor már nem kizárólag a zoonotikus átvitel határozza meg, hanem az ember, az állatok és a környezet közötti egyre összetettebb kölcsönhatások is (6). A fertőző betegségek megelőzésének szemlélete is jelentős átalakuláson ment keresztül. Míg az „Egy Egészség” (One Health) koncepció az emberi, állati és környezeti egészség kölcsönhatásaira helyezte a hangsúlyt, napjainkban egyre inkább a bolygó egészség (Planetary Health) megközelítés kerül előtérbe, amely az emberi egészséget a bolygó ökológiai rendszereinek állapotával és a globális társadalmi folyamatokkal egységes rendszerként értelmezi (1,5,7,8). Ebben a megközelítésben a gyors, pontos és nagy felbontású mikrobiológiai diagnosztika már nem csupán a betegellátás része, hanem a járványügyi surveillance, a korai figyelmeztető rendszerek és a globális egészségbiztonság meghatározó pillére (3).

E változások új kihívások elé állítják a mikrobiológiai diagnosztikát, amelyben a genomikai módszerek egyre meghatározóbb szerepet töltenek be (3,9,10).

A XXI. század első évtizedei az emberiség történetének egyik legjelentősebb társadalmi és technológiai átalakulását hozták. A globális mobilitás, a nemzetközi kereskedelem és turizmus robbanásszerű növekedése, az urbanizáció, valamint a klímaváltozás következtében átalakuló ökológiai rendszerek alapvetően megváltoztatták az ember és a mikroorganizmusok kapcsolatát. A természetes élőhelyek zsugorodása, a biodiverzitás

csökkenése, a korábban elszigetelt területek fokozódó emberi használata, valamint az állati rezervoárokkal történő egyre gyakoribb érintkezés kedvező feltételeket teremt az új és újonnan megjelenő kórokozók kialakulásához és terjedéséhez (2,11). Ezzel párhuzamosan a nemzetközi utazások és a globális áruforgalom következtében egy lokálisan kialakuló fertőzés akár 24–36 órán belül kontinenseken átívelő közegészségügyi eseménnyé válhat, amely összehangolt nemzetközi surveillance- és járványügyi intézkedéseket tesz szükségessé (5,12–14).

Jelen doktori értekezés a modern genomikai módszerek közegészségügyi diagnosztikában betöltött szerepét három, egymásra épülő alkalmazási területen keresztül mutatja be. Az első rész a klinikai metagenomikai diagnosztika hazai bevezetésének és alkalmazásának kezdeti tapasztalatait ismerteti ismeretlen etiológiájú fertőző megbetegedések kivizsgálásában, bemutatva a hipotézismentes kórokozó-kimutatás diagnosztikai lehetőségeit és korlátait. A második rész a teljesgenom-szekvenálás szerepét értékeli ritka, Magyarországra importált melioidosis esetek molekuláris epidemiológiai vizsgálatán keresztül, szemléltetve a nagy felbontású genomikai tipizálás jelentőségét a nagy kockázatú kórokozók karakterizálásában. A harmadik rész a nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* (NTVC) izolátumok genomikai elemzésén keresztül mutatja be a teljesgenom-szekvenálás szerepét az emerging bakteriális kórokozók surveillance-ában, molekuláris epidemiológiájában és virulencia-, illetve antimikrobiális rezisztenciaprofiljának vizsgálatában. A dolgozat célja annak bemutatása, hogy a genomikai technológiák miként járulhatnak hozzá a fertőző betegségek diagnosztikájának, a járványügyi surveillance-nak és a közegészségügyi döntéshozatalnak a fejlesztéséhez.

1.1 Klinikai mikrobiológiai diagnosztika módszertani fejlődése

A klinikai mikrobiológiai diagnosztika fejlődése szorosan összefügg a mikroorganizmusok biológiájának megismerésével és az analitikai technológiák fejlődésével. A fertőző betegségek laboratóriumi diagnosztikája hagyományosan a kórokozók izolálásán, tenyésztésén, mikroszkópos vizsgálatán, antigén- vagy ellenanyag-kimutatáson, illetve nukleinsav-alapú módszereken keresztül történő azonosításán alapul (10,15). Bár a hagyományos eljárások alapvető jelentőségűek, érzékenységüket az előzetesen alkalmazott antimikrobiális terápiák, valamint a preanalitikai tényezők

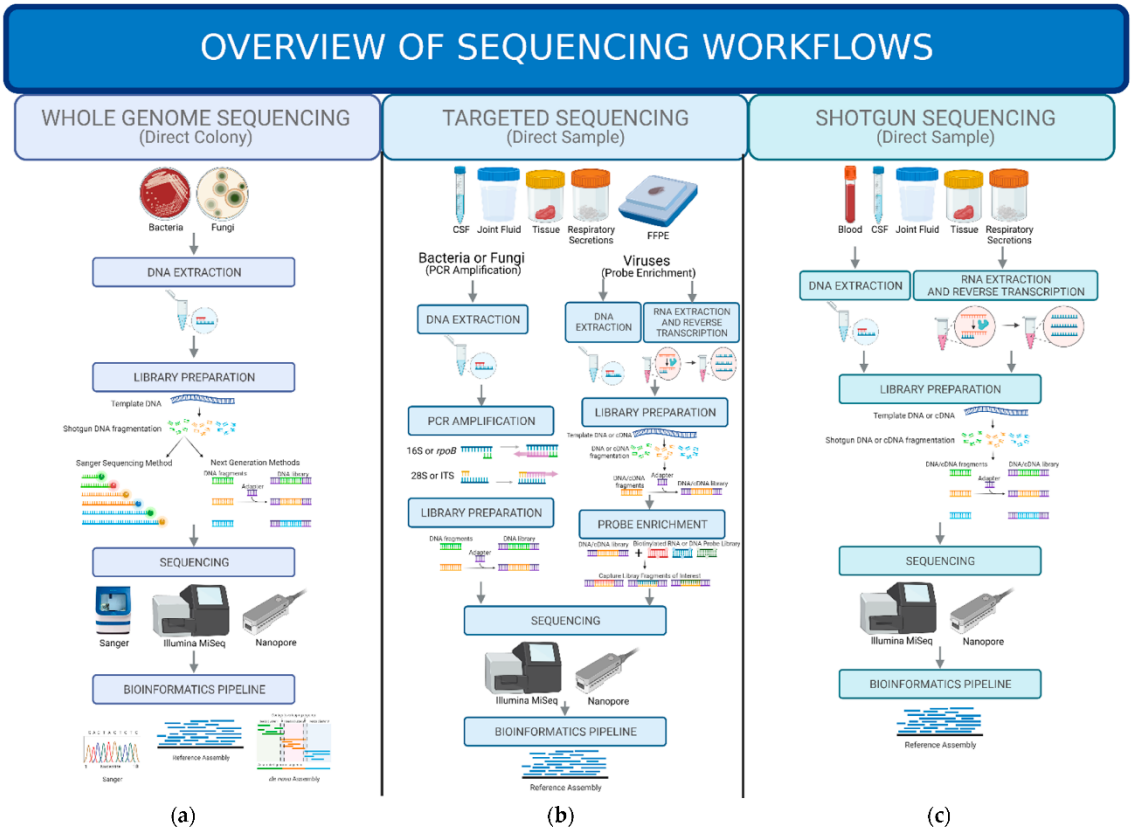
jelentősen befolyásolhatják (15). A szerológiai módszerek szintén kiemelt jelentőséggel bírnak, ugyanakkor jelenleg nem áll rendelkezésre olyan univerzális megközelítés, amely a kórokozók széles körű kimutatását lehetővé tenné (16,17). A nukleinsav-alapú diagnosztika, különösen a polimeráz láncreakció (PCR) bevezetése jelentős előrelépést hozott a klinikai mikrobiológiában, mivel lehetővé tette a kórokozók gyors és érzékeny kimutatását közvetlenül klinikai mintákból, jelentősen csökkentette a leletátfordulási időt, valamint szélesítette a diagnosztikai palettát (10,15). A célzott nukleinsav-amplifikáción túlmutató, mélyebb genomikai elemzések igénye hívta életre a szekvenálási eljárásokat. Az első generációs szekvenálási technológiák közül a Sanger-szekvenálás több mint három évtizeden keresztül a gold standard módszernek számított. Nagy pontosságú, jellemzően 600–1000 bp hosszúságú olvasatokat biztosított, azonban alacsony áteresztőképessége korlátozta a nagyléptékű genomikai alkalmazásokat. Az első teljes egészében szekvenált bakteriális genom a *Haemophilus influenzae* volt, amelynek meghatározása becslések szerint mintegy 1 millió amerikai dollárba és majdnem egy évbe került (18). Ezen idő- és költségbeli korlátok leküzdése, valamint a genomikai adatok iránti növekvő igény hívta életre azokat a technológiai újításokat, amelyek elvezettek a szekvenálás következő korszakához. Az újgenerációs szekvenálási módszerek (Next Generation Sequencing, NGS) a 2000-es években jelentek meg, de a széles körű klinikai mikrobiológiai alkalmazásuk csupán 2010-től indult el. Ezzel párhuzamosan a bioinformatikai alkalmazások is egyre inkább széles körben elérhetővé váltak (19). Az NGS-technológiák megjelenése alapvetően átalakította a klinikai mikrobiológiát, lehetővé téve a kórokozók nagy felbontású genomikai vizsgálatát, a rezisztencia- és virulenciagének azonosítását, valamint a járványügyi események valós idejű nyomon követését (3,20). A genomikai technológiák fejlődése nemcsak a klasszikus mikrobiológiai diagnosztikát alakította át, hanem új lehetőségeket teremtett a ritka, nehezen tenyészthető vagy korábban nem ismert kórokozók azonosítására is (9,21,22).

1.2 A szekvenálási módszerek osztályozása

Az első- és újgenerációs szekvenálási technológiák megjelenése alapvetően átalakította a mikrobiológiai diagnosztikát. A különböző platformok olvasathosszban, pontosságban, áteresztőképességben és klinikai alkalmazhatóságban jelentősen eltérnek egymástól, ezért a megfelelő technológia kiválasztása a vizsgálat céljától függ. A klinikai

mikrobiológiában jelenleg alkalmazott szekvenálási platformok két nagy csoportba sorolhatók: rövid- (úgynevezett második generációs) és hosszú olvasatú (úgynevezett harmadik generációs) technológiákra (23,24). A rövid olvasatú rendszerek, például az Illumina, az MGI, a GeneMind és az AVITI platformok jellemzően 100–500 bp hosszúságú, nagy pontosságú olvasatokat biztosítanak, ezért széles körben alkalmazzák őket amplikon-, teljesgenom- és metagenomikai vizsgálatokban. Ezzel szemben a hosszú olvasatú technológiák, mint az Oxford Nanopore és a PacBio rendszerek, több tízezer vagy akár milliós nagyságrendű olvasatok előállítására is képesek, ami előnyös komplex genomszerkezetek, ismétlődő régiók és strukturális variációk vizsgálata során, valamint lehetővé teszik a bázismódosítások (pl. metilációs mintázatok) közvetlen, epigenetikai detektálását is (23). A különböző platformok eltérő előnyei miatt a technológia kiválasztását mindig a vizsgálat célja, a mintatípus, a szükséges felbontás és a rendelkezésre álló infrastruktúra határozza meg. A klinikai mikrobiológiai gyakorlatban használt főbb platformok jellemzőit az 1-es számú függelék foglalja össze.

Ha klinikai alkalmazás szempontjából szeretnénk a szekvenálási módszereket besorolni, akkor három fő csoportot kapunk: az izolátum-alapú teljesgenom-szekvenálást (whole genome sequencing, WGS), nem célzott (shotgun) metagenomikai szekvenálást, valamint a célzott szekvenálási módszereket. A szekvenálási módszerek összehasonlítása és főbb lépései az 1-es ábrán láthatók.



1. ábra: A szekvenálási munkafolyamatok áttekintése. (a) Izolátum alapú teljesgenom szekvenálás (Whole Genome Sequencing), (b) Célzott szekvenálás (Targeted Sequencing) (c) Shotgun szekvenálás (25).

1.2.1 Teljesgenom szekvenálás

A WGS jelenleg a klinikai mikrobiológia egyik legfontosabb genomikai eszköze, amely lehetővé teszi a mikroorganizmusok teljes genetikai állományának vizsgálatát. A módszer tenyésztett, tiszta izolátumból indul ki. A WGS alapú tipizáló módszerek felbontóképessége jelentősen meghaladja a hagyományos molekuláris tipizálási eljárásokét, így lehetővé teszi az epidemiológiailag szoros kapcsolatban álló törzsek elkülönítését is. Kiemelt szerepe van a nosocomiális járványok rekonstruálásában, a transzmissziós láncok feltérképezésében, valamint a rezisztencia- és virulenciagének azonosításában (26,27). A taxonómiai és filogenetikai információkon túl a teljes genom szekvencia alkalmas az antimikrobiális rezisztenciával és virulenciával összefüggő genetikai determinánsok azonosítására, ezáltal a kórokozók biológiai és klinikai jelentőségének részletesebb értékelésére is (28). A WGS legfontosabb korlátja, hogy rendszerint tenyésztett izolátumot igényel, ezért akut klinikai helyzetekben vagy

tenyésztés-negatív fertőzések esetén alkalmazhatósága korlátozott. E korlátok hívták életre a tenyésztéstől független metagenomikai megközelítéseket, a célzott molekuláris vizsgálatokkal (például a PCR-rel) szemben előzetes hipotézis nélkül, közvetlenül a klinikai mintákból képesek a jelen lévő teljes mikrobiális genetikai állomány feltárására (9,23).

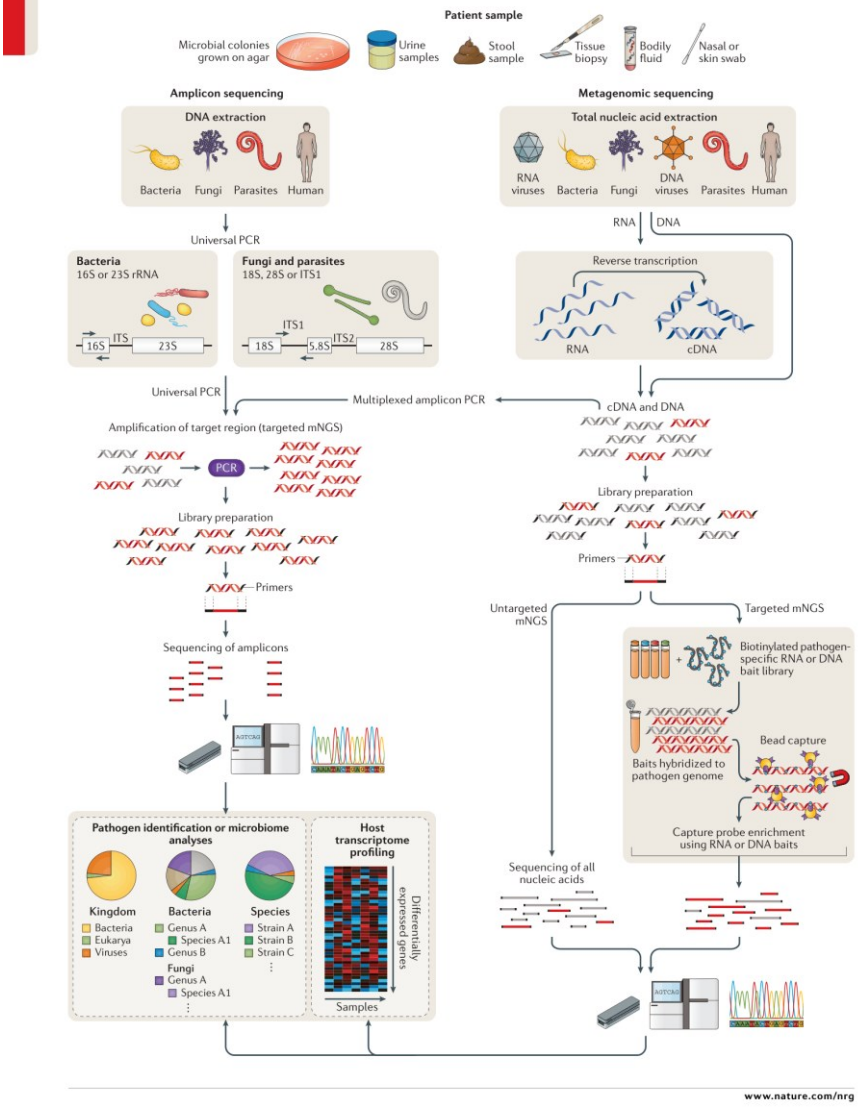
1.2.2 Metagenomikai szekvenálás

A „metagenomika" kifejezést Jo Handelsman és munkatársai alkották meg 1998-ban. A metagenomikai újgenerációs szekvenálás (metagenomic next-generation sequencing, mNGS) klinikai, vagy egyéb mintákból származó nukleinsavak átfogó vizsgálatát teszi lehetővé. Stratégiája alapján a klinikai mikrobiológiában alkalmazott megközelítések alapvetően nem célzott (shotgun) és célzott (targetált) eljárásokra oszthatók (1-es számú ábra). A nem célzott, „shotgun" mNGS lényege, hogy előzetes kórokozó-specifikus hipotézis nélkül képes a mintában jelen lévő teljes nukleinsav-állományt szekvenálni (15,18,19). Elméletileg egyetlen vizsgálattal alkalmas baktériumok, vírusok, gombák és paraziták genetikai anyagának kimutatására, ezért különösen értékes lehet atípusos klinikai kép, immunszuppresszió, polimikrobiális fertőzés gyanúja, illetve ritka vagy újonnan megjelenő kórokozók esetén (9,19,26,27,29,30). A klinikai mNGS rutinszerű alkalmazásának ugyanakkor jelentős korlátja, hogy a vizsgált mintákban a szekvenálható nukleinsav döntő hányada gyakran gazdaeredetű, ami „tű a szénakazalban" jellegű analitikai helyzetet teremt: a klinikailag releváns kórokozó olvasatok (úgynevezett readek) aránya sok esetben a teljes adathalmaz csak igen kis részét képezi (29,30). Hátterében az áll, hogy míg a humán genom mérete megközelítőleg 3,2 Gb, addig a klinikai mintákban gyakran vizsgált mikroorganizmusok genomja ennél több nagyságrenddel kisebb, jellemzően ~5,6 kb–25 Mb közötti tartományba tartozik (9,31). Ennek következtében már csekély mennyiségű humán DNS is dominánssá válhat és jelentősen csökkentheti a nem-humán genetikai információ relatív arányát a szekvenálási adatokban. Különösen igaz ez a gazdasejtben gazdag mintatípusokra (pl. vér, szöveti biopszia, nyál). Ezért kiemelten fontos a megfelelő mintapreparáció, a gazdaeredetű nukleinsav csökkentése, valamint a szekvenálási adatok bioinformatikai szűrése (21,22). A klinikai metagenomikai vizsgálatok során alacsony kórokozó-terhelésű mintákban a detektálási érzékenység javítása érdekében különböző nukleinsav-dúsítási és amplifikációs eljárásokat alkalmaznak. Ezek közé tartoznak a teljesgenom alapú

amplifikáció (Whole genome amplification, WGA) eljárások, a gördülő körös amplifikáció (rolling circle amplification, RCA), a szekvenciafüggetlen egyprimeres amplifikáció (Sequence-Independent, Single-Primer Amplification, SISPA), az egyprimeres izoterm amplifikáció (Single Primer Isothermal Amplification, SPIA), valamint a célzott hibridizációs (capture-alapú) dúsítási módszerek (32,33). Ezek azonban torzításokat is eredményezhetnek, ezért megfelelő preanalitikai és bioinformatikai kontrollok használata indokolt. Az mNGS klinikai interpretációja különös körültekintést igényel. A bioinformatikai azonosítás referencia-adatbázisokra támaszkodik, így az eredményeket az adatbázisok teljessége és minősége is befolyásolja, különösen a ritka, újonnan megjelenő vagy korlátozottan reprezentált kórokozók esetén. Komplex mintákban további nehézséget jelent a valódi kórokozók elkülönítése a kolonizáló flórától, a környezeti kontaminánsoktól és a laboratóriumi háttérszennyeződésektől. Ennek megfelelően az mNGS klinikai alkalmazása standardizált módszereket, validált minőségbiztosítási elemeket és több szakterület együttműködését igényli (9,15,34,35). Bár a klinikai gyakorlatban jelenleg a DNS-alapú mNGS a legelterjedtebb, az RNS-szekvenálás (metatranszkriptomika) integrálása elengedhetetlen az RNS-vírusok (pl. influenza vírusok, koronavírusok) közvetlen detektálásához, valamint a mikrobiális közösségek aktív transzkripciós profiljának feltérképezéséhez. Az RNS-alapú megközelítés lehetővé teszi az életképes és aktívan transzlálódó mikroorganizmusok elkülönítését az inaktív, elhalt DNS-maradványoktól (36). Emellett a harmadik generációs, hosszú olvasatos szekvenálási platformok (pl. Oxford Nanopore Technologies, PacBio) és a rövid olvasatos technológiák hibrid ötvözése radikálisan lecsökkenti az analitikai átfutási (lelet átfordulási) időt, és lehetővé teszi a komplex genomi struktúrák, mint például a plazmid-mediált rezisztenciagének és mobilis genetikai elemek pontos rekonstrukcióját (37) .

A klinikai metagenomikai szekvenálás egyik legfontosabb előnye, hogy hipotézismentes megközelítéssel képes detektálni olyan ágenseket is, amelyek nem szerepelnek a rutinszerű diagnosztikai algoritmusokban, ezáltal csökkentheti az ismeretlen etiológiájú fertőzések arányát. Ugyanakkor hangsúlyozni kell, hogy alkalmazása nem pusztán technológiai kérdés, hanem jelentős interpretációs és biológiai biztonsági kihívásokkal is jár.

Magas kockázatú (3-as vagy 4-es rizikócsoportba sorolt) kórokozók esetében a korai felismerés lehetőséget teremt a megfelelő izolációs és járványügyi intézkedések gyors bevezetésére. Ugyanakkor a bioinformatikai téves pozitív eredmények, a laboratóriumi vagy reagensekből származó kontamináció, valamint az adatbázisok hiányosságai potenciális veszélyforrást jelenthetnek, ezért rendkívül fontos a megfelelő validációs protokollok alkalmazása (22,38,39). A módszer klinikai integrációja csak standardizált bioinformatikai pipeline-ok, validált diagnosztikai küszöbértékek és multidiszciplináris szakmai együttműködés (pl. klinikus, mikrobiológus és bioinformatikus közös értékelése) mellett tekinthető biztonságosnak. Magas kockázatú (3-as vagy 4-es rizikócsoportba tartozó) kórokozók azonosításakor a laboratóriumi és biobiztonsági (biosafety és biosecurity) protokollok szigorú betartása elengedhetetlen a laboratóriumi fertőzések és a kritikus adatokkal való visszaélések elkerülése érdekében (9).



2. ábra A klinikai metagenomikai újgenerációs szekvenálás (mNGS) főbb stratégiai megközelítései: a célzott (targetált) és nem célzott (shotgun) módszerek összehasonlítása (24).

1.2.2.1 Shotgun szekvenálás

A shotgun szekvenálás olyan nem célzott megközelítés, amely során a mintából származó teljes nukleinsav-állományt előzetesen kijelölt célgének vagy primerek alkalmazása nélkül szekvenálják (2-es számú ábra). A módszer legnagyobb előnye a széles spektrumú detektálási képesség: lehetővé teszi a mintában jelen lévő valamennyi mikroorganizmus taxonómiai azonosítását, valamint megfelelő lefedettség (sequencing depth) esetén a

rezisztenciagének és virulenciafaktorok egyidejű detektálását is (40). Különösen értékes diagnosztikai eszköz akkor, ha a hagyományos tenyésztés vagy a célzott PCR-vizsgálatok negatív eredményt adnak, de a klinikai gyanú továbbra is fennáll (10,22). Fő korlátját a magas költségigény, a nagymértékű bioinformatikai számítási kapacitási igény, valamint a kontamináció és a valódi infekció elkülönítésének nehézsége jelenti (9).

1.2.2.2 Targetált szekvenálási módszerek

A targetált szekvenálási módszerek meghatározott génrégiók PCR-alapú amplifikációján és szekvenálásán alapulnak, és elsősorban jól körülhatárolható kórokozó-csoportok vizsgálatára alkalmasak. Klinikai mikrobiológiában különösen előnyösek akkor, ha a shotgun metagenomika technikailag vagy gazdaságilag nem indokolt. A módszer magas analitikai érzékenységet és jó multiplexálhatóságot biztosít, ugyanakkor az eredmények többnyire kvalitatív vagy félkvantitatív jellegűek, mivel a PCR-amplifikációs torzítás és a génkópiaszám-variabilitás befolyásolhatja a relatív abundanciaértékeket (34,41). A marker-alapú módszerek nem szolgáltatnak közvetlen információt rezisztenciagénekről vagy virulenciafaktorokról, és alacsony biomasszájú mintákban fokozottan érzékenyek a kontaminációra. A targetált szekvenálási megközelítések legnagyobb előnye a magas analitikai érzékenység, az egyszerűbb bioinformatikai feldolgozás és a kedvező költséghatékonyság. Emiatt számos laboratóriumban jelenleg is ezek jelentik az elsőként választandó genomikai módszert jól definiált diagnosztikai kérdések esetén.

A riboszomális marker-alapú targetált szekvenálás a klinikai mikrobiológiában és a mikrobiomkutatásban széles körben alkalmazott molekuláris megközelítés. Baktériumok esetében leggyakrabban a 16S és 23S rRNS, protozoonok és egyes paraziták esetében a 18S és 28S rRNS, míg gombák esetében a belső transzkribált spacer régió (internal transcribed spacer, ITS) régió szolgál standard taxonómiai markerként. A 16S rRNS gén konzervált és hipervariábilis szakaszai lehetővé teszik univerzális primerek alkalmazását és faj- vagy nemzetségszintű azonosítást, különösen nehezen tenyészthető vagy atípusos baktériumok esetében (42). Az ITS régiók nagyfokú szekvenciavariabilitásuk révén a klinikai mikológiában DNS-barcode jellegű markernek tekinthetők, és alkalmasak például *Candida*, *Aspergillus* vagy *Cryptococcus* fajok azonosítására (43). A 16S- és ITS-alapú szekvenálás jól standardizálható és költséghatékony eszköz célzott taxonómiai azonosításra, de széles spektrumú vagy funkcionális elemzéshez a nem célzott metagenomikai megközelítés előnyösebb lehet.

Az eukarióta kórokozók, különösen a paraziták molekuláris azonosítása gyakran kihívást jelent, mivel a klinikai mintákban rendszerint alacsony a kórokozó-terhelés, miközben a gazdaeredetű DNS dominál. Emiatt a targetált megközelítésekben kiemelt szerepet kapnak a mitokondriális markerek, mivel a mitokondriális DNS általában nagyobb kópiaszámban van jelen, és fajszintű elkülönítésre alkalmas variabilitást hordoz. Gyakran alkalmazott célgének a citokróm c oxidáz I (COI) és a citokróm b (cytb), amelyek fajazonosításra és filogenetikai vizsgálatokra egyaránt alkalmasak. A módszer teljesítményét ugyanakkor korlátozhatja a magas humán DNS-háttér, a ritka fajok hiányos referencia-adatbázis-reprezentációja, valamint az egyes, nem megfelelően kurált vagy tisztítatlan adatbázisokban előforduló humán-genom átfedések és kontamináló szekvenciák jelenléte, amelyek téves taxonómiai besoroláshoz vagy bizonytalan eredményekhez vezethetnek. Emiatt az eredmények értelmezése fokozott körültekintést igényel (44,45).

A targetált stratégiák másik fontos csoportját a target enrichment vagy hybrid capture alapú módszerek jelentik. A hybrid capture alapú újgenerációs szekvenálás (hybrid capture next-generation sequencing, HCNGS) egy olyan módszer, amely a nukleinsav-extrakciót és könyvtárkészítést követően lehetővé teszi a releváns DNS-szekvenciák dúsítását, és ezáltal számos PCR-rel kapcsolatos korlátot képes kiküszöbölni (46,47). A hybrid capture folyamat során a cél-DNS-szekvenciák komplementer bázispárosodás alapján tervezett próbákhoz (bait-ekhez) hibridizálnak. A HCNGS nagy genomi fragmentumok visszanyerésére képes magas szekvenálási lefedettség mellett, beleértve az ismert templáthoz kapcsolódó, korábban ismeretlen szekvenciákat is (48). A HCNGS emellett több millió próba egyidejű alkalmazását is lehetővé teszi, így az egy futtatás során vizsgálható ágensek száma gyakorlatilag nem korlátozott. További előnye, hogy a módszer kompatibilis a kórházakban és közegészségügyi laboratóriumokban általában rendelkezésre álló alapvető molekuláris biológiai eszközparkkal. Hosszabb távon ez a megközelítés terepi vagy betegágy melletti (point-of-care) diagnosztikai alkalmazásokra is kiterjeszthető lehet. Ugyanakkor a capture-alapú módszerek komoly előzetes ismereteket igényelnek a keresett kórokozókról, és torzítást vihetnek a vizsgálatba, ami korlátozza alkalmazhatóságukat nem célzott patogénkeresés során, továbbá fontos korlát, hogy viszonylag magas nukleinsav- inputot igényelnek (49).

1.3 A metagenomika klinikai és járványügyi mikrobiológiai alkalmazásai

1.3.1 Alkalmazási területek és klinikai indikációk

Az mNGS a klinikai mikrobiológiában jelenleg elsősorban kiegészítő diagnosztikai eszköz, ugyanakkor jelentős szerepe várható a precíziós orvoslásban és a járványügyi surveillance-ben (9,35,50–52). A módszer legfontosabb klinikai alkalmazási területei közé tartoznak a központi idegrendszeri fertőzések, a véráramfertőzések és egyéb szisztémás infekciók, valamint a súlyos alsó légúti fertőzések diagnosztikája, ahol a hagyományos mikrobiológiai diagnosztika érzékenysége gyakran korlátozott, vagy a kórokozóspektrum előzetesen nem határozható meg. A szakirodalomban ismertetett klinikai alkalmazások alapján az indikációk három, jól elkülöníthető fő terület köré csoportosíthatók (9,21). Az első kategóriát a primer steril vagy alacsony biomasszájú minták jelentik. Központi idegrendszeri (KIR) fertőzésekben, például meningitisben és encephalitisben, vagy a szemészeti fertőzéseknél, mint például az endophthalmitis, a konvencionális tesztek az esetek 40–50%-ában negatívak maradnak az előzetes antimikrobiális kezelés, az alacsony kópiaszám vagy a ritka etiológia miatt (23,52,53). Az mNGS klinikai diagnosztikai értékét KIR-fertőzésekben úttörő prospektív multicentrikus tanulmányok igazolták. Wilson és munkatársai 2019-ben megjelent, mérföldkőnek számító vizsgálatukban kimutatták, hogy a liquor-alapú mNGS olyan ritka, atípusos kórokozókat is azonosítani tudott, amelyeket a rutin diagnosztika elmulasztott volna (30). Benoit munkatársaival egy 7 éves nagyszabású kohorsz vizsgálatban 4,828 cerebrospinális folyadék (cerebrospinal fluid, CSF) minta szekvenálásával 697 esetben igazoltak olyan ritka fertőzéseket, amelyek célzott módszerekkel nem kerültek volna felismerésre, különösen olyan vírusos encephalitisek, ritka bakteriális fertőzések és opportunista patogének esetében, mint például a coloradoi kullancsláz vírus, a *Yersinia pestis* vagy a *Balamuthia mandrillaris* (51). Egy 70 CSF mintát elemző prospektív gyermekgyógyászati tanulmányban az mNGS 28,6%-os pozitivitást mutatott átlagosan 38 órás leletátfordulási idővel (54). Egy 5 éves intenzív osztályon kezelt betegek mintáiból származó prospektív vizsgálat 520 mintából az mNGS 172 megbetegedést azonosított (59%-os érzékenység és 90,5%-os specifitás mellett), szemben a hagyományos tenyésztés mindössze 31 mintányi pozitivitásával (a kimutatott patogének megoszlása: 61,0% baktérium, 15,2% DNS-vírus, 12,4% gomba, 6,7% RNS-vírus) (55).

Ez a megközelítés különösen fontos olyan kórképekben, mint például az akut nekrotizáló encephalopathia (ANE), ahol a központi idegrendszer károsodását döntően a gazdaszervezet diszregulált immunválasza okozza, ezért a liquorban a kórokozó nukleinsavának mennyisége gyakran a célzott PCR kimutatási határa alatt marad, vagy egyáltalán nincs is jelen a kórokozó (56–60). Ilyen esetekben az ultramély, hipotézismentes metagenomikai szekvenálás lehetőséget biztosít a primer infekciós trigger retrospektív azonosítására, valamint a fertőzéses és nem fertőzéses eredetű encephalopathiák elkülönítésének támogatására (51,54,57,61–65). Szemészeti fertőzésekben, ahol a rutin módszerek szintén az esetek több mint 50%-ában nem mutatnak ki kórokozót, az mNGS kiemelkedő diagnosztikai hatékonyságot mutat. Susiyanti és munkatársai 21 tanulmány (1 219 minta) metaadat-elemzésében 10% és 94% közötti mNGS pozitivitást írtak le. Egy 287 szemészeti infekció gyanújával vizsgált mNGS vizsgálatban a betegek 79,4%-ánál azonosítottak etiológiai ágenst (48,2% gomba, 19,3% vírus, 18,4% vegyes, 13,2% baktérium). Ebben a vizsgálatban az mNGS 83,9%-os (104/124) pozitivitási arányt ért el, szignifikánsan felülmúlva a tenyésztést (47,3%), a lézeres konfokális mikroszkópiát (45,3%) és a patológiai metszet kiértékeléseket (19,3%). Az mNGS eredményekre alapozott terápia mellett 92,3%-os klinikai gyógyulás következett be (66).

A második fő alkalmazási területet a folyékony biopszián alapuló diagnosztika és a szisztémás fertőzések jelentik. A plazma sejtmentes DNS-ének (cell-free DNA, cfDNA) mNGS vizsgálata lehetővé teszi a véráramban keringő mikrobiális nukleinsavak kimutatását negatív hemokultúra vagy megkezdett antibiotikum-kezelés mellett is, akár 24 órán belüli eredményközléssel (39,67). Blauwkamp és munkatársai 2019-ben egy több mint 1000 fős klinikai kohorszvizsgálatban igazolták, hogy a cfDNA mNGS szignifikánsan magasabb diagnosztikai szenzitivitást mutatott a szepszises betegek körében a konvencionális vérből történő tenyésztéshez képest, különösen olyan nehezen tenyészthető vagy intracelluláris kórokozók esetében, mint a *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp., *Brucella* spp. vagy *Tropheryma whipplei* (39,68–71). Kiemelt indikációt jelent a hemokultúra-negatív infektív endocarditis, amely az összes ilyen eset 5–25%-át teszi ki (72). Az mNGS mind a plazma cfDNA-ból, mind az eltávolított szívbillentyű-szövetből hatékonyan azonosítja a biofilmhez kötött, lassan növő vagy atípusos patogéneket (72,73).

A harmadik fő indikációs kört a komplex, polimikrobiális és biofilm-asszociált fertőzések alkotják. Ide sorolhatók a súlyos bőr- és lágyrészfertőzések, a krónikus osteomyelitis mellett a légúti fertőzések, ahol a kórokozók elkülönítését a normál mikrobiota jelenléte, a kolonizáció és a magas humán nukleinsav-háttér egyaránt nehezíti (74–80). Közösségben szerzett pneumonia (Community Acquired Pneumonia, CAP) esetén a konvencionális módszerek mindössze az esetek ~33–50%-ában képesek tisztázni az etiológiát (81). Ezzel szemben perifériás tüdőfertőzésekben végzett mNGS vizsgálatok során (240 beteges mintán) az mNGS 89%-os pozitivitási arányt ért el a konvencionális eljárások 25,73%-os eredményével szemben (37,82–84). Pulmonális gombás fertőzésekben az mNGS szintén szignifikánsan magasabb érzékenységet mutatott egyes tanulmányokban a hagyományos tesztekhez képest (80% vs. 44,4%), bár a *Cryptococcus* és *Candida* fajok kimutatásában az mNGS nem nyújt érdemi többletet (85). Langelier és munkatársai, valamint Charalampous és munkatársai 2018-ban alsó légúti mintákon végzett mNGS vizsgálatai rávilágítottak arra, hogy a módszer nemcsak a potenciális patogének pontos azonosítására és a teljes mikrobiális közösség szerkezetének feltárására alkalmas, hanem a kimutatott rezisztenciagének és a gazdaszervezet immunválaszának egyidejű elemzésével hatékonyan támogatja az intenzív osztályos antimikrobiális stewardship programokat is (9,23,35,37,65,86–88) .

1.3.2 A metagenomikai újgenerációs szekvenálási adatok klinikai interpretációjának kihívásai és megoldásai

Mivel az mNGS nem tesz különbséget élő és elhalt mikroorganizmusok között, valamint rendkívül érzékeny a környezeti, laboratóriumi és reagens eredetű kontaminációra, azaz a „kitome”-ra, valamint a minták közötti keresztkontaminációra, a „splashtome”-ra, az adatok értelmezése szigorú minőségbiztosítási keretrendszert követel meg (29,30,38,41,65,89). Jelenleg nem létezik univerzálisan elfogadott diagnosztikai küszöbérték, a pozitivitás megítélése minden esetben mintatípus-specifikus és kontrollalapú megközelítést igényel. A kontrollalapú zajszűrés során minden futtatásban kötelezően alkalmaznak egy negatív folyamatkontrollt (No-Template Control) és ismert koncentrációjú belső standardot, úgynevezett „Spike-in” kontrollt, amely referenciapontként szolgál a relatív olvasatszámok abszolút kvantitatív mikrobiális kópiaszámmal való korreláltatásához (21). A nyers taxonspecifikus olvasatszámok a minták eltérő szekvenálási mélységének figyelembevételével egymillió teljes olvasatra

vetített értékké (reads per million, RPM) normalizálhatók. A reagens- és környezeti háttér hatásának becslésére alkalmazható az RPM-ratio (RPM-r), amely a klinikai mintában és a negatív kontrollban mért taxonspecifikus RPM-értékek hányadosa; egyes validált klinikai mNGS-pipeline-okban baktériumok és gombák esetében a negatív kontrollhoz viszonyított legalább tízszeres dúsulást alkalmazták riportálási kritériumként (21,90). A technikai hamis pozitivitást a genomlefedettség horizontális eloszlásának elemzésével szűrik ki, mivel a valódi fertőzéseket a genom különböző régióiból származó, egyenletesen elszórt readek igazolják, míg a kontaminációt egy-egy konzervált szakasz dominanciája jelzi. A diagnosztikai súlyozás során a steril mintáknál a szoftverek a klinikai riasztási küszöböt a minimumra csökkentik, így bizonyos kiemelt patogének, mint a *Mycobacterium tuberculosis* vagy a neurotrop vírusok esetén akár egyetlen specifikus read is diagnosztikai értékkel bírhat (52,64,91). Ezzel szemben a nem-steril mintáknál abundancia- és kompozíció-alapú szűrést végeznek, ahol a patogénnek el kell érnie a mintában jelen lévő teljes mikrobiális nukleinsavtömeg legalább 1–5%-át ahhoz, hogy ne flóratagnak, hanem releváns kórokozónak minősüljön (65,92). Az interpretáció legfelsőbb szintje a multidiszciplináris validáció, amelyet egy bioinformatikusból, klinikai mikrobiológusból és a kezelőorvosból álló szakértői csapat végez, amely a bioinformatikai leleteket mindig a beteg aktuális klinikai képével, immunstátuszával, gyulladásos paramétereivel és képalkotó leleteivel hasonlítja össze (15,30,34). A klinikai metagenomika legújabb nemzetközi kutatási és fejlesztési irányvonalai már túlmutatnak a puszta patogén-azonosításon, és komplex, hibrid megközelítéseket integrálnak az interpretációs folyamatba. Ezek közül az egyik legjelentősebb a gazdaszervezet immunválaszának transzkriptomikai profilozása, amelynek során a patogénszekvenálással párhuzamosan a beteg RNS-expressziós mintázatát is mérik ugyanabból a mintából. E humán génexpressziós mintázatok elemzése hozzájárulhat az aktív fertőzés és az inaktív DNS-töredékekből vagy háttérkontaminációból származó jel elkülönítéséhez, mivel például az interferon-útvonalak fokozott aktivitása gyakran virális fertőzésekhez, míg a neutrofil és inflammaszóma-aktiváció bakteriális fertőzésekhez társulhat (93,94). Az mNGS egyik legnagyobb ígérete az antimikrobiális rezisztenciagének (AMR) tenyésztéstől független, átfogó feltérképezése. Ugyanakkor a genotípos jelenlét nem feltétlenül korrelál a fenotípos rezisztenciával. A detektált rezisztenciagén nem biztos, hogy kifejeződik (hiányzó promóter vagy regulációs zavar

miatt), illetve a szekvenciaalapú szűrés nem képes azonosítani az új, még nem annotált rezisztenciamechanizmusokat vagy a pontmutációk okozta csökkent érzékenységet (95,96). Fontos terület a mesterséges intelligencia és a gépi tanulási algoritmusok alkalmazása az interpretációs problémák és az adatbőség jelentette akadályok áthidalása érdekében. Ezek a modellek képesek például a mintában detektált rezisztencia- és virulenciafaktorokat összevetni a kórházi elektronikus kórtörténeti adatbázisokkal, automatikusan kiszűrve és hátrasorolva a klinikai tünetekkel vagy kórképpel össze nem egyeztethető flóraelemeket és adatokat (95). Végezetül a szakirodalom kiemeli a szigorúan kurált, folyamatosan frissített referencia-adatbázisok fontosságát, amelyek megkövetelik, hogy a bioinformatikai szoftverek a readeket kizárólag a patogének fajspecifikus, egyedi genomi régióira illesszék rá, radikálisan csökkentve a közeli rokon fajok közötti szekvencia-homológiákból adódó téves illesztések, így a téves pozitív, vagy akár a téves negatív (dark matter-típusú) leletek arányát (9,21). A kimagasló diagnosztikai értéke ellenére az mNGS széles körű rutinszerű klinikai bevezetését jelenleg jelentős egészséggazdasági és szabályozási korlátok is nehezítik. A szekvenálás magas közvetlen költsége, a speciális bioinformatikai infrastruktúra és szaktudásigény, valamint a szabványosított reagenskészletek (CE-IVD / FDA jóváhagyások) hiánya miatt a módszer egyelőre leginkább akkreditált referencia-laboratóriumokban érhető el. Ugyanakkor a korai és pontos diagnózis által megtakarított intenzív osztályos ápolási napok és a célzottabb terápia révén az mNGS hosszabb távon költséghatékony alternatívát jelenthet a súlyos, nem tisztázott eredetű kórképekben (9,21).

1.4 A metagenomikai szekvenálás szerepe az emerging és magas biológiai kockázatú kórokozók diagnosztikájában

A WHO 2018-ban vezette be a „Disease X” fogalmát azon felismerés alapján, hogy a közeljövőben jelentős járványt vagy pandémiát valószínűleg egy jelenleg még ismeretlen, vagy csak korlátozottan ismert kórokozó is okozhat (13,97,98).

Ennek megfelelően a modern diagnosztikai rendszerek egyik legfontosabb feladata olyan módszerek alkalmazása, amelyek nem kizárólag előre ismert célpontok kimutatására alkalmasak, hanem képesek váratlan vagy korábban nem ismert ágensek felismerésére is (99). A hagyományos diagnosztikai algoritmusok jellemzően előre definiált kórokozók kimutatására alkalmasak, ezért új, rekombináns, zoonotikus eredetű vagy genetikai

átrendeződésen átesett ágensek esetében a diagnózis késhet, vagy akár el is maradhat (20,97,100,101). Ez a képesség nem korlátozódik a vírusokra: a magas biológiai kockázatú bakteriális kórokozók (*Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Brucella* spp., *Francisella tularensis*, *Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei, Rickettsia* spp., *stb.*) esetében a ritka előfordulás és a nem-specifikus tünetek miatt a rutin laboratóriumok korlátozott diagnosztikai tapasztalattal rendelkeznek (102–105). Az mNGS lehetővé teszi ezen baktériumok tenyésztéstől független kimutatását, molekuláris törzstipizálását, valamint rezisztencia- és virulenciagénjaik feltérképezését, ami elengedhetetlen a járványügyi kapcsolatok tisztázásához (103).

A környezeti és zoonotikus bakteriális ágensek (pl. *B. pseudomallei*, *NTVC*, rickettsiák) emelkedő incidenciája mutatja, hogy a jövő emerging fenyegetései nem kizárólag vírusos eredetűek (106).

Magas biológiai kockázatú kórokozók esetében az mNGS kettős jelentőséggel bír. Egyrészt gyors etiológiai azonosítást biztosíthat megfelelő biobiztonsági körülmények között, másrészt lehetőséget ad a genomikai karakterizálásra, variánsazonosításra és filogenetikai elemzésre, amely alapvető a járványügyi forráskutatás és a terjedési láncok feltérképezése szempontjából. A módszer jelentőségét jól mutatja, hogy kulcsszerepet játszott a SARS-CoV-2 genomjának korai meghatározásában, valamint az azt követő globális genomikai surveillance-rendszerek kialakításában (20,88,97,100,101).

Magas biológiai kockázatú kórokozóknál az mNGS kettős szerepet tölt be: biobiztonsági körülmények között gyors etiológiai diagnózist ad, emellett mélyreható genomikai karakterizálást és filogenetikai elemzést biztosít a járványügyi forráskutatás és a terjedési láncok feltárásához (21). Ugyanakkor az emerging és magas kockázatú kórokozók metagenomikai kimutatása szigorú bioinformatikai validációt, adatminőség-ellenőrzést és szigorú biobiztonsági protokollokat igényel. A háttérkontamináció, a referencia-adatbázisok hiányosságai és az új ágensek taxonómiai besorolási nehézségei továbbra is kihívást jelenthetnek (21,41).

Mindezek ellenére a genomikai surveillance és a metagenomikai diagnosztika integrációja a pandémiás felkészültség, a biológiai veszélyhelyzetek elhárítása és a nemzetközi egészségbiztonság stratégiai komponense (13,20,88,97,101) .

1.5 *Burkholderia pseudomallei* infekciók azonosítása újgenerációs szekvenálással Magyarországon

1.5.1 *Burkholderia pseudomallei* evolúciója és járványtana

A jelenleg több mint 130 fajt magába foglaló *Burkholderia* genus filogenetikai alapon két fő csoportra osztható: a *B. pseudomallei* komplexre (BPC) és a *Burkholderia cepacia* komplexre (BCC). A BPC-be tartozik a *B. pseudomallei*, a *B. mallei*, a *B. thailandensis*, a *B. oklahomensis*, a *B. humptydooensis*, a *B. singularis*, valamint az újonnan leírt *B. mayonis* sp. nov. és *B. savannae* sp. nov. (107,108). A BCC tagjai elsősorban opportunista kórokozók, különösen immunszuprimált betegekben, így például cisztás fibrózisban szenvedők körében bírnak jelentőséggel (109). Egyes, egyik komplexbe sem sorolt *Burkholderia* fajok, például a *B. gladioli* szintén okozhatnak humán infekciót (110) .

A biológiai biztonsági szempontból 3-as kockázati csoportba (risk-group-3, RG-3) tartozó *B. pseudomallei* a melioidosis kórokozója. A *B. mallei*-vel együtt az Egyesült Államokban „Tier 1 Select Agent" besorolású, ami a magas patogenitásra, a laboratóriumi expozíciós kockázatra és a potenciális bioterror ágensként történő felhasználhatóságra utal (111). Környezeti baktériumként kiemelkedő adaptációs képességgel rendelkezik, hosszan fennmaradhat vízben, nedves környezetben és különféle mesterséges közegekben, ami hozzájárulhat perzisztenciájához és földrajzi terjedéséhez (112–115).

A kórokozót Alfred Whitmore és C. S. Krishnaswami azonosította 1911-ben Mianmarban egy fatális kimenetelű morfint használó szepszisének hátterében (116). A melioidosis elnevezés 1921-ből Stanton és Fletcher nevéhez köthető (117,118). A betegséget sokáig trópusi, opportunista infekciónak tartották, azonban mára egyértelművé vált, hogy jelentősége jóval nagyobb, különösen az utazással összefüggő fertőző betegségek differenciáldiagnosztikájában (117,119–121). Filogenomikai vizsgálatok alapján a *B. pseudomallei* valószínűleg Ausztráliából származik, és történelmi migrációs, kereskedelmi és egyéb antropogén folyamatok révén terjedhetett el Ázsiában, majd Madagaszkáron, Afrikában és végül Amerikában (122–124).

Jelenlegi tudásunk szerint a világ 45 országában igazoltan endémiás, további számos országban írtak le sporadikus eseteket. Úgynevezett hiperendémiás területei Délkelet-Ázsia és Észak-Ausztrália, ahol a megbetegedések gyakorisága jellemzően az esős évszakhoz kapcsolódik (121,125,126). Az endémiás területeken az éves incidencia 4 -

41,7 eset/100 000 lakos között változik. Thaiföldön jelentik évente a legtöbb megbetegedést, átlagosan 2000-3000 esetet, ahol a közösségben szerzett bacteraemia 19%-át okozza (118,119,121,127,128) . Ausztrália trópusi északi részén a melioidosis történelmileg a leggyakoribb oka volt a halálos kimenetelű bacteraemiás tüdőgyulladásnak, de a diagnosztika, valamint a terápia fejlődésével a melioidosis okozta halálozás mára 10% alá csökkent (118,119,121,128–130). Európában évente általában 1-10 eset fordul elő elő (131). Jelenleg nem tartozik az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (ECDC) felé rutinszerűen jelentendő kórokozók közé. Hazánkban a 18/1998. (VI. 3.) NM rendelet „a fertőző betegségek és a járványok megelőzése érdekében szükséges járványügyi intézkedésekről" 6-os számú melléklete értelmében jelentendő kórokozó. A *B. pseudomallei*-t eddig több mint 50 állatfajban írták le (132,133). A mezőgazdasági állatok és a globális állatkereskedelem szerepet játszhat a terjedésében, így az „Egy Egészség" szempontjából is kiemelt jelentőségű (134–138).

1.5.2 *Burkholderia pseudomallei* genomikai jellemzői és patogenezise

A *B. pseudomallei* nagyméretű, mintegy 7,2 Mb-os, két kromoszómából álló genommal rendelkezik, és nagy fokú genetikai rekombináció jellemzi (139). A nagy kromoszómán (~4,03 Mb) az alapműködéshez, így a metabolizmushoz, replikációhoz szükséges gének, míg a kis kromoszómán (~3,17 Mb) a környezeti alkalmazkodásért felelős gének kódoltak (139). Az összehasonlító genomikai vizsgálatok nagyobb mértékű génsorrend-megőrződést és nagyobb számú ortológ gént mutattak ki a nagy kromoszómán, ami arra utal, hogy a két replikonnak alapvetően eltérő evolúciós eredete van. A genomban változó mennyiségben genomikus szigetek (Genomic Island, GI) találhatók, amelyek együttesen a genom akár 6,1%-át is kitehetik (139,140). Érdekesség, hogy a klonálisan génredukcióval létrejött *B. mallei*-ből ezek teljesen hiányoznak. A GI régiók gyakran hordoznak olyan virulenciafaktorokat, antibiotikum-rezisztencia géneket vagy speciális anyagcsere-útvonalak génjeit, amelyek evolúciós előnyöket biztosítva növelik a baktériumok alkalmazkodóképességét (139). A plazmidok jelenléte ritka, ugyanakkor a genomban fág eredetű (profág) elemek is megtalálhatók, amelyek a genetikai variabilitást és az adaptációs képességet növelik és virulenciagéneket is hordozhatnak (139). Az integratív konjugatív elemek kromoszómába épült, mobil genetikai egységek, amelyek horizontális génátvitelt tesznek lehetővé, és szerepet játszhatnak az alkalmazkodásban és az antimikrobiális rezisztenciában. A *B. pseudomallei* számos, a virulenciáért felelős gént

hordoz, amelyek lehetővé teszik számára a környezeti stresszhatásokkal szembeni ellenállást, valamint azt, hogy a gazdaszervezetben perzisztáljon és rendkívül változatos klinikai megjelenési formákat idézzen elő (141,142).

A patogenezis kulcseleme a fakultatív intracelluláris életmód. A baktérium a gazdasejtekhez kötődik, internalizálódik, majd a 3-as típusú szekréciós rendszer (Type 3 secretion system, T3SS) segítségével kijut a vakuólumból a citoplazmába, ahol szaporodik. A BimA-mediált aktinpolimerizáció révén sejtről sejtre terjed, míg a 6-os típusú szekréciós rendszer (Type 6 secretion system, T6SS) hozzájárul a többmagvú óriássejtek, úgynevezett szincíciumok kialakításához és az intracelluláris perzisztenciához (143). Ezek a mechanizmusok elősegítik az immunrendszer elkerülést, a hematogén disszeminációt és a recidívahajlamot. A fertőzés klinikai kimenetele és prognózisa összefüggést mutathat az egyes virulenciafaktorok jelenlétével, kombinációjával vagy hiányával, ideértve a kapszulát, a pilust, a flagellumokat, a lipopoliszacharidot (LPS), a quorum-sensing rendszer elemeit, a T3SS és a T6SS elemeit, valamint különböző exotoxinokat. A T3SS virulenciában szerepet játszó fehérjéi közé tartoznak a *Burkholderia* külső fehérje (*Burkholderia* outer protein, Bop) család tagjai, például a BopE és BopA effektorfehérjék, valamint a *Burkholderia* inváziós fehérje (*Burkholderia* invasion protein, Bip) család tagjai, köztük a BipB, BipC és BipD, amelyek a T3SS működésében, a gazdasejtbe történő bejutásban és az intracelluláris túlélésben játszanak szerepet. A *B. pseudomallei* további virulenciafaktora a dermonekrotikus toxin (dermonecrotic toxin, ToxA), amely hozzájárulhat a gazdaszövetek károsításához (139,141,142,144). A ToxA képes bejutni a gazdasejtekbe, ahol több alapvető sejtes folyamatot befolyásol, többek között a sejtciklus szabályozását, az aktin citoszkeleton dinamikáját és az apoptotikus útvonalakat. Ezeknek a mechanizmusoknak a zavara gyakran sejthalálhoz és kiterjedt szöveti károsodáshoz vezet, hozzájárulva a fertőzés súlyos, invazív lefolyásához (139). Egy további meghatározó virulenciafaktor a feltételezett autotranszporter fehérje, a *Burkholderia* intracelluláris motilitás A (*Burkholderia* intracellular motility A, BimA) fehérje, amely lehetővé teszi a *B. pseudomallei* és a *B. mallei* aktin-alapú intracelluláris motilitását. A BimA közvetíti a baktériumok sejtről sejtre történő terjedését, miközben elősegíti az intracelluláris túlélést és védelmet nyújt az autofágiával szemben (145,146). A *bim*A gén két fő allélváltozata közül a *B. mallei*-szerű *bim*A variáns jelenlétét a neuromelioidosis kialakulásának

fokozott kockázatával társították, míg a *B. pseudomallei*-ra jellemző *bim*A variáns esetében ilyen összefüggést nem igazoltak egyértelműen (145,147). A *B. pseudomallei* a II. típusú O-poliszacharid csoportba tartozik, és három fő LPS-típusa ismert (A, B és B2). Az LPS-típus meghatározásában részt vevő gének képesek a fenotípus módosítására anélkül, hogy a genotípus megváltozna, ami az immunelkerülés és az adaptáció szempontjából jelentős (148). Az A típusú LPS elsősorban Ázsiában fordul elő, a B típusú LPS Ausztráliában és Ázsiában egyaránt gyakori, míg a B2 típus elsősorban Ausztráliára jellemző (144). Az ITS tipizálás során az ITS régió szekvenciavariációi alapján teszi lehetővé az egyes *B. pseudomallei* törzsek elkülönítését, ami fontos eszköz az epidemiológiai vizsgálatokban és a fertőzési források nyomon követésében. Az ITS A típus jellemzően Délkelet-Ázsiából, különösen Thaiföldről és Malajziából származó izolátumokban fordul elő, míg az ITS B típus gyakrabban társul ausztrál izolátumokhoz. Az ITS C típus elsősorban Indiából és Ázsia más régióiból származó törzsekben figyelhető meg (146). A *B. pseudomallei* három filamentózus hemagglutinin B gén-t (*fha*B) tartalmaz, amelyek közül az *fha*B3 variáns jelenléte korrelál a pozitív hemokultúra tenyészetekkel, és negatív korrelációt mutat a lokalizált bőrfertőzésekkel, különösen szepszis hiányában (141,146). Emellett a Yersinia-szerű fimbria (YLF) és a *Burkholderia thailandensis*-szerű flagellum és kemotaxis (BTFC) génklaszterek eltérő földrajzi megoszlást mutatnak. Az YLF génklaszter elsősorban klinikai izolátumokban fordul elő, és ritkábban a környezeti mintákban, ami arra utal, hogy szerepet játszhat a humán fertőzések kialakulásában és annak súlyosságában (141,146,149).

1.5.3 *Burkholderia pseudomallei* klinikuma és terápiája

Gyakran „nagy imitátornak” nevezik és jelentős kihívást jelent a diagnosztizálása a nem endémiás területeken. A fertőzés lappangási ideje rendszerint 1–21 nap, ugyanakkor látens formában akár évtizedekig is fennmaradhat. A két hónapnál tovább perzisztáló tünetek esetén a fertőzést krónikusnak tekintik (127,150,151). A fertőzés tipikusan környezeti expozícióhoz kötődik, és elsősorban sérült bőrön keresztül, illetve inhaláció útján alakul ki. Emberről-emberre történő terjedése ritka, de leírtak vertikális átvitelt (szülés, szoptatás közben történő expozíció), szexuális terjedést, transzfúzióval és transzplantációval összefüggő eseteket is (152–154). A megbetegedés lehet zoonózis is (155). Az immunrendszer sok esetben nem képes megfékezni a fertőzést, ellenáll a veleszületett immunválasz komponenseinek, bár az interferon-γ fokozhatja a makrofágok

baktériumölő képességét. A fertőzés gyakran társul prediszponáló tényezőkkel (pl. diabetes mellitus, krónikus vesebetegség, alkoholizmus, immunszuppresszió), és leginkább 40–60 éves férfiakban fordul elő (104,131). Az endémiás területeken élő emberek már kisgyermekkoruktól ki vannak téve a fertőzésnek, szerokonverziójuk gyakran bekövetkezik, de ennek ellenére védtelenek maradnak a fertőzéssel szemben. A gyermekpopulációban a melioidosis leggyakrabban parotitis, vagy bőrfertőzés formájában jelentkezik (gyermekeknél körülbelül négyszer gyakrabban, mint felnőtteknél), míg felnőtteknél leggyakrabban tüdőgyulladás képében fordul elő (felnőtteknél körülbelül háromszor gyakrabban, mint gyermekeknél) (156).

A kórokozó főként hematogén úton terjed és elsősorban a tüdőt, a bőrt és a zsigeri szerveket (máj, lép, prosztata) érinti. Ezzel szemben a neurológiai érintettség (agyi tályogok, extradurális/subdurális tályogok, agyhártyagyulladás vagy encephalomyelitis) az esetek 1-4%-ban fordulhat elő, és jelentős morbiditással, valamint mortalitással jár (118–121,127,128). A specifikus tünetek hiányában feltehetően nem jelentenek minden neuromelioidosis esetet. A tüdőgyulladás jellemzően CAP, míg az akut szepszis néhány napos lappangási idő után fulmináns, közösségben szerzett szepszis (Community Acquired Sepsis, CAS) formájában jelentkezik, és egy-két napon belül halálhoz vezethet. Klinikailag nagyon nehezen különböztethető meg az endémiás területeken előforduló malária, dengue, tífusz, leptospirosis, gram-negatív bacteraemia, a *Staphylococcus* bacteraemia, az invazív pneumococcus fertőzéstől, az invazív meningococcus fertőzéstől, a *Yersinia pestis* és a *Vibrio vulnificus* okozta megbetegedésektől sem. A halálozási arány a múltban elérhette a 90-100%-ot is, de ma már ez korai empirikus antibiotikum-kezeléssel és intenzív terápiával 12–40% körüli szintre csökkenthető (120). A *B. pseudomallei* képes tartósan fennmaradni a gazdaszervezetben, amelyet intracelluláris túlélési mechanizmusai és különböző perzisztens fenotípusai is elősegíthetnek. Bár évtizedekkel az expozíció után jelentkező melioidosist hagyományosan latens fertőzés reaktivációjával magyarázták, újabb adatok alapján a valódi, hosszan tartó tünetmentes latenciából történő aktiváció ritka, és a korábban ilyennek tekintett esetek egy része valószínűleg fel nem ismert krónikus fertőzésnek felelt meg (119–121,157,158). Az újra fertőződés bármikor bekövetkezhet, mert nem alakul ki védettség a fertőzést követően (118,119,121,157). Ezen kívül egyes klinikai formák bizonyos földrajzi területeken kiemelkedően gyakoriak és eltérőek lehetnek: Ausztráliában például az urogenitális

fertőzések, a prosztata tályog és az encephalomyelitis flaccid paralysissel, míg Thaiföldön pedig a máj- és lép-tályogok, és a gennyes parotitis gyakori. (117,120,121,159). A nem specifikus laboratóriumi értékek között szerepel a megemelkedett C-reaktív protein (CRP) és az anaemia. Más Gram-negatív bacteraemiához hasonlóan, a neutrofil leukocitózis hiányozhat vagy enyhe lehet (118–121,160). A képalkotó vizsgálatok segíthetnek a diagnózis felállításában (pl. többszörös üreges konszolidációk, hepatosplenikus tályogok, psoas tályog). A legfrissebb kutatások szerint a mágneses rezonancia képalkotáson (MRI) látható jellegzetes tünet, amely segíthet a diagnózisban, az úgynevezett „tunnel" jel (a corticospinalis traktus hosszanti kontrasztjavulása). Ez hozzájárulhat az encephalomyelitis egyéb etiológiáitól (fertőzés utáni, autoimmun, paraneoplasztikus, vírusos stb.) való megkülönböztetéshez. (141,143,161,162).

A kezelés két fázisból áll: az első az úgynevezett intenzív fázis, amelynek célja a stabilizálás, a láz megszüntetése és a CRP-szint jelentős csökkentése. Ekkor intravénásan alkalmaznak ceftazidimet plusz meropenemet, imipenemet vagy cotrimoxazolt folsavval kombinálva 2–4 hétig (szükség esetén hosszabb ideig). Ezt követi az eradikációs fázis, amelynek célja az esetleges relapszusok megakadályozása. Ekkor általában két orális antibiotikum 12–20 hétig (szükség esetén hosszabb ideig) alkalmazandó, a kontraindikációk figyelembevételével. Rendszerint cotrimoxazol folsavval kombinálva, doxycyclin vagy amoxicillin-klavulánsav kerül alkalmazásra. A tályogokat lehetőség szerint sebészi úton kell kiüríteni. Az akut szepszis típusú fertőzések esetén a szepszis korai intenzív kezelése döntő fontosságú. A hajlamosító állapotok, például a cukorbetegség, a vesebetegség és az immunszuppresszió felismerése és rendezése kiemelt jelentőséggel bír (120,121,161,163,164). A *B. pseudomallei* fertőzésben a neutrofilek kulcsszerepet játszanak a baktérium elleni védekezésben. Súlyos melioidosisban megfigyelték, hogy az alacsony vagy funkcionálisan károsodott neutrofil aktivitás rosszabb prognózissal járhat (165). Ezért kiegészítő terápiaként megfontolandó lehet a granulocita-kolónia stimuláló faktor adása, amely a súlyos szepszis vagy szeptikus sokk kezelésénél alkalmazható és célja a csontvelőben a neutrofilek termelődésének, érésének és véráramba jutásának fokozása (165). A kórokozó számos antibiotikummal szemben természetes rezisztenciát mutat, például a penicillinekre (kivéve az amoxicillin-klavulánsavat), a harmadik generációs cefalosporinokra (kivéve a ceftazidimet), az aminoglikozidokra és a rifamicinekre. A kinolonok és a makrolidok esetében is írtak le

rezisztenciát (118,121,163). A bakterisztatikus antibiotikumok közül érzékeny a kotrimoxazolra és a tetraciklinekre (141,163). Jelenleg nincs elérhető törzskönyvezett védőoltás (120,121).

1.5.4 *Burkholderia pseudomallei* diagnosztikája

Hazánkban *a B. pseudomallei laboratóriumi* vizsgálatára és a melioidosis diagnosztikájára vonatkozó rendelkezéseket a 18/1998. (VI. 3.) NM rendelet szabályozza. A melioidosis jelenleg nem tartozik az egyedileg jelentendő fertőző betegségek közé, ugyanakkor a kórokozó már szerepel a rendelet 6. számú mellékletében. A melioidosis gyanújának felmerülésekor a klinikai mintákat a Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központ (NNGYK), Mikrobiológiai Referencia Laboratóriumi Főosztályának (MRLF), Veszélyes Bakteriális Kórokozók Nemzeti Referencia Laboratóriumába kell küldeni. A megbetegedés gyanúja esetén ajánlott több mintatípus párhuzamos vizsgálata. A fertőzés gyakran multifokális és a hematogén disszemináció is gyakori. Mivel a baktérium mennyisége egyes mintákban alacsony lehet (pl. CSF-ben, vizeletben, vagy akár vérben), a mikrobiológiai kimutatás érzékenysége korlátozott, ezért akár egyetlen pozitív minta is elegendő lehet a diagnózis felállításához. Diagnosztikára alkalmas az alvadásgátolt vér, valamint hemokultúra, biopszia, a postmortem szövetminta, sebváladék, köpet, bronchoalveolaris lavage (BAL), CSF, vizelet és széklet minta, lehetőleg még a terápia megkezdése előtt levéve (166). Amennyiben a kezelést megkezdték akkor is szükséges a mintavételezés, de a laboratóriumnak mindenképpen jelezni kell az előzetesen alkalmazott terápiát. Szerológiai vizsgálatra natív vér, szérum, vagy plazma küldhető.

A gyors laboratóriumi megerősítést különböző immunológiai módszerek is segíthetik, köztük a Hcp1 antigén kimutatásán alapuló laterális áramlási tesztek, a latexagglutinációs vizsgálatok, valamint a *B. pseudomallei* ellen termelt polivalens nyúlsavóval végzett agglutinációs tesztek. E vizsgálatok elsősorban tenyészetből származó izolátumok gyors azonosítására alkalmazhatók, azonban egyes esetekben közvetlen klinikai mintákból történő kimutatásra is használhatók. Az eredmények rövid időn belül rendelkezésre állnak, így hozzájárulhatnak a korai diagnózishoz és a megfelelő antimikrobiális terápia mielőbbi megkezdéséhez (118). A *B. pseudomallei* izolálása és további vizsgálata fokozott biológiai biztonsági intézkedéseket igényel, ezért nem endémiás területeken a kórokozóval végzett munka 3-as biológiai biztonsági szintű (Biosafety Level-3, BSL-3)

laboratóriumban történik. A diagnosztikát nehezíti, hogy a baktérium növekedése viszonylag lassú lehet, és polimikrobiális mintákban a kísérőflóra elfedheti vagy elnyomhatja a szaporodását. Emiatt gyakran szükség van speciális szelektív táptalajok, például Ashdown agar, módosított Ashdown agar, vagy *B. pseudomallei* szelektív agar (BPSA) alkalmazására (121,167).

A baktérium növekedése klinikai mintából általában legalább 48 óra elteltével tapasztalható. A kolóniamorfológia változatos, a jellegzetes ráncos felszín, a rohadt káposztára emlékeztető szag, valamint a biztosítótű-szerű mikroszkópos megjelenés felhívhatja a figyelmet a kórokozóra, de önmagában nem diagnosztikus (165,168). A tenyésztés jelentősége túlmutat a kórokozó izolálásán, mivel lehetőséget biztosít a fenotípusos azonosításra, az antimikrobiális érzékenység vizsgálatára, valamint a molekuláris epidemiológiai és teljesgenom-szekvenálási vizsgálatok elvégzésére is. Ez különösen fontos a fertőzési források felderítése, a törzsek rokonsági kapcsolatainak meghatározása és a nemzetközi terjedési mintázatok vizsgálata szempontjából. A nagyműszeres diagnosztikai módszerek alkalmazása során különös körültekintéssel kell eljárni, mivel a szakirodalomban beszámoltak már téves azonosításokról. A *B. pseudomallei* egyes automatizált azonosító rendszerekben, például a Vitek (BioMérieux, USA) használata során leggyakrabban *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii, Burkholderia cepacia*, *Chromobacterium violaceum* fajként kerül tévesen azonosításra. Azonosítási hibák Mátrix-asszisztált lézerdeszorpciós/ionizációs repülési idő tömegspektrometria (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF MS) rendszerekkel is előfordulhatnak, különösen nem megfelelő vagy hiányos referencia-adatbázis alkalmazása esetén (168).

A nem endémiás területeken a szerológiai módszerek rutinszerű alkalmazása korlátozott, a háttér-szeroprevalencia alacsony volta ellenére a keresztreakciók és a standardizáció hiánya miatt. A referencia laboratóriumokban ugyanakkor in-house indirekt immunfluoreszcencia, indirekt haemagglutináció gátlás, enzimhez kötött immunszorbens vizsgálat (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) vagy Luminex vizsgálatok is elérhetők (168). A molekuláris diagnosztika meghatározó eleme a valós idejű, vagy kvantitatív PCR (qPCR). A gyakorlatban jellemzően a T3SS-hez kapcsolódó célgénekre tervezett molekuláris vizsgálatok használatosak (169). Az izotermikus amplifikációs

módszerek, például a hurok közvetítette izotermikus amplifikáció (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) és a rekombináz-polimeráz amplifikáció (recombinase polymerase amplification, RPA), valamint az ezekkel kombinálható, klaszterezett, szabályosan köztes rövid palindrom ismétlődéseken (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) és CRISPR-asszociált fehérjéken, például a CRISPR-kapcsolt fehérje 12a nukleázon alapuló diagnosztikai eljárások új lehetőséget kínálnak a gyors molekuláris kimutatásra. E módszerek a jövőben a betegágy melletti (ún. point-of-care) diagnosztikában is jelentős szerepet tölthetnek be, bár klinikai validációjuk jelenleg még korlátozott (170). Az újgenerációs szekvenálási módszerek egyre nagyobb szerepet kapnak a *B. pseudomallei* vizsgálatában is. A kórokozó genomikai sajátosságai miatt a hibrid, azaz short-read és long-read- szekvenálási megközelítések különösen értékesek lehetnek (171).

1.6 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* infekciók azonosítása újgenerációs szekvenálással Magyarországon

1.6.1 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* evolúciója és járványtana

A *Vibrionaceae* család jelenleg hét genust foglal magában, köztük a *Vibrio* genust, amelybe közel 150 species tartozik. Ezek közül mintegy 12 bizonyítottan humán patogén. Filippo Pacini 1854-ben írta le a *Vibrio cholerae*-t, míg Robert Koch 1883-ban izolálta a kórokozót. John Snow 1854-es kolera járvány során tett epidemiológiai megfigyelései alapozták meg a víz közvetítette koleraterjedés felismerését, és ezzel hozzájárultak a modern járványtan kialakulásához (172,173). Klinikai szempontból a klasszikus koleratoxint termelő a *Vibrio cholerae,* a *Vibrio vulnificus*, a *Vibrio parahaemolyticus* és a *Vibrio alginolyticus* (174,175). A vibriók természetes élőhelyei az édesvízi, torkolati és tengeri környezetek, különösen a meleg, enyhén sós vizek. Előfordulásuk és incidenciájuk szoros összefüggést mutat a környezeti hőmérséklet emelkedésével, ezért az éghajlatváltozás a vibriózisok terjedése szempontjából kiemelt jelentőségű tényező és fontos indikátorai a környezet állapotának (175–177). A *V. choleraeV. cholerae* képes biofilmképzésre, valamint kedvezőtlen körülmények között úgynevezett élő, de nem tenyészthető állapotba (viable but non- culturable, VBNC) kerülhet. Ekkor a sejtek életképesek maradnak, de tenyésztéssel nem, vagy csak nehezen mutathatók ki, ami jelentősen nehezíti a diagnosztikát (175,178). A toxintermelő *V. choleraeV. cholerae*-vel

összefüggésben 1,4- 4,3 millió esetet jelentenek évente világszerte (151,179). Az Egyesült Államokban 1989-óta működik az országos Vibrio-surveillance (The Cholera and Other Vibrio Illness Surveillance, COVIS), 2024-ben 3,743 vibriózis esetet jelentettek, amelyből 156 laboratóriumilag igazolt NTVC által okozott megbetegedés volt (180). Bár a fertőzések pontos incidenciája nem ismert, mivel a legtöbb országban nem képeznek önálló jelentési kategóriát, az elmúlt két évtizedben a NTVC okozta megbetegedések számának folyamatos emelkedését írták le. Ez összefüggést mutat a felszíni vizek melegedésével, a part menti régiók antropogén átalakulásával, a globális élelmiszer-kereskedelem bővülésével, valamint a nyers tengeri ételek fogyasztásának terjedésével. Az immunkárosodott populáció növekedése szintén hozzájárul az esetek számának emelkedéséhez (181–186). Mindez már jól mutatja, hogy ezek már nem számítanak rendkívüli ritkaságnak, bár a legtöbb Vibrio-fertőzést még továbbra is más fajok (*V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) okozzák. Európában a Vibrio-fertőzések (nem csak NTVC, hanem valamennyi Vibrio) száma 2018 óta emelkedő tendenciát mutat a rendkívül meleg nyarak, az emelkedő vízhőmérséklet miatt, és az ECDC már külön figyelmeztetést is kiadott a Balti-tenger és az Északi-tenger térségére. Bár Európában a fertőzések jelentős része továbbra is tenger gyümölcsei fogyasztásához vagy tengervíz-expozícióhoz köthető, egyre több megbetegedést írnak le édesvizi tavakkal és folyókkal történt expozíció után is, többek között Ausztriában, Németországban, Szerbiában és Magyarországon (181–188).

1.6.2 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* genomikai jellemzői és patogenezise

A *Vibrio cholerae* patogenitása genomikai szempontból komplex és multifaktoriális. A *V. cholerae* két cirkuláris kromoszómából álló, plasztikus genommal rendelkezik, amelyet jelentős horizontális géntranszfer és rekombináció jellemez (189). A történelem során számos járványt okoztak már a különböző kolera törzsek. A klasszikus koleratoxint termelő törzsek fő virulenciafaktora a CTXφ bakteriofág által kódolt koleratoxin (*ctx*AB) és a Vibrio patogenitási sziget 1-en (VPI-1) található toxin-koregulált pilus (TCP), amely alapvető a vékonybél kolonizációjában. Az NTVC törzsek többsége ezeket nem hordozza, bár egyes szerocsoportokban, például az O75 és az O141 szerocsoportok esetében toxintermelő izolátumokat is leírtak, amelyek kisebb epidemiát okoztak (190). Genomikai vizsgálatok igazolták, hogy az O139 szerocsoport a hetedik pandémiás El Tor (7PET) második hullámából származik, és egy O1 7PET elődtörzsből alakult ki az O-

antigén génklaszter cseréjének eredményeként. Jelenleg több mint 200 szercsoportja ismert a *V.cholerae*-nek, amelyek többsége nem termeli a klasszikus kolera toxint. A törzsek gyakran képesek O-antigén cserére és jelentős genetikai diverzitást mutatnak, azonban önmagában az új szerocsoport kialakulása nem elegendő egy pandémiás vonal létrejöttéhez. A sikeres járványos klónok kialakulásához szükséges a megfelelő genetikai háttér (pl. a 7PET leszármazási vonal), valamint a kulcsfontosságú virulenciafaktorok, elsősorban a CTX-fág és a TCP jelenléte is. Ez magyarázza, hogy a legtöbb környezeti nem-O1, nem-O139 vonal epidemiológiai jelentősége korlátozott, ugyanakkor a 7PET-vonal folyamatos genomikai monitorozása elengedhetetlen az új, potenciálisan pandémiás szerocsoportok korai felismeréséhez (191). Az NTVC-izolátumokban a klasszikus koleratoxin helyett alternatív toxinok (akceszórikus kolera toxin, cholix toxin, zonula occludens, stb.) és egyéb olyan virulencia faktorok találhatók, amelyek növelhetik a patogenitását. A fontosabbak közé tartozik a *hly*A gén által kódolt hemolizin A, a MARTX/*rtx*A citotoxin, a *chx*A cholix toxin, a *hap*A hemagglutinin/proteáz, a *nan*H neuraminidáz, valamint a T3SS és a T6SS (183,190). A hemolizin A pórusformáló toxinként közvetlen sejtkárosító hatással rendelkezik, míg a MARTX toxin a citoszkeleton működésének megzavarásával és az immunsejtek funkcióinak gátlásával járul hozzá a baktérium túléléséhez és szervezeten belüli proliferációjában. A cholix toxin a fehérjeszintézis gátlásán keresztül citotoxikus hatást fejt ki, míg a HapA metalloproteáz elősegíti a szöveti terjedést és a gazdaszervezeti struktúrák károsítását. A T3SS és T6SS rendszerek effektorfehérjék transzportján keresztül hozzájárulnak az immunválasz modulálásához, a kolonizációhoz és a perzisztenciához. Az NTVC törzsek virulenciájában emellett fontos szerepet töltenek be a vasfelvételben részt vevő génrendszerek is. A siderofor-bioszintézishez és a vastranszporthoz kapcsolódó gének, köztük a *feoABC* operon által kódolt ferrovas (Fe^{2+}) felvételi rendszer, lehetővé teszik a baktérium számára a gazdaszervezet vasmegvonó környezetében történő túlélést és szaporodást, ami különösen jelentős lehet invazív fertőzések és bacteraemia során. Az NTVC törzsek genomikai diverzitása jelentős, patogenitásuk pedig mozaikos génkészletükből ered. A faj nyitott pan-genommal rendelkezik, amelyben a core genom az alapvető sejtműködéseket, míg az accessory genom a virulencia-, rezisztencia- és adaptációs tényezőket hordozza. A teljesgenom-szekvenálás ezért különösen hasznos a

virulencia- és rezisztenciaprofil komplex értékelésében, valamint a patogén potenciál pontosabb megítélésében (176,192,193).

A virulenciafaktorok jelenléte és kombinációja jelentős heterogenitást mutat az egyes NTVC törzsek között, és jelenlegi ismereteink szerint nincs egyetlen olyan marker, amely önmagában előre jelezné az invazív fertőzések kialakulását. A legfontosabb, irodalomban leírt virulenciafaktorokat a 2-es számú függelék tartalmazza.

Külön figyelmet érdemel az életképes, de nem tenyészthető (viable but nonculturable, VBNC) állapot. Célzott génexpressziós vizsgálatok szerint VBNC állapotban a globális stresszválaszhoz kapcsolódó gének, például *rpo*S (sigma faktor) mellett egyéb virulenciafaktorok, így a *hly*A, *rtx*A és *hap*A alacsony szinten továbbra is expresszálódhatnak. Ez arra utal, hogy a VBNC állapot nem a virulencia megszűnését, hanem annak adaptív módosulását jelenti, és egyben hangsúlyozza a tenyésztés független, molekuláris és metagenomikai módszerek jelentőségét a klinikai mikrobiológiában (194,195).

1.6.3 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* klinikuma és terápiája

Az NTVC törzsek világszerte egyre nagyobb klinikai jelentőséggel bírnak-egyrészt a klímaváltozás és a felszíni vizek hőmérséklet-emelkedése miatti gyakoribbá válásuk, másrészt a diagnosztikai módszerek fejlődésének köszönhető jobb felismerhetőségük révén. Bár ezek a törzsek nem rendelkeznek a klasszikus koleratoxin-termelő O1 és O139 szerocsoportokra jellemző pandémiás potenciállal, sporadikusan fordulnak elő, számos esetben súlyos vagy invazív fertőzést okozva. A klinikai megjelenést a behatolási kapu, a törzs virulenciaprofilja és a gazdaszervezet immunállapota egyaránt meghatározza (178,196–202). Az NTVC-fertőzések klinikai spektruma rendkívül heterogén: az enyhe gastroenteritistől kezdve a seb- és lágyrészfertőzéseken, otitisen és húgyúti infekciókon át egészen a bacteraemiáig, szepszisig vagy egyéb ritka extraintestinalis manifesztációkig terjedhet. Az NTVC-fertőzések súlyosabb lefolyásúak lehetnek a rizikócsoportba tartozók (immunkárosodott, idős, illetve krónikus, különösen májbetegségben szenvedő betegek) esetében (197). A megbetegedések kialakulása leggyakrabban tengeri vagy édesvízi expozícióhoz, illetve nyers vagy nem megfelelően hőkezelt tengeri eredetű élelmiszerek fogyasztásához köthető. Immunszupprimált betegekben, vagy krónikus alapbetegségek fennállása esetén invazív infekciók is kialakulhatnak (174,178,192).

A gastrointestinalis fertőzések rendszerint enyhe vagy középsúlyos lefolyású, önkorlátozó diarrhoeás megbetegedés formájában jelentkeznek. A tünetek közé hasi fájdalom, hányinger, hányás, vizes hasmenés és láz tartozhat. A klasszikus kolerára jellemző „rizslé-szerű" hasmenés ritkább, mivel a legtöbb NTVC törzs nem hordozza a koleratoxint kódoló *ctxAB* géneket. A klinikai kép azonban bizonyos esetekben súlyosabb lehet, különösen a rizikócsoportba tartozók esetében. Seb- és lágyrészfertőzések általában sérült bőrfelület vízzel történő érintkezését követően alakulnak ki, és cellulitis, nekrotizáló infekció vagy tályogképződés formájában jelentkezhetnek. A légúti manifesztációk rendkívül ritkák, azonban fulladásközeli (near-drowning) eseményeket követően primer pulmonalis fertőzés vagy aspirációs pneumonia kialakulását is leírták (198,203–205). Emellett előfordulhat otitis externa, conjunctivitis, cholecystitis, peritonitis vagy húgyúti fertőzés is (182,190,192,197,200,206).

Az invazív NTVC-fertőzések kiemelt klinikai jelentőséggel bírnak, mivel magas mortalitással társulhatnak. A bacteraemia és szepszis elsősorban immunszupprimált betegekben, hematológiai malignitás, diabetes mellitus, krónikus vesebetegség vagy májcirrhosis esetén fordul elő (207–209). A májbetegség különösen fontos rizikófaktornak tekinthető, mivel a vasanyagcsere zavara és a csökkent immunfunkció elősegítheti a Vibrio-fajok invazivitását (183,210). A szepszis gyors progressziójú lehet, hypotoniával, sokszervi elégtelenséggel és disseminált intravaszkuláris coagulopathiával társulhat. Az irodalmi adatok alapján az invazív NTVC-fertőzések mortalitása jelentős, különösen késői diagnózis vagy nem megfelelő antimikrobiális terápia esetén (180,211,212).

A terápia megválasztását a klinikai forma és a betegség súlyossága határozza meg. A terápiás döntéshozatalt nagyban megnehezíti az egyre inkább elterjedő antibiotikum-rezisztencia. A kromoszómális mutációk hozzájárulhatnak az antimikrobiális rezisztenciához, de a mobil genetikai elemek (pl. plazmidok, integronok) megszerzése, kulcsfontosságú mechanizmus a multidrog rezisztens (MDR) *Vibrio*-fajok kialakulásában (213,214).

1.6.4 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* diagnosztikája

Magyarországon a *Vibrio cholerae* okozta megbetegedések kivizsgálása során a klinikai mintát toxintermelő képesség vizsgálatára a 18/1998. (VI.3) NM rendelet alapján az NNGYK, MRLFO, Veszélyes Bakteriális Kórokozók Nemzeti Referencia

Laboratóriumába kell küldeni. A *Vibrio cholerae* a 2-es biológiai biztonsági szinten kezelendő kórokozók közé tartozik, ugyanakkor megtalálható az Egyesült Államok Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központja (CDC) által meghatározott úgynevezett piszkos 12 (Dirty Dozen) listán is, mint lehetséges bioterrorizmusra felhasználható fertőző ágens (151). A laboratórium számára küldendő mintatípusokat a tünetektől függően kell megválasztani. Ezek lehetnek széklet, sebváladék, hemokultúra, biopszia, CSF, vizelet, hüvelyváladék, punktátum. Extraintestinalis fertőzések esetén a széklet és natív vér beküldése minden esetben javasolt. A diagnosztika klasszikus 'gold standard' módszere itt is a tenyésztés. A baktérium Gram-negatív, oxidáz- és szacharóz pozitív, mikroszkópos képe hajlott, vesszőszerű. A szelektív tenyésztéshez tioszulfát-citrát-epesó-szacharóz agar (TCBS) és lúgos peptonvizes dúsítás együttes alkalmazása javasolt. TCBS táptalajon rendszerint 24 órán belül sárga telepek jelennek meg. A MALDI-TOF MS gyors azonosítást tesz lehetővé, de önmagában nem alkalmas a klinikailag jelentős szerocsoportok, egyes speciesek, így például a *Vibrio cholerae* és *Vibrio mimicus*, vagy a *Vibrio cholerae* és *Vibrio metschnikovii*, stb. biztos elkülönítésére. Az antibiotikum-érzékenységi vizsgálatokat az Európai Antimikrobiális Érzékenységvizsgálati Bizottság (The European Committee on Antimicribial Susceptibility Testing) aktuális ajánlásai szerint kell végezni (183,213,215).

A PCR- és qPCR-alapú diagnosztika lehetővé teszi a fajspecifikus és virulencia-asszociált gének gyors és érzékeny kimutatását. Fajazonosításra leggyakrabban az *omp*W gént, míg virulenciaértékelésre leggyakrabban a *ctx*A, *tcp*A, *hly*A, *rtx*A vagy *chx*A géneket vizsgálják (216).

A multiplex gastrointestinalis panel jellegű kereskedelmi forgalomban elérhető kitek lehetővé teszik számos kórokozó - így a *V. cholerae* - egyidejű detektálását, de körültekintően kell eljárni az értékelés során, mivel számos esetben ezek toxintermelő törzsek kimutatására vannak optimalizálva. Különösen fontos szerepe van a molekuláris módszereknek olyan esetekben, amikor előzetes antibiotikum-kezelés, vagy az esetleges biofilm képzés miatt a tenyésztés eredményessége csökken. A membránintegritáson alapuló DNS-kizárási módszerekkel (pl. PMA-qPCR) kombinált molekuláris eljárások lehetőséget adnak az életképes, de nem tenyészthető sejtek elkülönített kimutatására, ami környezeti és klinikai minták esetében egyaránt jelentős előnyt jelent. Az RNS-alapú módszerek (például reverz transtkripció qPCR) metabolikusan aktív sejtek detektálására

alkalmasak, de rutinszerű alkalmazásuk jelenleg korlátozott (194,195). Az izotermális amplifikációs technológiák, például a LAMP és az RPA, - akár mikrofluidikai, vagy biochip-alapú rendszerekkel kombinálva - gyors, érzékeny és potenciálisan terepi vagy járványügyi alkalmazásra is alkalmas módszerek lehetnek (217,218). Klinikai rutinban szerepük jelenleg kiegészítő jellegű. Hasonlóan ígéretesek a CRISPR/Cas-alapú módszerek, azonban ezek többsége még kísérleti, úgynevezett 'proof-of-concept' fázisban van. Az újgenerációs szekvenálási módszerek, különösen a teljesgenom-szekvenálás, a járványügyi nyomon követés, a virulencia- és rezisztenciaprofil komplex értékelése, valamint a pandémiás és nem pandémiás törzsek elkülönítése szempontjából bírnak kiemelt jelentőséggel (219).

A szerológiai módszerek, mint például az ELISA, az immunfluoreszcens tesztek vagy a gyöngy alapú, un. Luminex rendszerek elsősorban epidemiológiai, kutatási és differenciál-diagnosztikai célokra használhatók. Ezek olyan esetekben is értékes adatokkal szolgálhatnak, ahol a kórokozó már nem tenyészthető és nem mutatható ki molekuláris módszerekkel sem, így például endémiás területeken. Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy az NTVC törzsek klinikai diagnosztikájában önmagukban korlátozott értékűek, ezért akut fertőzések igazolásában a molekuláris, teljesgenom alapú- és tenyésztésen alapuló módszerek az elsődlegesek.

Összességében a *V. cholerae* fertőzések korszerű diagnosztikája integrált megközelítést igényel, amelyben a molekuláris módszerek biztosítják a gyors és érzékeny kimutatást, míg a szerológiai vizsgálatok elsősorban a járványtani és differenciáldiagnosztikai szempontokat támogatják, különösen a pandémiás és a nem-pandémiás törzsek elkülönítése során.

2. Célkitűzések

A doktori munka célja az ismeretlen etiológiájú fertőzések, valamint az emerging kórokozók diagnosztikájának fejlesztése újgenerációs szekvenálási módszerek alkalmazásával. Ennek keretében a következő célokat tűztem ki:

1. **A klinikai metagenomikai szekvenálás diagnosztikai teljesítményének vizsgálata különböző mintatípusokban**.
    - **i.** Súlyos légúti megbetegedésekből származó klinikai mintákból végzett metagenomikai szekvenálás módszerének bevezetése, eredményeinek értékelése, különös tekintettel a kórokozó-detektálási arányra, a polimikrobiális fertőzések azonosítására és a hagyományos qPCR módszerekkel való összehasonlítására.
    - **ii.** Ismeretlen etiológiájú megbetegedésekből származó, nem-légúti eredetű klinikai mintákból végzett metagenomikai szekvenálás módszerének bevezetése, eredményeinek értékelése, különös tekintettel a kórokozó-detektálási arányra, a polimikrobiális fertőzések azonosítására és a hagyományos módszerekkel való összehasonlításra.
2. **Izolátum-alapú teljesgenom-szekvenálás alkalmazása *Burkholderia pseudomallei* klinikai izolátumok molekuláris jellemzésére.**
    - **i.** A vizsgált izolátumok genomikai karakterizálása, beleértve az *in silico* MLST tipizálást, cgMLST-alapú összehasonlító analízist, valamint a virulencia- és rezisztenciagének azonosítását, ezzel hozzájárulva a kórokozó molekuláris epidemiológiájának és potenciális eredetének feltárásához.
3. **A Magyarországon izolált nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* izolátumok molekuláris jellemzése.**
    - **i.** Az emberi megbetegedésekhez köthető hazai *V. cholerae* izolátumok molekuláris és genomikai jellemzése, különös tekintettel a nem-O1, nem-O139 törzsek virulencia- és rezisztenciaprofiljára, valamint genetikai rokonsági viszonyaira.

3. Anyag és módszer

3.1 Klinikai metagenomikai szekvenálás

3.1.1 Légúti metagenomikai vizsgálatok

A vizsgálatok alapját a 2018–2025 közötti időszakban, a hazai légúti SARI surveillance keretében az NNGYK MRLF Légúti Vírusok Nemzeti Referencia Laboratóriumába beérkezett klinikai minták képezték. Egy olyan pilot vizsgálatot terveztünk, amelybe összesen 46 mintát vonhattunk be. A minták kiválasztása a rendelkezésre álló vizsgálati kapacitások figyelembevételével, előre meghatározott beválasztási kritériumok alapján történt. A beválasztási kritériumok közé tartoztak a klinikai tünetek, az esetlegesen rendelkezésre álló epidemiológiai adatok, a folyamatban lévő járványügyi vizsgálatok, valamint a beküldő intézmények által szolgáltatott anamnesztikus információk (például fatális kimenetel, elhúzódó, krónikussá váló infekcióra utaló megbetegedés, utazási anamnézis, potenciális zoonotikus kórokozó által okozott megbetegedés stb.).

A vizsgálatba bevont légúti minták közé nasopharyngealis törletek (n=43), trachea-aspirátumok (n=1), bronchoalveolaris lavage (BAL) minták (n=1), valamint szükség esetén légúti boncanyagok tartoztak (n=1). A nasopharyngealis törletminták vírus transzport médiumban (VTM), míg a trachea-aspirátum- és BAL-minták steril fiziológiás sóoldatban érkeztek a laboratóriumba. A kiválasztott SARI minták elemzéséhez felhasználtuk az NNGYK MRLF Légúti vírusok Nemzeti Referencia Laboratóriumában a surveillance program keretében korábban elvégzett légúti vírus PCR-vizsgálatok eredményeit (220).

3.1.2 Egyéb (nem-légúti) metagenomikai vizsgálatok

A potenciálisan súlyos, ismeretlen etiológiájú megbetegedések diagnosztikai kivizsgálása keretében a 2018–2025 közötti időszakban laboratóriumunkba kifejezetten metagenomikai vizsgálatra ’sürgős jelzéssel’ beérkezett, nem légúti eredetű klinikai mintákat vontunk be összesen 45 darabot. Ezek közé sebváladékok (n=8), vékonybél biopszia (n=1), nyirokcsomó punktátum (n=2) minták, boncanyagok (n=2), alvadásban gátolt, teljes vérminta (1), hemokultúra (n=1), hólyagbennék (1), cornea-kaparék (n=1), fülváladék (n=1) valamint CSF (n=25) tartoztak.

3.1.3 Légúti minták metagenomikai újgenerációs szekvenálása

A légúti mintákat első lépésben 1200 x g-n (kb. 4000 fordulatszámon (rpm)) 10 percig centrifugáltuk, majd a pelletet 500 µl 4% végső koncentrációjú szaponin (Sigma-Aldrich, USA) oldattal kezeltünk a humán sejtes komponensek lízise céljából. A kezelést követően a mintákat 8000 x g-n 5 percig centrifugáltuk, majd 500 µl mintát új, 1,5 ml-es Eppendorf csőbe mértünk át, amelyhez 10 µl HL-SAN nukleázt (ArcticZymes Technologies, Norvégia) adtunk puffer hozzáadása nélkül. Ezután thermomixerben 37 °C-on, 1000 rpm rázatás mellett 10 percig inkubáltuk. Ezt követően a mintákat 1200 x g-n 5 percig centrifugáltuk, majd 500 µl PBS-sel mostuk, és ismét 1200 x g-n 5 percig centrifugáltuk. A pelletből a nukleinsav-izolálást Chemagic™ 360 automatizált nukleinsav kivonó rendszerrel (Revvity, USA), és az ezzel kompatibilis chemagic Viral DNA/RNA Kit (Revvity, USA) használatával végeztük a gyártó protokollja szerint. Az RNS genommal rendelkező kórokozók kimutatására az eluált nukleinsavból kivettünk 4 µl-t (a többit -80°C-on tároltuk), majd reverz transzkripciót végeztünk 1 µl LunaScript RT SuperMix (New England Biolabs, USA) felhasználásával, random SISPA AB primerek jelenlétében a korábban publikált protokoll alapján BioRad T100 (BioRad, USA) thermocycler-ben (221). A reverz transzkripció reakció hőprofilja: 25 °C 10 perc, 55 °C, 95 °C 1 perc volt, majd a terméket 4°C-ra hűtötte a készülék. A reverz transzkripciót követően 1 µl RNase H (New England Biolabs, USA) / teljes termék térfogat RNase H kezelést alkalmaztunk 37°C-on 20 percig az RNS–DNS hibridek lebontására. A második DNS-szál szintézisét Sequenase Version 2.0 DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA) enzim segítségével végeztük 37°C-on 8 percig, majd 80 °C-on 8 percig az enzimet inaktiváltuk. A nem szelektív amplifikációhoz AccuTaq DNA Polymerase (Sigma-Aldrich, USA) enzimet alkalmaztunk a korábban publikált SISPA AB protokollnak megfelelően (221). Az alkalmazott hőprofil a következő volt: 94°C 3 perc egy cikluson át, majd 94 °C 30 másodperc, 55 °C 30 másodperc, 68 °C 1 perc 30 cikluson keresztül. A végső lánchosszabítás 68 °C 5 perc volt, a terméket pedig 10 °C-on tartotta a készülék. A terméket felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

Az amplifikációt követően a PCR-termékeket 1:1 arányban AMPure XP (Beckman Coulter, USA) mágneses gyöngyökkel tisztítottuk, 70%-os etanolos mosással eltávolítva a primereket, enzimeket és rövid fragmentumokat (222). A szekvenálást Illumina MiSeq (Illumina, USA) platformon végeztük 2 × 150 bp paired-end futtatással, Illumina MiSeq

V2 kémiát (Illumina, USA) alkalmazva a gyártói leírásoknak megfelelően, mintánként legalább 1 millió read generálásával.

3.1.4 Az egyéb klinikai minták metagenomikai újgenerációs szekvenálása

DNS metagenom végzése céljából a klinikai minták feldolgozására MolYsis™ Ultradeep Microbiome (Molzym GmbH & Co., Németország) kit került alkalmazásra a gyártó protokollját követve. Az eluált nukleinsavat felhasználásig –80 °C-on tároltuk. A DNS-en ezután többszörös szálkiszorításos amplifikációt (Multiple Displacement Amplification, MDA) végeztünk φ29 DNS-polimeráz (ThermoFisher Scientific, USA), alkalmazásával, 16 órán át 30 °C-on inkubálva, majd 3 percig 65 °C-on inaktiválva. Az MDA amplifikációhoz repliG midi kitet (QIAgen, USA) használtunk a gyártó alkalmazási előírásnak megfelelően. Ezt követően a mintákat szilárd fázisú reverzibilis immobilizáció segítségével (Solid Phase Reversible Immobilization AMPure XP (Beckman Coulter, USA) mágneses gyöngyökkel tisztítottuk, majd T7 endonukleáz (New England Biolabs, USA) segítségével emésztettük (debranching) 30 percig 37 °C-on inkubálva. Végezetül AMPure XP (Beckman Coulter, USA) mágneses gyöngyök segítségével 1,8x-os mennyiségben koncentráltuk és tisztítottuk a kapott nukleinsavakat. Párhuzamosan RNS metagenom kivitelezése céljából a klinikai mintákat Viral RNA kittel (Qiagen, Németország) is tisztítottuk, majd TurboDNAse (Thermo Fisher Scientific, USA) kezelésnek vetettük alá 37 °C-on 30 percig inkubálva a gyártói protokollokat követve. Ezután Lexogen Ribocop kittel (Lexogen, USA) eltávolítottuk a minták humán genom tartalmát a gyártói előírás szerint. Ezt követően a mintákat a légúti minták kezelése résznél ismertetett módon SISPA AB módszerrel amplifikáltuk (221). Az eluált amplikon termékeket –15 és –25 °C között tároltuk. A szekvenálás előkészítő lépéseként meghatároztuk a mintákban lévő dsDNS tartalmat Qubit HS kittel (Thermo Fisher Scientific, USA). A szekvenálásokat Oxford Nanopore technologies platformon, GridION, vagy MK1C készülékkel végeztük. A könyvtárkészítéshez Rapid barcoding kitet (Oxford Nanopore technologies, UK) használtunk, amennyiben a minta NS tartalma <200ng volt, illetve Native barcoding kitet (Oxford Nanopore technologies, UK) ha a minta input NS >200 ng volt. Mindkét esetben a gyártó által javasolt protokollt alkalmaztuk. A futási idő 72 óra, QC=9 és„High Accuracy basecalling” mód került beállításra. A basecalling Guppy (2024-ig a gyártói ajánlásnak megfelelően) / Dorado (2025-től a gyártói ajánlásnak megfelelően) szoftverekkel történt

3.1.5 A metagenomikai újgenerációs szekvenálás eredményeinek bioinformatikai analízise és az eredmények interpretációja

Az adapter-szekvenciák eltávolítását, valamint a minőségszűrést Trimmomatic (v0.39) szoftverrel végeztük. Az alacsony minőségű bázisok eltávolítására LEADING:3, TRAILING:3 és SLIDINGWINDOW:4:20 paramétereket alkalmaztunk, míg az 50 bázisnál rövidebb readeket kizártuk (MINLEN:50) (223). A taxonómiai besorolást a Kraken2 k-mer alapú algoritmussal végeztük. Az Illumina platformmal szekvenált légúti minták esetében a core-nt, míg a Nanopore platformmal vizsgált nem légúti minták esetében az nf-core referencia-adatbázist (letöltve: 2025. május) alkalmaztuk (224). A szekvenciaolvasatokat fajszintű taxonómiai kategóriákba soroltuk, amennyiben az egyértelmű hozzárendelés lehetséges volt. A Kraken2 által azonosított taxonok megerősítésére és a besorolás specificitásának növelésére a CCMetagen pipeline-t alkalmaztuk, amely konzervatív, referenciaalapú osztályozási stratégiát használ (224,225). Az elemzés során kizárólag a megfelelő minőségű és egyértelmű taxonómiai hozzárendeléssel rendelkező találatokat vettük figyelembe.

A különböző minták eltérő szekvenálási mélységének kiegyenlítésére a taxonspecifikus olvasatszámokat reads per million (RPM) értékekké normalizáltuk az alábbi képlet szerint:

RPM = (taxonspecifikus olvasatok száma / összes minőségszűrésen átesett olvasatok száma) × 10^6.

A reagens- és környezeti eredetű háttérkontamináció azonosítása érdekében minden szekvenálási batch-ben negatív kontroll mintát dolgoztunk fel. A negatív kontrollban észlelt taxonspecifikus háttér figyelembevételére a jelen vizsgálatban háttérkorrigált RPM-értéket (adjusted RPM, AdjRPM) definiáltunk, amelyet az alábbi képlet alapján számítottunk:

AdjRPM = max (0, RPM_minta − RPM_negatív_kontroll).

A légúti minták esetében, tekintettel a jelentős humán és mikrobiális háttérre, a bioinformatikai találatok értékelése során legalább 10 taxonspecifikus olvasat jelenlétét, a taxonómiai hozzárendelés CCMetagen segítségével történő megerősítését, valamint a negatív kontrollhoz viszonyított háttérkorrigált abundanciát (AdjRPM) vettük figyelembe. A negatív kontrollban is kimutatható taxonok esetében a háttérhez viszonyított dúsulást RPM-r értékkel is jellemeztük; az RPM-r ≥10 értéket a

szakirodalomban alkalmazott riportálási kritériummal összhangban erős bioinformatikai jelnek tekintettük (9,21,22). A végleges diagnosztikai interpretáció minden esetben a bioinformatikai eredmények, a mintatípus sajátosságai, valamint a klinikai és hagyományos mikrobiológiai vizsgálatok eredményeinek együttes mérlegelése alapján történt (9).

3.1.6 Illesztés, konszenzus-szekvencia hívás és variáns-analízis

A potenciálisan pozitívként értékelt találatok esetében a referencia-genomhoz történő illesztést (mapping) és a konszenzus-szekvenciák előállítását a CLC Genomics Workbench v12 szoftverrel (Qiagen, Németország) végeztük el.

A kládok és leszármazási vonalak azonosítását az *Alphainfluenzavirus influenzae*, *Betainfluenzavirus influenzae* (influenza A és influneza B vírus), a *Orthopneumovirus hominis* (human respiratory syncytial virus, RSV) és SARS-CoV-2, *Metapneumovirus hominis* (human metapneumovirus, hMPV) esetében Nextclade szoftverrel (v3.21.0) végeztük https://clades.nextstrain.org (226). Az influenza- és SARS-CoV-2-genomokban az antivirális rezisztenciával összefüggő mutációkat FluSurver (https://flusurver.bii.a-star.edu.sg/), illetve CoVSurver (https://gisaid.org/database-features/covsurver-mutations-app/) segítségével vizsgáltuk. Az RSV F génjében az RSVsurver (https://rsvsurver.bii.a-star.edu.sg/) segítségével a nirsevimabbal, palivizumabbal és clesrovimabbal szembeni csökkent érzékenységgel összefüggésbe hozott mutációkat kerestük. Az influenza- és RSV-eredményeket a francia ANRS Maladies infectieuses émergentes intézet vonatkozó adatbázisával (https://virusfrenchresistance.org/) a SARS-CoV-2-eredményeket pedig a Stanford Egyetem adatbázisával (https://covdb.stanford.edu/) vetettük össze.

A Nanopore platformmal szekvenált nem légúti minták minőségellenőrzését a Nanoq (v0.10.0) programmal végeztük (227).

3.1.7 A metagenomikai újgenerációs szekvenálási eredmények klinikai interpretációja

Mivel a klinikai metagenomikai vizsgálatok eredményeinek értékelésére jelenleg nem áll rendelkezésre egységesen elfogadott nemzetközi kritériumrendszer, a bioinformatikai pozitivitási küszöbök alkalmazását minden esetben klinikai és mikrobiológiai adatok integrált értékelése egészítette ki.

A detektált taxonok klinikai jelentőségének megítélése során az alábbi szempontokat vettük figyelembe:

- a taxonómiai azonosítás megbízhatóságát (Kraken2 és CCMetagen együttes megerősítése);
- a mikroorganizmus ismert patogenitását és a vizsgált mintatípusban betöltött klinikai jelentőségét;
- a referencia-genomra történő illeszkedés minőségét, a lefedettség szélességét (coverage breadth), mélységét (coverage depth), valamint a konszenzusgenom összeállíthatóságát;
- a negatív kontrollok eredményeit a háttérkontamináció kizárása érdekében;
- a beteg klinikai tüneteit, immunstátuszát, laboratóriumi és képalkotó vizsgálatainak eredményeit;
- a rendelkezésre álló hagyományos mikrobiológiai vizsgálatok (tenyésztés, célzott PCR, szerológia) eredményeit.

A steril és nem steril mintatípusok eltérő mikrobiológiai sajátosságai miatt eltérő interpretációs elveket alkalmaztunk. Steril minták (pl. CSF, vér vagy egyéb primeren steril testfolyadékok) esetében egy ismert patogén jelenlétét már alacsonyabb olvasatszám vagy AdjRPM-érték mellett is potenciálisan klinikailag relevánsnak tekintettük, amennyiben a negatív kontrollmintákban nem volt kimutatható. Nem steril minták (pl. felső és alsó légúti minták, sebváladékok) esetében a fiziológiás mikrobiota és a kolonizáció lehetősége miatt a ≥10 taxonspecifikus olvasattal rendelkező és taxonómiailag megerősített találatok klinikai jelentőségét minden esetben egyedileg bíráltuk el. Az értékelés során figyelembe vettük az AdjRPM-értéket, a negatív kontrollban is jelen lévő taxonok esetében az RPM-r értéket, továbbá a mikroorganizmus patogenitását, a mintatípus sajátosságait és a beteg klinikai állapotát (9,21).

Az mNGS-vizsgálatok végleges diagnosztikai értékelése minden esetben a laboratóriumi mikrobiológus szakemberek és a kezelőorvosok integrált, konszenzusos döntésén alapult (9,22).

3.2 A *Burkholderia pseudomallei* és nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* vizsgálatokban felhasznált izolátumok

3.2.1 *Burkholderia pseudomallei*

A referencia laboratóriumba 2008 és 2024 között három baktérium izolátum érkezett kórházi mikrobiológiai laboratóriumokból megerősítő vizsgálatra. Ezek közül kettőt *B. pseudomallei*-ként, egyet pedig *Pseudomonas aeruginosa*-ként azonosítottunk.

Az élő tenyészetekkel végzett vizsgálatokat az NNGYK, Nemzeti Biztonsági Laboratórium BSL-3 laboratóriumában végeztük. A szelektív tenyésztéshez Ashdown agart használtunk (NNGYK Táptalajkonyha), a szekvenáláshoz Luria-Bertani agaron (NNGYK Táptalajkonyha) történt a tenyésztés (167,228). A lemezeket 48 órán át, 37 °C-os hőmérsékleten, 5% széndioxid mellett inkubáltuk (167). A törzseket további vizsgálatok céljából −80 °C-on, fagyasztva tároltuk (229).

3.2.2 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae*

A vizsgálatba a 2018 és 2025 között a laboratóriumba beérkezett klinikai eredetű *V. cholerae* izolátumokat vontuk be. A beválogatás során egyaránt figyelembe vettük a feltételezetten autochton eredetű, valamint az utazással összefüggésben azonosított megbetegedésekből származó eseteket. A klinikai izolátumok mellett három környezeti eredetű (tóvízből származó), NTVC izolátumot is bevontunk (Vibrio-34, Vibrio-35 és Vibrio-36 jelzésű izolátumok), amelyek egy fulladás közeli eseménnyel összefüggésbe hozható természetes fürdővízből származtak. Az expozíció helyszínéről 2023 augusztusában, egy héttel az expozíciót követően akkreditált laboratórium vett vízmintát steril, 500 mL-es mintavételi palack segítségével, mintavevő rúddal, 30 cm-es vízmélységből. A mintavétel során hordozható műszerrel közvetlenül meghatározták a víz hőmérsékletét, elektromos vezetőképességét, pH-ját és oldottoxigén-tartalmát.

A vízmintából 1–100 mL közötti térfogatokat 0,45 µm pórusméretű, kevert cellulózészter membránszűrőkön (Ø 47 mm; Merck, Darmstadt, Németország) szűrtek át részünkre. A membránszűrőket ezt követően párhuzamosan TCBS agarra (Merck, Darmstadt, Németország) és Vibrio ChromoSelect Agar táptalajra (Sigma, Németország) helyeztük, majd 37 °C-on, aerob körülmények között 24 órán át inkubáltuk.

A membránszűrőkön megjelent jellegzetes baktériumtelepeket az ISO 8199:2018 szabvány előírásai szerint számláltuk, és az eredményeket telepképző egység/100 mL (CFU/100 mL) formájában adtuk meg (230).

Az előzetesen fagyasztott klinikai izolátumokat a teljes genomszekvenáláshoz Luria–Bertani agarlemezen (NNGYK Táptalakonyha) tenyésztettük 24 órán át, aerob körülmények között 37 °C-on (228).

3.3 *Burkholderia pseudomallei* és a nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* izolátumok identifikálása

A vizsgálatokba bevont *B. pseudomallei* és *V. cholerae* izolátumok tisztaságát és előzetes azonosítását MALDI-TOF MS módszerrel (Bruker Daltonics, Bremen, Németország) ellenőriztük. Az azonosításhoz a gyártó által biztosított, az aktuális standard adatbázisokat alkalmaztuk (adatbázis: v1-v07). A *B. pseudomallei* izolátumok esetében, trifluor-ecetsav (TFA) inaktiválási módszer alkalmazásával inaktiváltuk a mintákat szakirodalmi protokoll alapján (229). A *V. cholerae* izolátumok esetében a hagyományos, úgynevezett direkt átviteli módszert alkalmaztuk (229).

3.4 Molekuláris megerősítő vizsgálatok

3.4.1. *Burkholderia pseudomallei* molekuláris vizsgálatai

A DNS izolálását az izolátumokból a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Németország) alkalmazásával végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően. Molekuláris megerősítésére valós idejű PCR-vizsgálatot végeztünk, amely a T3SS-hoz tartozó orf2 gén kimutatására irányult (169). A mintákat két párhuzamosban mértük be, a qPCR mix az alábbiak alapján került összemérésre: 4 ul LightCycler TaqMan Master (Roche, USA), 0,125 ul 10 nM forward, 0,125 ul 10 nM reverse primer és 0,125 ul 4 nM próba, valamint 10,25 ul DNAse/RNAse mentes víz, valamint 5 ul templát DNS. Az alkalmazott hőprofil a következő volt: kezdeti denaturáció 95°C 10perc, majd 50 cikluson át 95°C 25 másodperc, 63°C 1 perc. A vizsgálatot LightCycler 2.0 (Roche, USA) készüléken végeztük el. Novak RT és munkatársai által publikált primerpár és a próba szekvenciáit használtuk (169). A qPCR-vizsgálatot minden izolátumon elvégeztük a tenyésztés és MALDI-TOF-alapú azonosítás megerősítésére.

3.4.2 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* molekuláris vizsgálatai

A DNS izolálását az izolátumokból a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Németország) alkalmazásával végeztük, a gyártó utasításainak megfelelően. A fajszintű azonosítást az *omp*W génre tervezett, kereskedelmi forgalomban elérhető *Vibrio cholerae* all subtypes kittel (PrimerDesign Ltd, UK), valós idejű PCR-vizsgálattal végeztük. A qPCR reakciót az alábbiak szerint mértük össze: 4 ul LightCycler TaqMan Master mix, 1 ul forward/reverse/próbát tartalmazó mix, valamint 10 ul DNAse/RNAse mentes víz, amelyhez 5 ul templát DNS-t adtunk hozzá. Az alkalmazott hőprofil a következő volt: kezdeti denaturáció 95°C 10 perc, amelyet 50 ciklus 95°C 10 másodperc denaturáció és 60°C 1 perc anelláció és amplifikáció követett, a vizsgálatot LightCycler 2.0 /LightCycler 480 készüléken végeztük. Az *omp*W marker alkalmas a *V. cholerae* fajszintű azonosítására és elkülönítésére más, klinikai jelentőségű *Vibrio* fajoktól, ugyanakkor önmagában nem teszi lehetővé a szerocsoportok, vagy a toxintermelő képesség meghatározását.

A toxintermelő törzsek kizárása céljából a koleratoxin A alegységét kódoló *ctx*A gén kimutatására in-house valós idejű PCR-vizsgálatot alkalmaztunk. A qPCR mixet az alábbiak szerint mértük össze: 4 ul LightCycler TaqMan Master, 0,125 ul 10 nM forward, 0,125 ul 10 nM reverse és 0,125 ul 4 nM próba, valamint 10,25 ul DNAse/RNAse mentes víz amelybe 5 ul templát DNS-t mértünk. Az alkalmazott hőprofilban a kezdeti denaturáció 94°C 2 perc volt, amelyet 50 ciklus 94°C 10 másodperc, 63°C 1 perc követett, majd a reakció hűtése 40°C-ra. A PCR vizsgálatokat LightCycler 2.0 / LightCycler 480 készüléken végeztük. A qPCR-ben Blackstone GM és munkatársai által publikált primer-próba szekvenciákat használtuk (216). A klasszikus koleratoxin termelő *V. cholerae* törzsekhez kapcsolódó virulenciamarkerek hiánya alapján a vizsgált izolátumokat NTVC törzsekként értékeltük. A molekuláris megerősítő vizsgálatokat a teljesgenom-szekvenálási eredményekkel összhangban értelmeztük.

3.5 *Burkholderia pseudomallei* és a nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* teljesgenom szekvenálása és bioinformatikai elemzése

A DNS izolálás az izolátumokból a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Németország) alkalmazásával történt, a gyártó utasításainak megfelelően. A minőségellenőrzést Qubit Flex (Thermo Fisher Scientific, USA) készüléken dsDNA High

Sensitivity kittel (Thermo Fisher Scientific, USA) végeztük. A DNS-könyvtárakat Illumina DNA Prep kit (Illumina Inc., USA) segítségével készítettük el, a gyártói protokoll módosítása nélkül. Az összevont könyvtárak mennyiségi meghatározását Qubit Flex készüléken (Thermo Fisher Scientific, USA), dsDNA High Sensitivity kittel (Thermo Fisher Scientific, USA) végeztük. A teljes genom szekvenálást Illumina MiSeq, vagy NextSeq550 platformokon (Illumina Inc., USA) hajtottuk végre. A szekvenálásokhoz MiSeq reagent kit 2-es verziójú, 300 ciklusos kittet, vagy NextSeq550 Mid- vagy High output kitteket (Illumina Inc., USA) használtunk, amelyek 2 × 150 bp hosszúságú úgynevezett paired-end szekvenálást tettek lehetővé. A bioinformatikai elemzésekhez a nyers olvasatokat (fastq) FastQC 0.12.0 verzióval ellenőriztük, és a 20 alatti Phred-értékkel rendelkező olvasatokat eltávolítottuk (223). A minőségalapú szűrést és trimmelést a TRIMMOMATIC 0.39 verziójával végeztük, míg a *de novo* genomszerelést a SPAdes 3.15.3 verziójával hajtottuk végre, a *careful* opció alkalmazásával a mismatchek korrigálása érdekében (231). A strukturális génpredikciót és a funkcionális annotációt a Bakta 1.11.3 verziójával, valamint a RAST szerver segítségével végeztük (232,233). A potenciális CRISPR–Cas rendszerek jelenlétét a CRISPRCasFinder 2.0.3 verziójával ellenőriztük (234). A virulencia- és rezisztenciaprofilokat a Ridom SeqSphere+ v8.0 kereskedelmi forgalomban elérhető szoftverben (Ridom SeqSphere+ GmbH, Németország) elérhető funkciók segítségével határoztuk meg. A virulenciagének értékeléséhez a kapott eredményeket összehasonlítottuk a Virulenciafaktor-adatbázisban elérhető szekvenciákkal (hozzáférés 2025.december 30.), >90%-os szekvencia azonosság és 100%-os lefedettség küszöbérték mellett (235).

Az elemzések a MyDBFinder 2.0 és a Ridom SeqSphere+ v8.0 szoftvererrel történtek (www.ridom.de, elérés: 2025. december 30.) (235). Az összeállított genomokat rezisztenciagének azonosítása céljából a Comprehensive Antibiotic Resistance Database és a ResFinder adatbázisok segítségével elemeztük. Csak azokat a rezisztenciagéneket fogadtuk el, amelyek lefedettsége meghaladta a 80%-ot, és az azonosságuk (az egyező nukleotidok aránya) nagyobb volt, mint 75% (236).

A *B. pseudomallei* esetében a további genom alapú tipizálását a Ridom SeqSphere+ v8.0 alkalmazásával végeztük. A *B. pseudomallei* szekvenciák összehasonlító cgMLST vizsgálat végzése céljából a korábban Lichtenegger és munkatársai által publikált sémát

alkalmaztuk (171). Az összehasonlító genomikai vizsgálatokhoz 410 darab *B. pseudomallei* genomot töltöttünk le az Egyesült Államok Nemzeti Biotechnológiai Információs Központjának (National Center for Biotechnology Information, NCBI) adatbázisából (3-as számú függelék). Referenciagenomként a nemzetközileg elfogadott K9624 szekvenciát használtuk (237). Az *in silico* MLST szekvenciatípusok meghatározásához a PubMLST webes szoftvert alkalmaztuk (http://pubmlst.org/bpseudomallei/, elérés: 2025. szeptember 30.) (238). Az in silico MLST-tipizálást az *ace* (acetil-koenzim-A-acetiltranszferáz), *glt*B (glutamát-szintáz nagy alegysége), *gmh*D (ADP-L-glicero-D-manno-heptóz-6-epimeráz), *lep*A (elongációs faktor 4), *lip*A (liponsav-szintáz), *nar*K (nitrát/nitrit transzporter) és *ndh* (NADH-dehidrogenáz) háztartási gének allélprofilja alapján végeztük. A rokonsági kapcsolatok meghatározásához minimális feszítőfa (Minimum Spanning Tree, MST) elemzést végeztünk. A páronkénti allélkülönbségek számításakor a hiányzó értékeket figyelmen kívül hagytuk. Az elemzéseket a Ridom SeqSphere+ szoftverrel készítettük, az ábrákat pedig az Interactive Tree of Life (iTOL) 7.2 programmal vizualizáltuk. Emellett a PubMLST adatbázisban elérhető 7510 *B. pseudomallei* izolátum szekvenciaadatait is elemeztük, és a két magyar izolátummal a GrapeTree 1.52.0 program segítségével hasonlítottuk össze (239). A két izolátumhoz kapcsolódó metaadatok megjelenítését és kinyerését szintén a GrapeTree 1.52.0 programmal végeztük

A *V. cholerae* esetében a genetikai kapcsolatok meghatározásához az általunk generált cgMLST (2415 definiált lókusz) sémát alkalmaztuk, és az analízist a Ridom SeqSphere+ v8.0 szoftver segítségével végeztük (219). A szekvenciatípusokat (ST) a PubMLST MLST adatbázis segítségével ellenőriztük. A teljes genomok összehasonlításához a PubMLST Genome Comparator modult alkalmaztuk (238). A rokonsági kapcsolatok szemléltetésére MST elemzést végeztünk, a hiányzó allélértékeket figyelmen kívül hagyva, az allélprofilokat pedig a GrapeTree program MSTree V2 algoritmusával ábrázoltuk (239). Az aspirációs pneumonia eset genomikai vizsgálatához a cgMLST-alapú összehasonlításhoz 101 általunk összeállított NTVC-genomot töltöttünk le az NCBI Genome adatbázisából. A kiválasztási kritériumok között szerepeltek a Magyarországgal szomszédos országokból származó izolátumok is. Az elemzésbe bevont genomok összefoglaló adatai a 4-es számú függelékben találhatók.

3.6 Alkalmazott statisztikai elemzések

A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism szoftverrel (verzió 10.5.0; GraphPad Software, San Diego, USA) végeztük. Az adatok feldolgozása során elsődlegesen leíró statisztikai módszereket alkalmaztunk. A kategorikus változókat abszolút esetszámmal és százalékos aránnyal, míg a folytonos változókat eloszlásuktól függően átlag ± szórás, illetve medián és tartomány formájában jellemeztük.

A klinikai metagenomikai vizsgálatok eredményeinek értékelése során meghatároztuk a pozitivitási arányokat, a kimutatott mikroorganizmusok taxonómiai megoszlását, valamint az egyes mintatípusokban azonosított klinikailag releváns kórokozók gyakoriságát. A célzott multiplex PCR és az mNGS eredményeinek összehasonlítását kizárólag a PCR-panelben szereplő légúti vírusokra végeztük el. A két módszer közötti pozitív egyezést kórokozónként a PCR-pozitív minták közül mNGS-sel is pozitívnak bizonyult minták arányaként határoztuk meg.

A nem légúti klinikai minták esetében a CSF-ből és az egyéb mintatípusokból származó minták pozitivitási arányának összehasonlítására, a kis elemszámra tekintettel, Fisher-féle egzakt próbát alkalmaztunk. A statisztikai szignifikancia határát $p < 0,05$ értékben határoztuk meg.

4. Eredmények

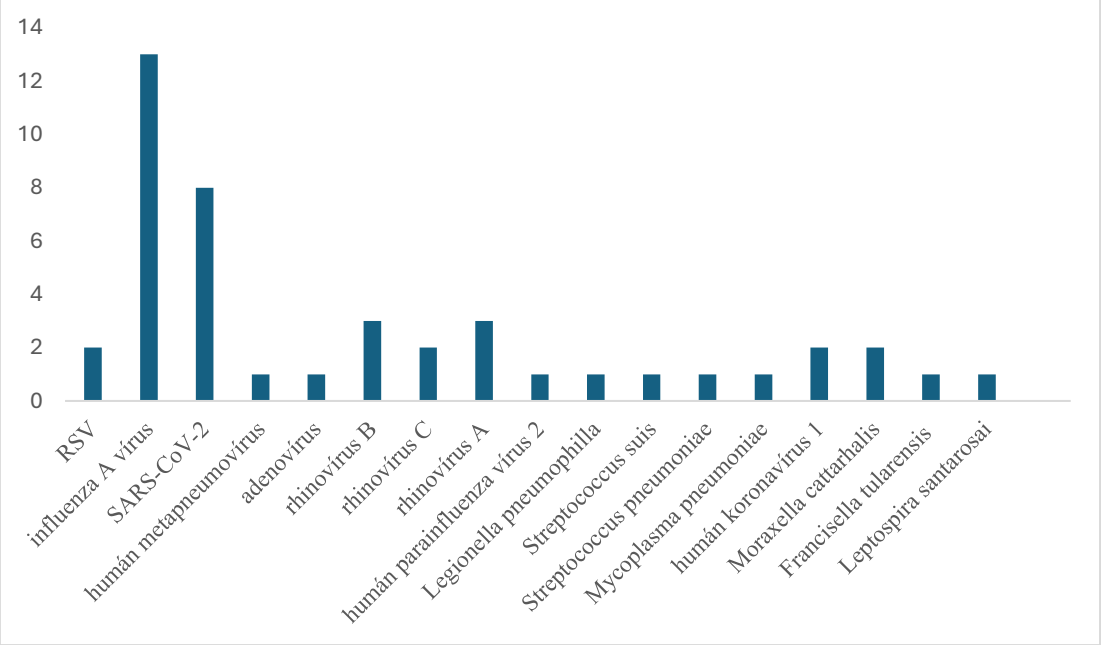
4.1 Klinikai metagenomikai vizsgálatok eredményei

4.1.1 Légúti metagenomikai vizsgálatok eredményei

A pilot vizsgálat során összesen 46, a SARI surveillance keretében beérkezett légúti mintát vontunk be a klinikai mNGS vizsgálatba. A vizsgálatba bevont minták szekvenálási eredményeit az 5-ös számú függelék, míg a főbb jellemzőit az 6-os számú függelék tartalmazza. Valamennyi mintatípus esetében megfelelő minőségű és mennyiségű szekvenálási adat állt rendelkezésre (≥1 millió read/minta).

4.1.1.1 Diagnosztikai eredmények

Az mNGS 36 mintában (78,3%) azonosított legalább egy potenciálisan klinikailag releváns kórokozót, míg 10 minta (21,7%) negatív eredményt adott (3-as ábra).



3. ábra Légúti minták metagenomikai új-generációs szekvenálásából származó eredmények

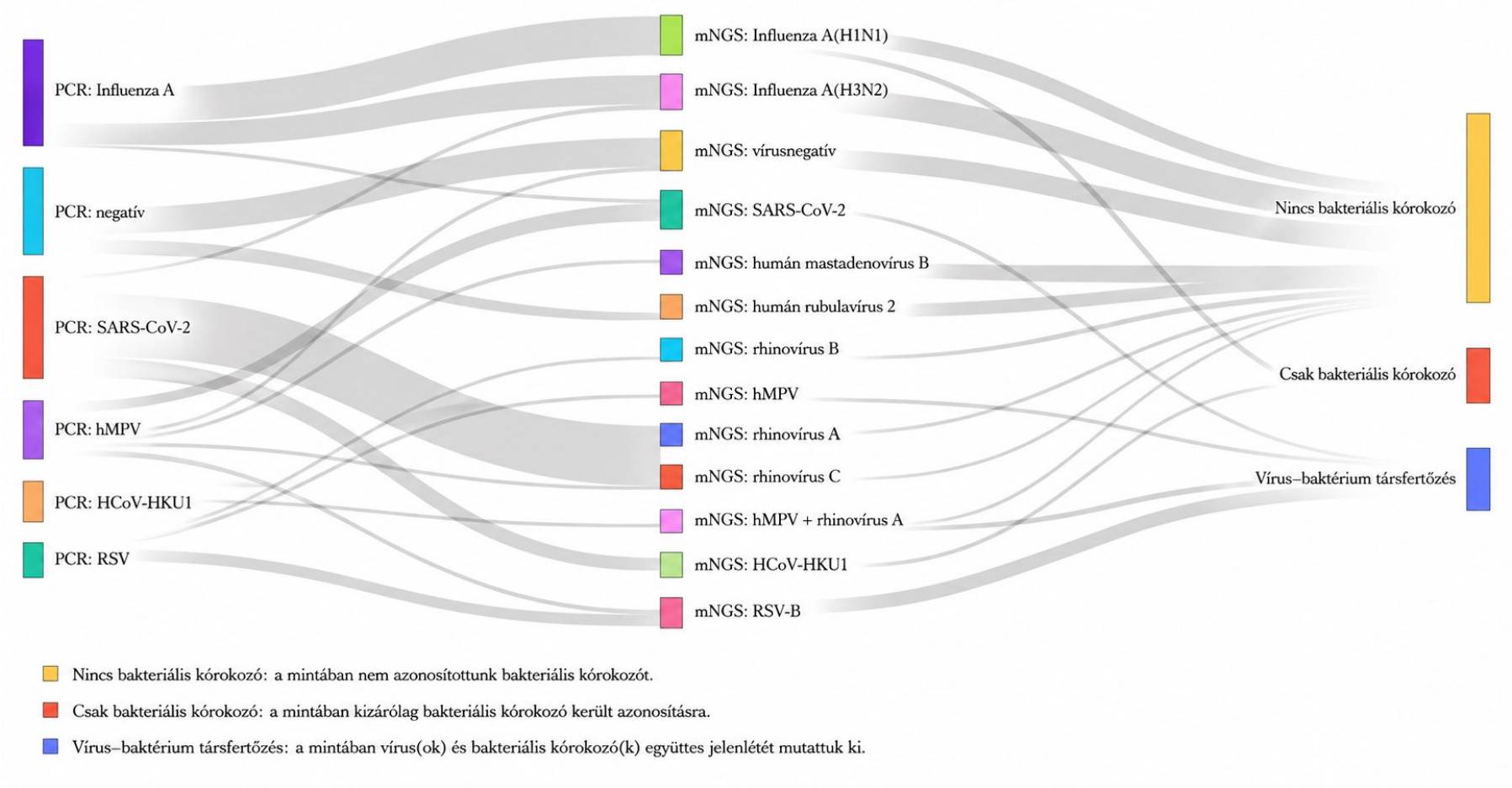
A kimutatott mikroorganizmusok között légúti vírusok és baktériumok egyaránt előfordultak, hét esetben pedig több kórokozó egyidejű jelenléte volt igazolható.

A leggyakrabban azonosított vírus a SARS-CoV-2 volt (n = 10), ezt követte az influenza A(H1N1)pdm09 (n = 9), az influenza A(H3N2) (n = 4), a *Rhinovirus* (rhinovírusok) (n =

4), a hMPV (n = 2), valamint egy-egy RSV-B, *Mastadenovirus blackbeardi (*humán mastadenovírus B, HAdV-B), humán rubulavírus 2 és *Betacoronavirus hongkongense* (Human coronavirus HKU1, HCoV-HKU1) fertőzés. A bakteriális kórokozók közül *Streptococcus pneumoniae* (n = 2), *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus suis* és *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* egy-egy, illetve két esetben voltak kimutathatók (4-es ábra). A vizsgálat során hét esetben feltételeztünk koinfekciót, amelyek közül öt vírus–baktérium, kettő pedig vírus–vírus együttes fertőzés volt. A leggyakoribb kombinációkat az influenza A vírusok bakteriális légúti kórokozókkal, illetve a SARS-CoV-2 és *Streptococcus pneumoniae* együttes jelenléte jelentette.

4.1.1.2 A célzott PCR-panel és a metagenomikai újgenerációs szekvenálási eredmények összehasonlítása

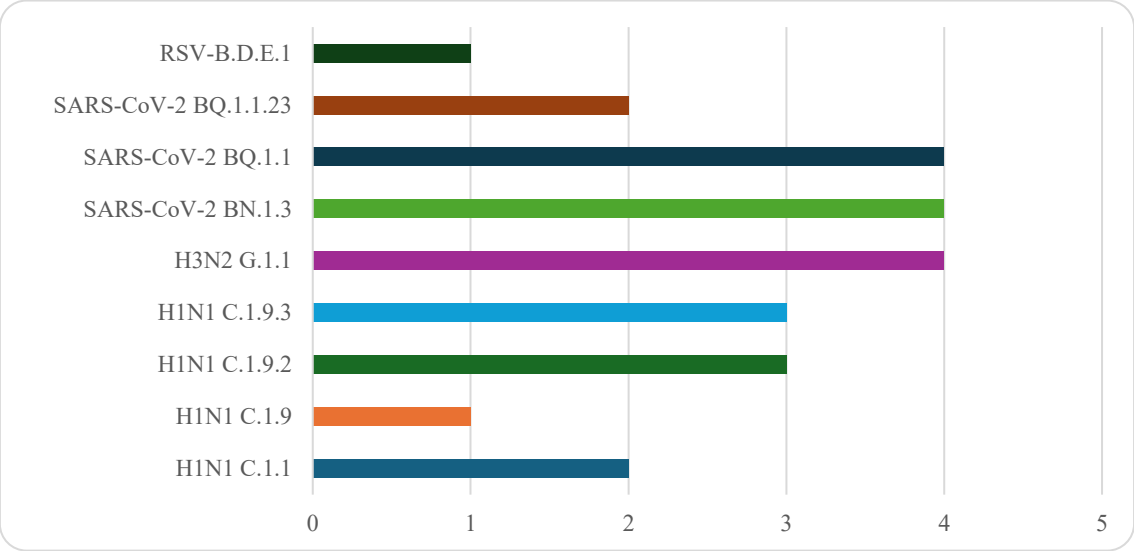
A célzott PCR-panel és az mNGS összehasonlítását kizárólag a PCR-panelben szereplő légúti vírusokra végeztük el. Ennek oka, hogy a multiplex PCR csak előre meghatározott vírusok kimutatására alkalmas, míg az mNGS hipotézismentes módszerként valamennyi jelenlévő mikroorganizmus egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé. Ennek megfelelően a PCR-panelben nem szereplő bakteriális kórokozókat nem tekintettük diszkordáns eredménynek a két módszer összehasonlítása során. A célzott vírus-PCR és az mNGS eredményei közötti kapcsolatot, valamint az mNGS által azonosított bakteriális státuszt a 4-es ábra szemlélteti. Az mNGS a PCR-rel igazolt vírusfertőzések túlnyomó részét megerősítette, emellett több esetben vírus-baktérium koinfekciót, illetve kizárólag bakteriális etiológia jelenlétét is kimutatta. Influenza A esetében a pozitív egyezés 85,7%, SARS-CoV-2 esetében 100%, RSV esetében 33,3%, míg humán metapneumovírus esetében 50,0% volt. Kilenc PCR-negatív mintában további potenciálisan klinikailag releváns kórokozókat azonosított, köztük *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, *Moraxella catarrhalis*, humán mastadenovírus B, humán rubulavírus 2, rhinovírusokat és HCoV-HKU1-et.



4. ábra: A célzott vírus-PCR, az mNGS víruskimutatási eredményei és az mNGS-sel azonosított bakteriális kórokozók összefüggése a vizsgált légúti mintákban.

4.1.1.3 Genomikai karakterizálás

A víruspozitív mintákból nyert genomszekvenciák lehetővé tették a kórokozók részletes karakterizációját (5-ös ábra).



5. ábra: Az mNGS-sel azonosított légúti vírusok klád- és lineage-megoszlása.

Az influenza A(H1N1)pdm09 törzsek valamennyi esetben a 6B.1A.5a.2a kládba tartoztak, amelyen belül a C.1.1 (n = 2), C.1.9 (n = 1), C.1.9.2 (n = 3) és C.1.9.3 (n = 3) alkládok voltak jelen. Az influenza A(H3N2) vírusok egységesen a 3C.2a1b.2a.2a.1b klád G.1.1 alkládjába sorolódtak. A FluSurver elemzése alapján egyik influenza A vírus genomjában sem volt kimutatható olyan mutáció, amely a laninamivirrel, peramivirrel, oseltamivirrel vagy zanamivirrel szembeni ismert antivirális rezisztenciával, illetve a magas patogenitású madárinfluenza-vírusokra jellemző adaptív változásokkal hozható összefüggésbe.

A SARS-CoV-2 pozitív minták elemzése során a BN.1.3 (n = 4), a BQ.1.1 (n = 4) és a BQ.1.1.23 (n = 2) leszármazási vonalak voltak azonosíthatók, amelyek megfeleltek a mintavételi időszakban Magyarországon és Európában domináló omikron variánsoknak. Az egyetlen RSV-B genom a B.D.E.1 kládba tartozott. Az RSVsurver-elemzés a vizsgált RSV-szekvenciák F génjében nem azonosított olyan ismert mutációt, amely a passzív immunizálásra alkalmazott nirsevimab, palivizumab vagy clesrovimab monoklonális ellenanyagokkal szembeni csökkent érzékenységgel hozható összefüggésbe.

A genomszintű elemzések eredményei igazolják, hogy a klinikai metagenomika nemcsak a kórokozók azonosítására alkalmas, hanem megfelelő nukleinsav-mennyiség esetén

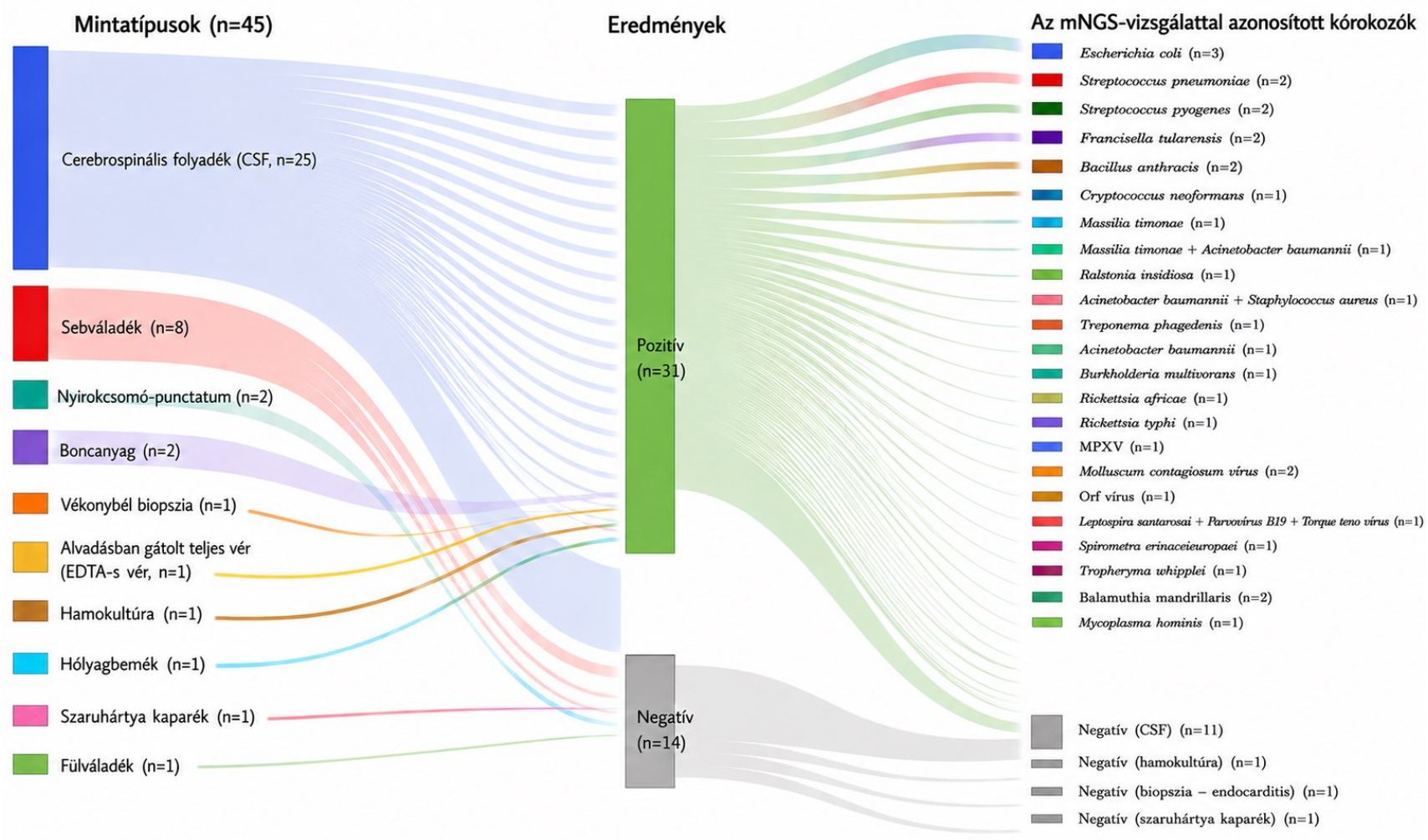
részletes molekuláris epidemiológiai és filogenetikai vizsgálatok elvégzését is lehetővé teszi, ezáltal egyetlen munkafolyamatban biztosítva a diagnosztikai és járványügyi szempontból releváns információk kinyerését.

4.1.2 Egyéb klinikai minták metagenomikai szekvenálásának eredményei

Összesen 45 nem légúti klinikai minta metagenomikai újgenerációs szekvenálási vizsgálata történt meg. A minták közül 25 CSF, míg 20 egyéb minta került vizsgálatra. A diagnosztikai eredmények összefoglalását a 6-os számú ábra mutatja be. Az összefoglaló szekvenálási adatok a 7-es számú függelékben, a vizsgálati minták összefoglaló adatai pedig a 8-as számú függelékben találhatók. A vizsgálatok során 31 minta (68,9%) esetében sikerült kórokozót kimutatni, míg 14 minta (31,1%) negatív eredményt adott. A pozitív minták között túlnyomórészt bakteriális eredetű fertőzések szerepeltek, azonban vírusok, gombák és paraziták is azonosításra kerültek, több esetben több mikroorganizmus együttes jelenlétét mutattuk ki.

A CSF minták közül 14/25 (56,0%) bizonyult pozitívnak. A leggyakrabban az *Escherichia coli* (n = 3), valamint a *Streptococcus* nemzetségbe tartozó kórokozók (*Streptococcus pneumoniae*, n = 2; *Streptococcus pyogenes*, n = 1) kerültek azonosításra. Emellett több ritka, klinikailag jelentős kórokozó is kimutatható volt, köztük *Cryptococcus neoformans*, *Massilia timonae, Ralstonia insidiosa*, *Treponema phagedenis*, *Balamuthia mandrillaris* és *Burkholderia multivorans.* Két CSF mintában polimikrobiális fertőzés gyanúja vetődött fel (*Massilia timonae* + *Acinetobacter baumannii,* illetve *Acinetobacter baumannii* + *Staphylococcus aureus*). A nem-CSF minták esetében a pozitivitási arány 85,0% (17/20) volt. Ezekből a mintákból több, differenciáldiagnosztikai vagy közegészségügyi jelentőségű kórokozó került azonosításra, köztük *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, *Bacillus anthracis*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia typhi*, Mpox vírus, orf vírus, Molluscum contagiosum vírus, *Leptospira santarosai*, *Spirometra erinaceieuropaei* és *Tropheryma whipplei*. A vizsgálatok között szerepelt Magyarország első majomhimlő megbetegedésének laboratóriumi megerősítése, utazással összefüggő rickettsiosisok, zoonózisok, valamint több ritka fertőző betegség diagnosztikája. Különösen figyelemre méltó volt egy fatális kimenetelű *Balamuthia mandrillaris* fertőzés, amelyet ugyanazon betegből származó CSF-ből és agyi boncanyagból is sikerült igazolni. Egy másik, szintén fatális kimenetelű esetben májszövetből *Leptospira santarosai*, parvovírus B19 és torque teno vírus együttes

jelenléte volt kimutatható. A vizsgálatok során továbbá sikerült azonosítani egy *Spirometra erinaceieuropaei* okozta KIR fertőzést, valamint egy *Tropheryma whipplei* fertőzést vékonybél-biopsziából. Az összesített pozitivitási arány 68,9% (31/45) volt. A nem-CSF minták esetében a pozitivitási arány magasabb volt, mint a CSF-minták esetében (85,0% vs. 56,0%); a kis elemszámra tekintettel alkalmazott Fisher-féle egzakt próba alapján azonban a különbség nem érte el a statisztikai szignifikancia előre meghatározott határát ($p = 0,054$).



6. ábra: A klinikai metagenomikai vizsgálatokba bevont egyéb minták diagnosztikai eredményeinek Sankey-diagrammal történő ábrázolása

4.1.3 Akut nekrotizáló encephalopathia metagenomikai újgenerációs szekvenálási eredményei

Az ANE iránydiagnózissal vizsgált hat betegektől összesen hat légúti és hat CSF minta került metagenomikai vizsgálatra. A légúti minták valamennyi esetben influenza A(H1N1)pdm09 vírust igazoltak, amelyek a 6B.1A.5a.2a kládba tartoztak. A FluSurver elemzés egyik vírusgenomban sem azonosított olyan mutációt, amely ismert antivirális rezisztenciával vagy magas patogenitású madárinfluenza-vírusokra jellemző adaptív változásokkal hozható összefüggésbe. Ezzel szemben a betegektől származó CSF-ok metagenomikai vizsgálata valamennyi esetben negatív eredménnyel zárult.

4.2 Magyarországon diagnosztizált *Burkholderia pseudomallei* fertőzések genomikai elemzésének eredményei

4.2.1 Magyarországon azonosított *Burkholderia pseudomallei* megbetegedések jellemzői

A 2008–2024 közötti időszakban 100 beteg klinikai mintái érkeztek *B. pseudomallei* irányú primer diagnosztikai vizsgálatra. Ezek valamennyi esetben negatív eredményt adtak. Ettől elkülönülten, megerősítő vizsgálat céljából három, más laboratóriumban izolált baktériumtörzset küldtek be, amelyek közül kettőt *B. pseudomallei*-ként, egyet *Pseudomonas aeruginosa*-ként azonosítottunk.

A két izolátum eltérő klinikai megjelenésű megbetegedésekből származott. Az első eset (584_2008_OEK) 2008-ban került felismerésre, indiai utazást követően, és súlyos, központi idegrendszeri érintettséggel járó megbetegedés formájában jelentkezett. A klinikai kép meningoencephalitissel, szepszissel, lázzal, gyengeséggel, fejfájással és facialis neuralgiával társult. A CSF vizsgálata emelkedett fehérjeszintet (1,69 g/L), magas sejtszámot (343/μL) és csökkent glükózszintet (2,8 mmol/L) mutatott, amely bakteriális etiológia mellett szólt. A klinikai mikrobiológiai vizsgálatokban végül a hetedik mintavétel vezetett eredményre, a tenyésztés pozitív lett. A beteg intenzív ellátásban részesült, majd célzott antimikrobiális kezelés mellett túlélte a fertőzést, ugyanakkor tartós neurológiai maradványtünetek alakultak ki.

A második eset (831_2019_NNK) 2019-ben, thaiföldi utazást követően került diagnosztizálásra, nyaki tályog formájában. Ebben az esetben sebészi beavatkozás és antibiotikum-terápiát követően a beteg tünetmentessé vált.
A két eset klinikai képének összefoglalása az 1-es számú táblázatban található.

1. táblázat: Magyarországon izolált *B. pseudomallei* megbetegedések adatai

Minta	**Eset 1**	**Eset 2**
Minta azonosító	**584_OEK_2008**	**831_NNK_2019**
Utazási anamnézis	India	Thaiföld
Inkubációs idő (hazatéréstől számítva)	21	14
Minta típusa	Natív vér	Tályog
Tünetek	Gyengeség, láz, fejfájás, arcideg-neuralgia, szepszis; KIR-fertőzés; CSF eredmények: fehérje 1,69 g/L, sejtszám 343/μL, glükóz 2,8 mmol/L; CRP emelkedett	Légúti tünetek, majd nyaki fájdalom, megnagyobbodott nyirokcsomók
Terápia	Intenzív ellátás, szupportív ellátás + antibiotikum-terápia	Nyaki tályogot igazolt, melyet sebészi úton eltávolítottak + antibiotikum-terápia
Antibiotikus kezelés	Empirikus kezelés: Rocephin, Herpesin; a diagnózist követően meropenem 3 × 1 g/nap és amikacin 1 g/nap, 18 napon át	Klindamycin 7 napig per os 4x450mg, majd klindamycin 5 napig iv standard dózisban, majd 14 napig amoxicillin-klavulánsav 2x 500 mg/125.
Beteg állapota	Gyógyult, tartós neurológiai maradványtünetekkel	Teljes gyógyulás
Tenyésztés és azonosítás	Véres agar, csokoládé agar, majd Biolog rendszer	Véres agar, csokoládé agar, Ashdown agar, majd MALDI-TOF MS

4.2.2 *Burkholderia pseudomallei* izolátumok genomikai eredményei

A teljesgenom-szekvenálás során keletkezett szekvenciaadatok az NCBI nyers szekvenálási adatok archívumának (Sequence Read Archive, SRA) adatbázisában

érhetők el a SUB12019197 projektazonosítóhoz tartozó SAMN26814095 és SAMN26814096 BioSample azonosítók alatt. A draftgenomok mérete 7,13 és 7,2 Mb, GC-tartalmuk a *B. pseudomallei* esetében megszokott ~68% volt. Mindkét genomban mintegy 7400 gén és ~5870 kódoló szekvencia (CDS) volt azonosítható. A virulenciával összefüggésbe hozható ismert gének száma 299–300 között alakult. Strukturális különbség volt megfigyelhető a tRNS és rRNS gének számában, azonban a nem-kódoló RNS régiók és az egyéb genomikai elemek mennyisége hasonló volt. CRISPR–Cas rendszer egyik izolátumban sem volt kimutatható. A genomikai paraméterek megfelelnek a *B. pseudomallei* fajra jellemző nagy, két kromoszómából álló genomstruktúrának. A főbb genomikai jellemzőket a 2-es számú táblázat mutatja be.

2. táblázat: Magyarországon izolált *B. pseudomallei* izolátumok főbb genomjellemzői

Jellemző	**Izolátum 1 (584_2008_OEK)**	**Izolátum 2 (831_2019_NNK)**
Genom mérete	7,2 Mb	7,13 Mb
GC-tartalom	67,90%	68,10%
Kódoló szekvenciák (CDS) száma	5877	5857
Virulenciához társított gének (annotált)	299	300
tRNS-ek száma	60	83
rRNS-ek száma	4	2
tmRNS	1	1
nem kódoló RNS-ek (ncRNS) száma	30	32
ncRNS régiók száma	19	19
kis nyílt leolvasási keretek (sORF)	7	7
oriC	2	2
oriV	0	0
oriT	0	0
Hézagok (gapek) száma	4	0
CRISPR–Cas rendszerek	0	0

4.2.3 *Burkholderia pseudomallei* in silico multilokusz szekvencia tipizálás

Az in silico MLST-analízis két különböző szekvenciatípust azonosított. Az összefoglaló eredmények az 3-as számú táblázatban láthatók. Az 584_2008_OEK izolátumot ST1643 MLST típusként azonosítottuk, amely egyedi *ndh* alléllt hordoz, ez korábban nem szerepelt a PubMLST adatbázisban. A 831_2019_NNK izolátum az MLST alapján az

ST1051 típusba tartozott, amelyet korábban klinikai izolátumként Vietnámból és Indiából, valamint ausztrál környezeti mintából került leírásra. A magyar izolátum a nyolcadik bejegyzett ST1051 törzs.

3. táblázat: Az in silico multilókusz szekvencia tipizálás eredményei

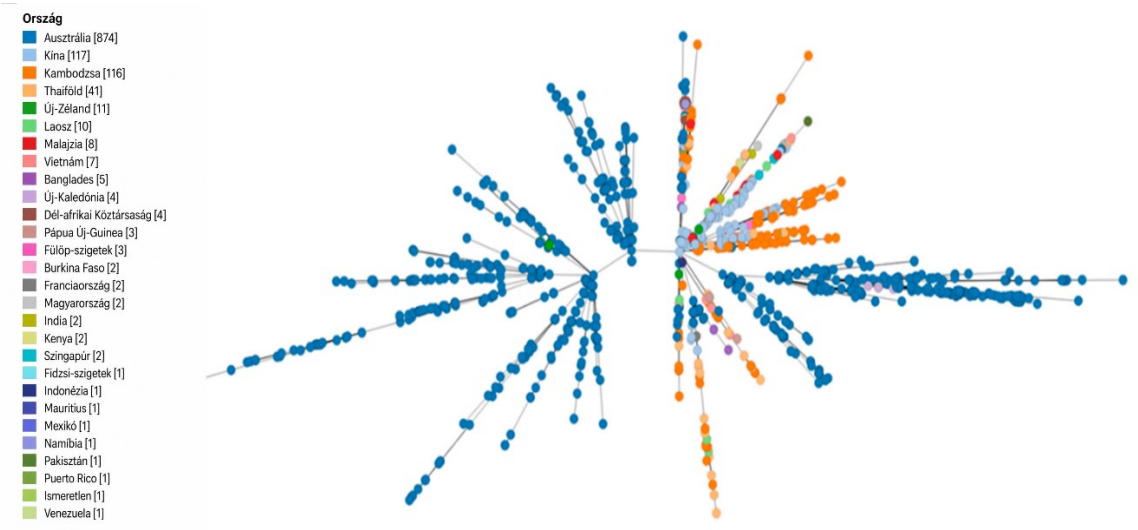
MLST gén	584_2008_OEK	831_2019_NNK
ace	1	1
*glt*B	12	12
*gmh*D	6	6
*lep*A	4	1
*lip*A	1	1
*nar*K	8	2
ndh	87	1
ST	1643	1051
Izolátum azonosító	5254	6554
Adatbázis azonosító	7517	7518

Az ST1051 MLST típusok összefoglaló adatai a 4-es számú táblázatban találhatók.

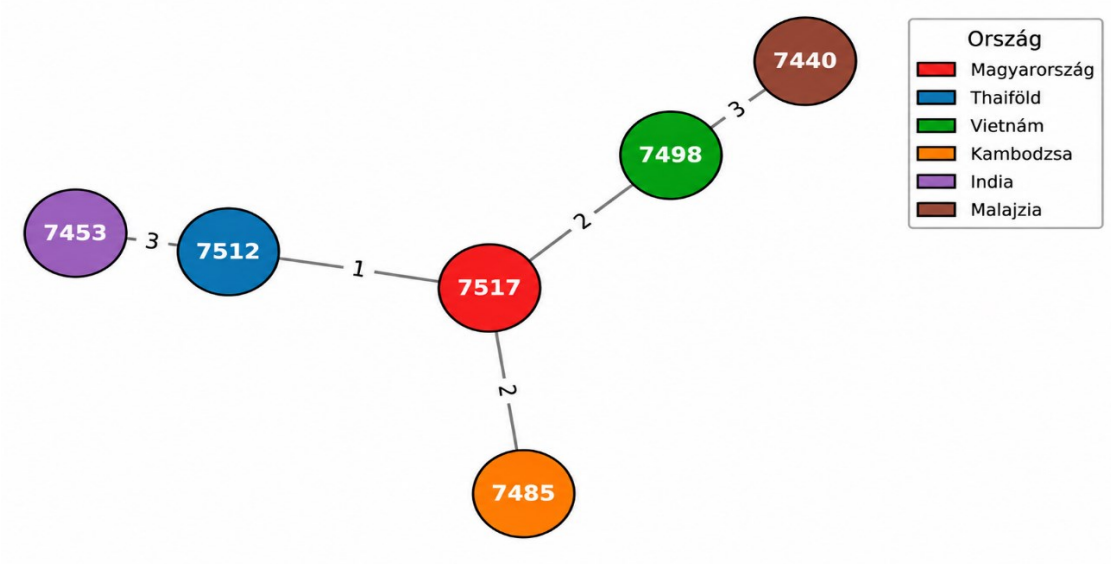
4. táblázat: A pubMLST-ben leírt *B. pseudomallei* ST 1051 izolátumok

pubMLST ID	Izolátum	Ország	Év	Forrás
3230	BCC23	Ausztrália	1999	Környezeti
3231	BCC24	Ausztrália	1999	Környezeti
3232	BCC32	Ausztrália	2000	Környezeti
5004	Ma154	India	2016	Humán
5331	H 04-2015	Vietnám	2015	Humán
5335	QB 03	Vietnám	2015	Humán
5512	Ma-35	India	2012	Humán
7518	831_2019_NNK	Magyarország	2019	Humán

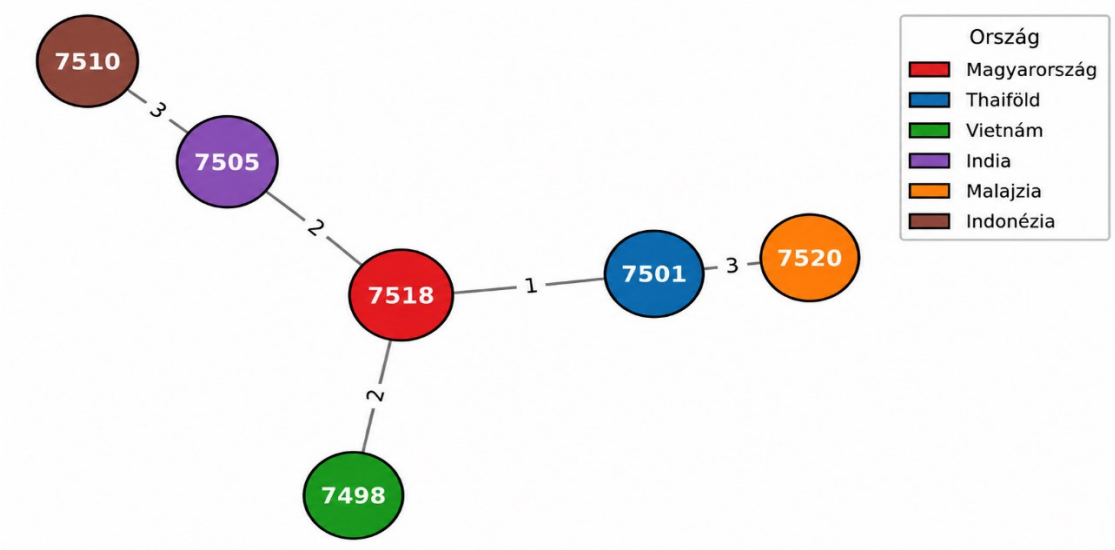
A PubMLST adatbázis elemzések összefoglaló eredményeit a 7-9-es ábrák mutatják. Minden csomópont egy-egy különálló szekvenciatípust (ST) jelöl, a színezés pedig a földrajzi eredetet tükrözi. A magyar izolátumok az ázsiai filogenetikai vonalba illeszkedtek, és közeli genetikai rokonságot mutattak délkelet-ázsiai, elsősorban thaiföldi, vietnámi és indiai szekvenciatípusokkal. Az elemzés egyúttal jól szemléltette az ázsiai és ausztrál populációk közötti elkülönülést, míg az afrikai és amerikai eredetű izolátumok távolabbi, elkülönülő klaszterekben helyezkedtek el. A kapott eredmények megerősítik a magyarországi esetek utazással összefüggő, importált eredetét, és alátámasztják a vizsgált izolátumok elhelyezkedését a *B. pseudomallei* globális populációs struktúráján belül.



7. ábra: A PubMLST adatbázisban szereplő 7510 *B. pseudomallei* izolátum allélprofiljai alapján készült globális GrapeTree vizualizáció (színezés földrajzi régiónként).



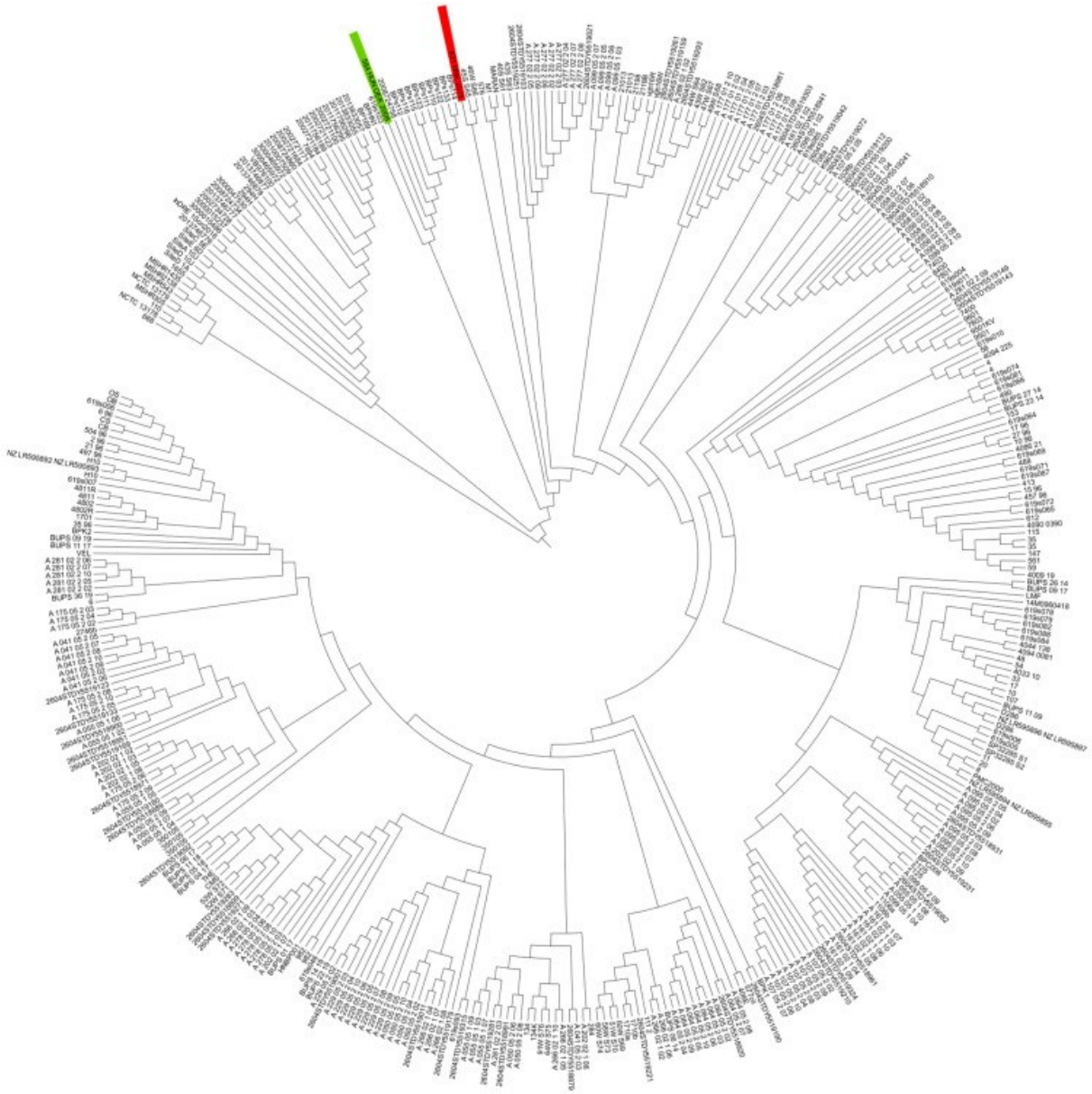
8. ábra: A 584_2008_OEK izolátum (PubMLST ID: 7517; ST1643) populációs szerkezeten belüli pozíciójának ábrázolása GrapeTree-analízissel. Az egyes csomópontok szekvenciatípusokat (ST) reprezentálnak, a színek a földrajzi eredetet jelölik.



9. ábra: A 831_2019_NNK izolátum (PubMLST ID: 7518; ST1051) populációs szerkezeten belüli pozíciójának ábrázolása GrapeTree-analízissel. Az egyes csomópontok önálló izolátumokat reprezentálnak, a színezés a földrajzi eredetet mutatja.

4.2.4 *Burkholderia pseudomallei* cgMLST összehasonlító analízise

A core-genome MLST elemzés során 4221 core gén allélikus profilja került összehasonlításra 410 globális referencia izolátummal. A két magyar izolátum egymástól genetikailag markánsan elkülönülő kládba sorolódott. Mindkét törzs az ázsiai filogenetikai leszármazási vonalba illeszkedett, amely összhangban áll az utazási anamnézissel. A két izolátum közötti jelentős alléldiverzitás kizárja az epidemiológiai kapcsolatot, és független behurcolást igazol (10-es számú ábra).



10. ábra: A Magyarországon izolált *Burkholderia pseudomallei* izolátumok filogenetikai analízise.

4.2.5 *Burkholderia pseudomallei* virulencia- és rezisztenciaprofil eredményei

A teljesgenom-szekvenálási adatok alapján mindkét vizsgált *B. pseudomallei* izolátum genomjában számos, a faj patogenitásában ismerten szerepet játszó virulencia-asszociált gén volt azonosítható. A draft genomok *in silico* elemzése azt mutatta, hogy mindkét izolátumban a *B. pseudomallei*-re jellemző, legfontosabb ismert virulenciadeterminánsok túlnyomó többsége jelen van, ami összhangban áll a faj kifejezett invazív potenciáljával és opportunista patogenitásával. A RAST-alapú funkcionális annotáció alapján az 584_2008_OEK izolátumban 299, míg a 831_2019_NNK izolátumban 300 virulencia-asszociált gén volt azonosítható eltérő virulencia génekkel.

A sejtfelszíni struktúrákhoz kapcsolódó determinánsok közül mindkét izolátumban azonosítható volt a LPS bioszintézisében szerepet játszó teljes *wcb* operon, amely a kapszuláris és sejtfelszíni struktúrák kialakításában, valamint a gazdaszervezettel való kölcsönhatásban tölt be fontos szerepet. A vizsgált régióban kulcsfontosságú, attenuációval összefüggésbe hozható mutációt nem detektáltunk. Az in silico LPS-szerotípus meghatározása alapján ugyanakkor különbség mutatkozott a két izolátum között. Az 584_2008_OEK törzs LPS A szerotípusba, míg a 831_2019_NNK törzs LPS B szerotípusba volt sorolható. Mindkét izolátumban jelen volt a YLF génklaszter, míg a BTFC klaszter egyik törzsben sem volt kimutatható. Az intracelluláris terjedés és a sejten belüli mozgás szempontjából kiemelt jelentőségű *bim*A gén mindkét izolátumban megtalálható volt, azonban eltérő variáns formájában. Az 584_2008_OEK törzsben a *bim*A_{Bm}, míg a 831_2019_NNK izolátumban a *bim*A_{Bp} variánst azonosítottuk. A további virulencia-asszociált markerek közül mindkét törzs pozitívnak bizonyult az *fha*B3 génre, továbbá a 622 bp hosszúságú ITS type C variánshoz társuló *tox*A gént is ki tudtuk mutatni.

Az antimikrobiális rezisztenciagének vizsgálata során szintén különbség mutatkozott a két izolátum között. Az 584_2008_OEK törzsben a blaOXA-57 és blaPenI β-laktamáz gének mellett az *amr*AB efflux pumpát kódoló operon is jelen volt, továbbá az omp38 külső membránfehérje génjét is azonosítottuk. Ez a genetikai háttér a β-laktám antibiotikumokkal szembeni csökkent érzékenység, illetve a multifaktoriális antimikrobiális tolerancia lehetőségét veti fel. Ezzel szemben a 831_2019_NNK izolátumban kizárólag a blaOXA-59 gént detektáltuk, amely ugyan ismerten előfordul *B. pseudomallei*-ben, de az előző törzshöz képest szűkebb rezisztencia-asszociált génkészletet jelent. A kiemelt virulencia tulajdonságok a 5-ös számú táblázatban láthatók.

5. táblázat: A Magyarországon izolált *B. pseudomallei* izolátumok fő genomi és fenotípusos jellemző

Jellemző	584_2008_OEK izolátum	831_2019_NNK izolátum	Jelentőség
Klinikai megjelenés	Neuromelioidosis (meningoencephalitis)	Nyaki tályog	Az első neuro-melioidózisos eset Európában
MLST/szekvencia-típus (ST)	ST 1643 (új)	ST 1051	Az ST 1643 először azonosítva
***bim*A variáns**	Bm	Bp	A Bm variáns neurológiai szövődményekkel hozható összefüggésbe
YLF génklaszter	Azonosítható	Azonosítható	Fokozza az adhéziót és a biofilmképződést; gyakori ázsiai törzsekben
BTFC klaszter	Hiányzik	Hiányzik	Ausztrál izolátumokra jellemző; befolyásolja a motilitást/kemotaxist
ITS típus	C típus (622 bp)	C típus (622 bp)	Gyakran megfigyelhető ázsiai izolátumokban
***fha*B3**	Azonosítható	Jelen	Adhézió és szöveti invázió; hozzájárul a virulenciához
Kapszuláris poliszacharid operon (*wcb*)	Azonosítható, kulcsmutáció nélkül	Azonosítható, kulcsmutáció nélkül	Fontos az immunelkerülésben

Jellemző	584_2008_OEK izolátum	831_2019_NNK izolátum	Jelentőség
Toxin A (*tox*A)	Azonosítható	Azonosítható	Megzavarja a gazdasejt citoszkeletonját
T3SS	Azonosítható	Azonosítható	III. típusú szekréciós rendszer; elősegíti a gazdasejt manipulációját
β-laktamáz gének	*bla*OXA-57, *bla*PenI, amrAB	blaOXA-59	Hozzájárul az antibiotikum-rezisztenciához (aminoglikozidok, β-laktámok)
Földrajzi kapcsolat/filogenetika	Az YLF klaszter alapján ázsiai törzsekkel rokon	Az YLF klaszter alapján ázsiai törzsekkel rokon	Rávilágít az utazással összefüggő kockázatra és a törzsek globális diverzitására

4.3 Magyarországon izolált nem-O1, nem-O139 Vibrio cholerae izolátumok genetikai jellemzése

4.3.1 Magyarországon azonosított nem-O1, nem-O139 Vibrio cholerae klinikai minták összefoglaló adatai

A 2018 és 2025 között azonosított 25 klinikailag releváns, NTVC változatos klinikai megjelenési formákhoz kapcsolódott, ezek demográfiai és klinikai jellemzőit a 6-os számú táblázat tartalmazza.

6. táblázat: A Magyarországon 2018 és 2025 között azonosított nem-O1, nem-O139 *V. cholerae* okozta fertőzésben megbetegedettek demográfiai és klinikai jellemzői

Izolátum	Nem	Életkor	Klinikai megjelenés	Izolálás időpontja	Anamnézis	Kimenetel	Lehetséges társfertőzés
VC-61	Nő	14	Petefészek-fertőzés	2018. június	Fürdőzés ausztriai tóban	Gyógyult	Nincs
VC-65	Férfi	40	Középfülgyulladás	2018. szeptember	Gyógyfürdőben volt	Gyógyult	Nincs
VC-62	Férfi	71	Szepszis	2018. október	Ismeretlen	Gyógyult	Nincs
VC-63	Férfi	64	Középfülgyulladás	2018. október	Gyógyfürdőben volt	Gyógyult	Nincs
VC-64	Nő	77	Szepszis	2019. szeptember	Gyógyfürdőben volt	Gyógyult	Nincs
VC-05	Nő	67	Súlyos gastroenteritis	2019. október	Gyógyfürdőben volt	Gyógyult	Nincs

Izolátum	**Nem**	**Életkor**	**Klinikai megjelenés**	**Izolálás időpontja**	**Anamnézis**	**Kimenetel**	**Lehetséges társfertőzés**
VC-51	Férfi	34	Középfülgyulladás	2019. november	Ismeretlen	Gyógyult	Nincs
VC-81	Férfi	3	Gastroenteritis	2021. augusztus	Velencei-tó	Gyógyult	*Salmonella enteritidis*, *Aeromonas caviae*
VC-06	Férfi	23	Sinusitis	2022. június	Ismeretlen	Gyógyult	Nincs
VC-66	Nő	92	Szepszis	2022. szeptember	Ismeretlen	Kimenetel ismeretlen	*Staphylococcus epidermidis*
VC-82	Nő	4	Sebfertőzés	2022. augusztus	Ismeretlen	Gyógyult	*Staphylococcus aureus*
VC-33*	Férfi	21	Pneumonia	2023. augusztus	Lupa tó- a tóból történt mintavétel is	Gyógyult	Nincs
VC-39	Férfi	12	Középfülgyulladás	2023. szeptember	Ismeretlen	Gyógyult	Nincs
VC-60	Férfi	28	Gastroenteritis	2023. december	Ismeretlen	Gyógyult	Nincs
VC-47	Férfi	81	Pneumonia	2023. december	Ismeretlen	Kimenetel ismeretlen	Nincs
VC-78	Férfi	80	Sebfertőzés	2024. június	Ismeretlen	Kimenetel ismeretlen	*Enterococcus faecalis*
VC-69	Férfi	47	Szepszis	2024. június	Balaton	Halálos kimenetel	Nincs
VC-75	Férfi	81	Gastroenteritis	2024. július	Utazási anamnézis: India	Gyógyult	Nincs
VC-83	Férfi	78	Szepszis	2024. augusztus	Ismeretlen	Gyógyult	Nincs

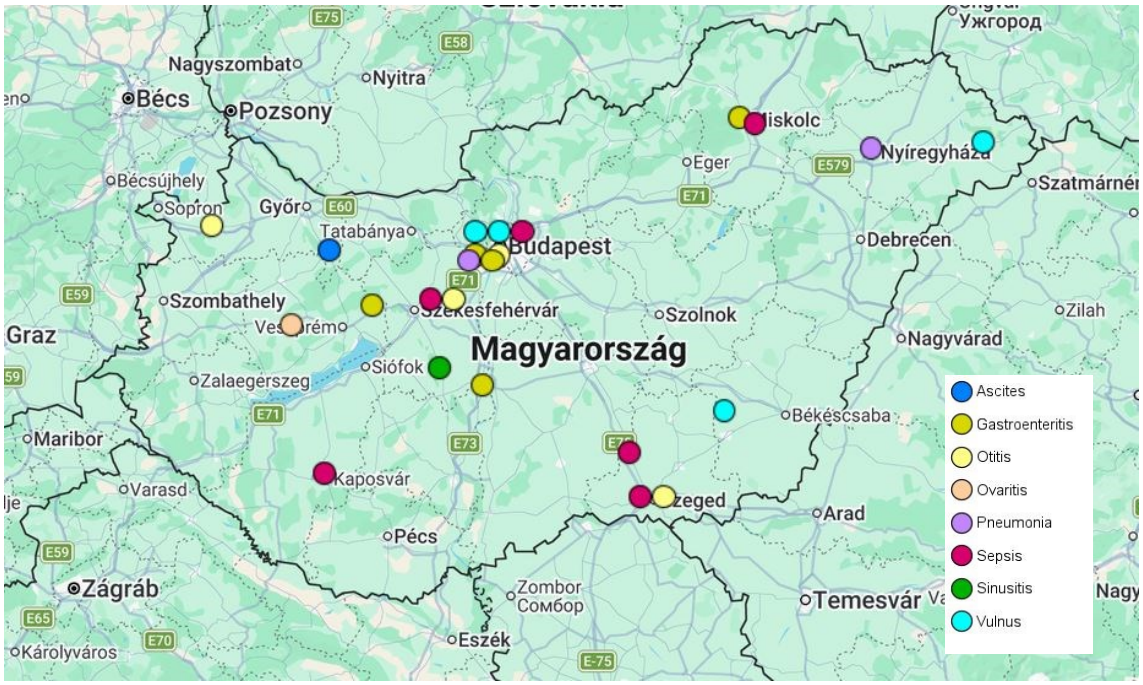
Izolátum	Nem	Életkor	Klinikai megjelenés	Izolálás időpontja	Anamnézis	Kimenetel	Lehetséges társfertőzés
VC-71	Férfi	67	Ascites	2024. augusztus	Ismeretlen	Gyógyult	Nincs
VC-70	Férfi	62	Gastroenteritis	2024. szeptember	Ismeretlen	Gyógyult	Nincs
VC-80	Nő	55	Sebfertőzés	2024. december	Ismeretlen	Gyógyult	Nincs
VC-67	Nő	60	Szepszis	2025. július	Utazási anamnézis: Egyiptom	Kimenetel ismeretlen	Nincs
VC-79	Férfi	73	Szepszis	2025. augusztus	Piócaterápia és gyógyfürdőben volt	Halálos kimenetel	Nincs
VC-84	Nő	73	Sebfertőzés	2025. augusztus	Gyógyfürdőben volt	Gyógyult	Nincs

*Környezeti minta is érkezett vizsgálatra.

A leggyakoribb klinikai megjelenési forma a szepszis volt, amely az esetek 28%-át (7/25) tette ki. Ezt követték a gastrointestinalis fertőzések (20%), a fül-orr-gégészeti fertőzések (20%), a sebfertőzések (16%) és az alsó légúti fertőzések (8%). Ritkábban peritonitis és ovariumfertőzés is előfordult, mindkettő egy-egy esetben. A vizsgált időszakban két beteg hunyt el, mindkét esetben szepszis következtében. Potenciális koinfekciót négy esetben (16%) azonosítottunk. Különösen a gastrointestinalis fertőzések között fordultak elő olyan esetek, ahol egyéb enterális kórokozók, például *Salmonella enterica* serovar Enteritidis vagy *Aeromonas caviae* egyidejű jelenléte is igazolható volt, ami megnehezíti az NTVC pontos a etiológiai szerepének megítélését.

A betegek 68%-a férfi, az életkor 3 és 92 év között változott, a medián életkor 60 év volt, ami az idősebb korcsoportok fokozott érintettségére utal. A 25 eset közül 22 (88%) esetben nem volt utazási anamnézis, míg mindössze három eset (12%) volt utazással összefüggésbe hozható (India, Egyiptom, Ausztria). Összesen 6 esetben sikerült gyógyfürdő látogatást igazolni és 4 esetben természetes vízzel került kapcsolatba a beteg megbetegedése előtt. Egy esetben a beteg piócaterápián vett részt, majd gyógyfürdőben

járt közvetlenül a megbetegedése előtt. Az esetek földrajzi eloszlását és a klinikai megjelenési formáját a 11-es számú ábra mutatja be.



11. ábra: A Magyarországon 2018 és 2025 között azonosított nem-O1, nem-O139 *V. cholerae* izolátumok földrajzi megoszlása és klinikai megjelenése.

Az esetek havi bontású áttekintése alapján a minták döntő többsége nyár végén és kora ősszel (augusztus–szeptember) érkezett. A 25 esetből 12 ebben a két hónapban került beküldésre (48%). Amennyiben a júniusi eseteket is ide soroljuk, a nyári–kora őszi periódus aránya eléri a 72%-ot (18/25). Ezzel szemben a téli hónapokban (december–február) az esetszám alacsonyabb (3/25) volt.

4.3.2 Nem-O1, nem-O139 Vibrio cholerae izolátumok molekuláris és genomikai eredményei

A vizsgálatba bevont 25 *Vibrio cholerae* izolátum esetében kizártuk a klasszikus koleratoxin hordozást, és valamennyi izolátum NTVC-nek bizonyult.

A teljesgenom-szekvenálás során keletkezett szekvenciaadatok az NCBI nyers szekvenálási adatok archívumának (Sequence Read Archive, SRA) adatbázisában érhetők el a SUB15686858 és SUB13776351 projektazonosítóhoz tartozó PRJNA1338121 és PRJNA1007372 BioSample azonosítók alatt. Az izolátumok teljesgenom-szekvenálási adatait a 9. számú függelék tartalmazza. A virulenciagének

elemzése alapján egyik izolátum sem hordozta a koleratoxint kódoló *ctx*A és *ctx*B géneket, továbbá az akcesszórikus enterotoxin, a zonula occludens toxin és a toxin-koregulált pilushoz kapcsolódó géneket sem. Ezzel szemben számos egyéb, alternatív virulenciafaktorhoz kapcsolódó gén jelenlétét igazoltuk. A virulenciafaktorok vizsgálata során a leggyakrabban a *hly*A hemolizin gén volt kimutatható (84,0%), ezt követte a *fur* és *feo*ABC vasfelvételi rendszer (egyaránt 76,0%), valamint az RTX toxinrendszer génjei (64,0%). A T6SS-hez kapcsolódó gének az izolátumok 44,0%-ában voltak jelen, míg a quorum sensing rendszer kulcsgénje, a *lux*S, csupán két izolátumban (8,0%) fordult elő. Az eredményeket a 7-es számú táblázat foglalja összse.

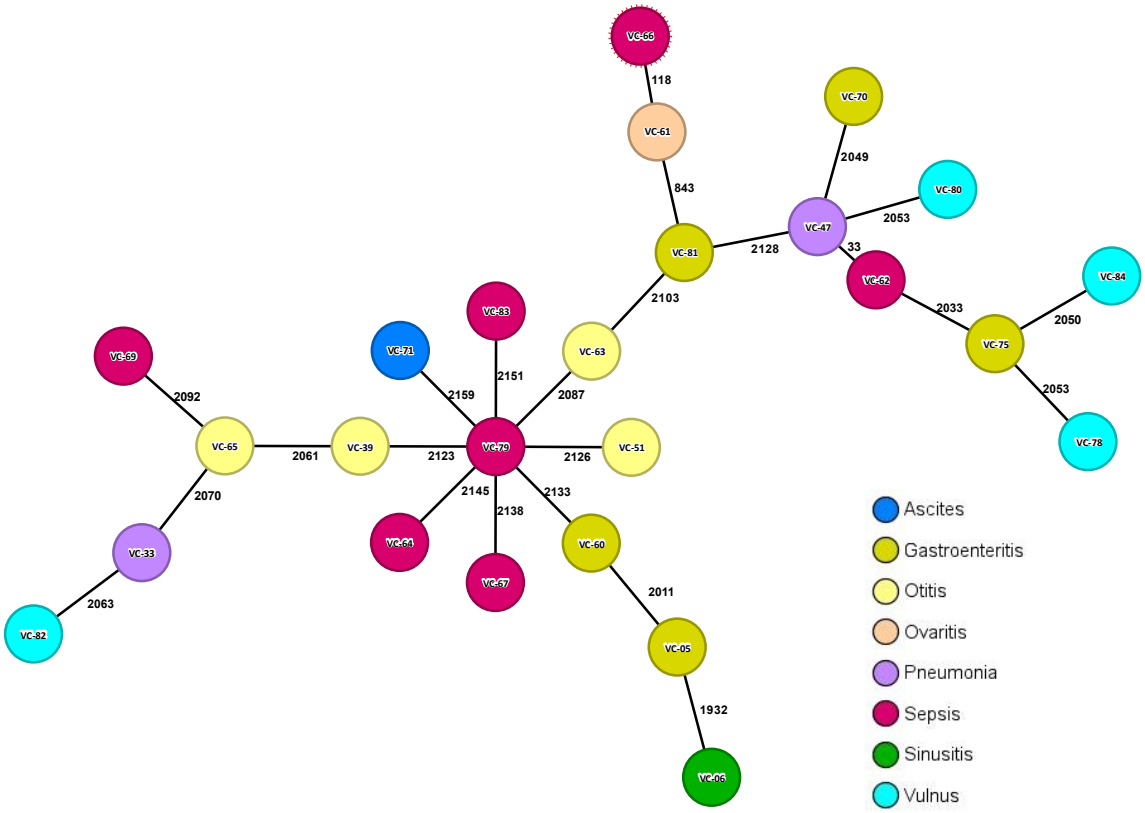
7. táblázat: A Magyarországon azonosított nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* izolátumok legfontosabb virulenciafaktor- és antimikrobiális rezisztencia génjei

Izolátum	Főbb virulencia-determinánsok	Antimikrobiális rezisztencia-determinánsok
VC-61	*hly*A, fur, *feo*ABC, *lux*S	Nem volt kimutatható
VC-65	*hly*A, RTX, *fur, feo*ABC	*bla*CARB-7
VC-62	*hly*A, RTX, T6SS, fur, feoABC	*qnr*VC4
VC-63	*hly*A, luxS, *fur*, *feo*ABC	Nem volt kimutatható
VC-64	RTX, T6SS, *fur, feo*ABC	Nem volt kimutatható
VC-05	*hly*A, RTX, *fur*, *feo*ABC	qnrVC
VC-51	hlyA, RTX, T6SS, *fur, feo*ABC	*var*G
VC-81	*hly*A, RTX, T6SS, *fur*, *feo*ABC	*alm*E, *alm*F, *alm*G
VC-06	*hly*A, *fur*, *feo*ABC	*bla*CARB-7
VC-66	RTX, *fur*, *feo*ABC	Nem volt kimutatható
VC-82	*hly*A, RTX, T6SS	Nem volt kimutatható
VC-33	*hly*A, RTX, fur, *feo*ABC	*bla*CARB-7
VC-39	*hly*A, RTX, T6SS	*bla*PSE, *qnr*VC4
VC-60	*hly*A, *fur, feo*ABC	Nem volt kimutatható
VC-47	RTX, T6SS, *fur*, *feo*ABC	*qnr*VC4
VC-78	*hly*A, RTX, *fur*, *feo*ABC	*var*G
VC-69	*hly*A, RTX, T6SS	*alm*E, *alm*F, *alm*G
VC-75	hlyA, *fur*, *feo*ABC	Nem volt kimutatható
VC-83	RTX, *fur*, *feo*ABC	Nem volt kimutatható
VC-71	*hly*A, RTX, T6SS	*alm*E, *alm*F, *var*G
VC-70	*hly*A, *fur*, *feo*ABC	*amp*C
VC-80	*hly*A, RTX, T6SS	*alm*E, *alm*F, *alm*G
VC-67	*hly*A, RTX, *fur*, *feo*ABC	*qnr*VC4, *alm*E, *alm*F, *alm*G
VC-79	*hly*A, RTX, T6SS	*alm*E, *alm*F, *alm*G
VC-84	*hly*A, *fur, feo*ABC	Nem volt kimutatható

A 25 klinikai izolátum közül 64% hordozott legalább egy antimikrobiális rezisztenciagént. A rezisztenciával összefüggő genetikai determinánsok közül leggyakrabban a lipid A módosításában szerepet játszó *alm*E, *alm*F és *alm*G gének fordultak elő (24,0%, 24,0% és 20,0%). β-laktamáz gének az izolátumok 20,0%-ában voltak jelen, elsősorban *bla*CARB-7 (12,0%), valamint *bla*PSE (4,0%) és *amp*C (4,0%) formájában. A *qnr*VC családba tartozó kinolonrezisztencia-gének az izolátumok 20,0%-ában voltak kimutathatók.

4.3.3 Nem-O1, nem-O139 Vibrio cholerae izolátumok cgMLST eredményei

A cgMLST-vizsgálat jelentős genetikai diverzitást mutatott a 25 klinikai NTVC izolátum között. A minimális feszítőfán összességében erősen heterogén populációszerkezet látható. A különböző klinikai manifesztációk több, egymástól genetikailag eltérő háttéren jelentek meg, vagyis az invazív fertőzések nem köthetők egyetlen meghatározott genetikai vonalhoz. Az összefoglaló adatok a 12-es ábrán láthatók.



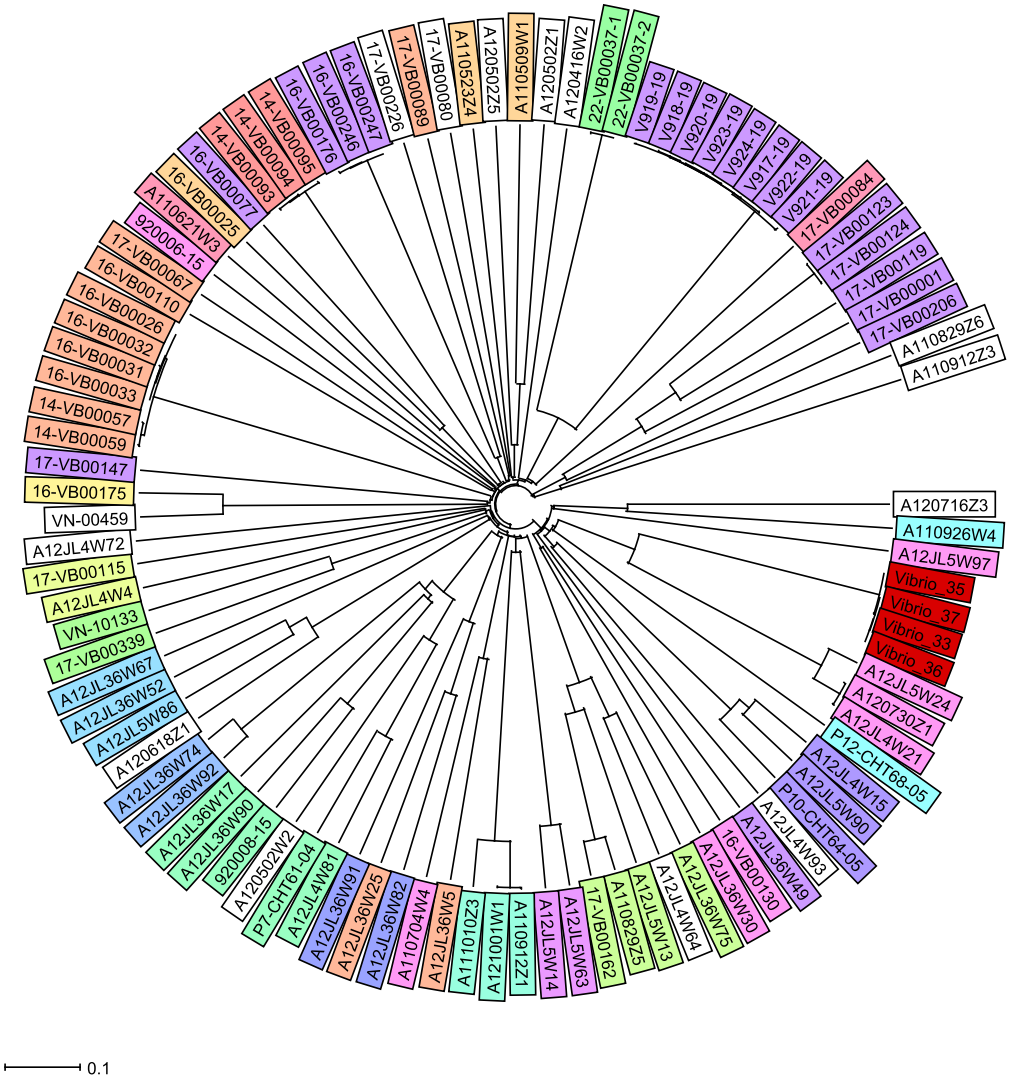
12. ábra: A Magyarországon 2018–2025 között azonosított 25 klinikai eredetű NTVC MST elemzése. A csomópontok színe az izolátumokhoz kapcsolódó klinikai megjelenési formákat jelöli. Az összekötő ágakon feltüntetett számok az izolátumok közötti allélikus eltérések számát mutatják.

4.3.4 Klinikai és környezeti izolátumok genomikai kapcsolatának bizonyítéka

Korábbi vizsgálatunk során egy 21 éves férfi beteg primer pneumoniáját vizsgáltuk (Vibrio-33, VC-33 jelzés), amely egy vízbefulladás közeli eseményt követően alakult ki. A bronchoalveolaris lavage mintából izolált NTVC törzs mellett három környezeti izolátum is rendelkezésre állt a feltételezett expozíciós helyről. A teljesgenom-szekvenálást követő cgMLST elemzés alapján a klinikai és a három környezeti izolátum között zéró allélikus eltérés volt kimutatható (13-as számú ábra).

Az *in silico* MLST vizsgálat valamennyi izolátumot az új ST1605 szekvenciatípusba sorolta. A törzsek azonos virulenciagén-profilt mutattak, továbbá valamennyi izolátumban jelen volt a *blaCARB-7* β-laktamáz gén és az *almEFG* operon.

Eredményeink közvetlen genomikai bizonyítékot szolgáltattak arra, hogy a fertőzés forrása a beteg által látogatott édesvízi fürdőhely lehetett.



13. ábra: Neighbor-Joining filogenetikai elemzés. Az elemzést a Ridom SeqSphere+ szoftverrel végeztük, a hiányzó páronkénti értékek figyelmen kívül hagyásával. A fa a *V. cholerae* cgMLST NTVC 2415 lókuszból álló sémáján alapul, ≤10 allélikus eltérés klaszterküszöb alkalmazásával. A különböző színek az egyes szekvenciatípusokat (ST) jelölik. A jelen vizsgálatban szereplő izolátum piros színnel van kiemelve. A Vibrio-33 a vizsgált klinikai minta, míg a Vibrio_35, Vibrio-36 és Vibrio-37 a környezeti mintákat jelölik.

5. Megbeszélés

5.1 Klinikai metagenomikai eredmények megbeszélése

5.1.1 Légúti metagenom minták eredményeinek megbeszélése

A légúti mintákon végzett pilot vizsgálat eredményei alátámasztották, hogy a klinikai metagenomikai újgenerációs szekvenálás (mNGS) a súlyos akut légúti fertőzések kivizsgálásában széles spektrumú, hipotézismentes diagnosztikai megközelítést biztosíthat. A vizsgált minták jelentős részében legalább egy potenciálisan klinikailag releváns mikroorganizmust azonosítottunk, és a kimutatott ágensek között vírusok és baktériumok egyaránt szerepeltek. Ez különösen olyan klinikai helyzetekben jelenthet előnyt, amikor a tünetek alapján a feltételezett kórokozó nem határozható meg egyértelműen, illetve több mikroorganizmus együttes jelenléte is felmerülhet. A nem célzott mNGS ilyen esetekben olyan diagnosztikai információt szolgáltathat, amely célzott molekuláris módszerekkel csak több egymást követő vizsgálat alkalmazásával lenne elérhető (9,21,22). A vizsgálatainkban nem találtunk gomba vagy parazita etiológiára utaló bizonyítékot, amelynek hátterében alapvetően a kis mintaszám állhat, bár fontos kiemelni, hogy a gombák és paraziták esetében a nukleinsav izolálási módszer alapvetően befolyásolhatja a szekvenálást (84,240). A célzott vírus-PCR és az mNGS eredményeinek összevetésekor ugyanakkor figyelembe kell venni, hogy a két módszer alapvetően eltérő diagnosztikai és analitikai megközelítést képvisel. A multiplex PCR előre meghatározott kórokozók nagy analitikai érzékenységű kimutatására irányul, míg az mNGS előzetes kórokozó-specifikus hipotézis nélkül vizsgálja a mintában jelen lévő nukleinsavakat (9,21,22). Ennek megfelelően a PCR-panelben nem szereplő, mNGS-sel azonosított bakteriális vagy virális ágensek nem tekinthetők valódi PCR–mNGS diszkordanciának, hanem a metagenomikai megközelítés szélesebb diagnosztikai spektrumából származó többletinformációt képviselnek. A jelen vizsgálatban ezért a két módszer közvetlen összehasonlítását kizárólag a multiplex PCR-panelben szereplő légúti vírusokra végeztük el. A PCR-panel célpontjai között a két módszer közötti pozitív egyezés kórokozónként eltérő volt. Influenza A-vírus esetében 85,7%-os, SARS-CoV-2 esetében 100%-os, RSV esetében 33,3%-os, humán metapneumovírus esetében pedig 50,0%-os pozitív egyezést figyeltünk meg. Az eltérő arányok arra utalnak, hogy az mNGS analitikai teljesítménye nem tekinthető egységesnek valamennyi légúti vírus esetében. A

detektálhatóságot a kórokozó-terhelés mellett a mintamátrix összetétele, a gazdaeredetű nukleinsav mennyisége, a nukleinsav-integritás, a mintapreparálás hatékonysága és az alkalmazott szekvenálási mélység egyaránt befolyásolhatja (9,65,241,242). A PCR-pozitív, de mNGS-negatív esetekben mért 27,14–29,30 közötti Ct-értékek mérsékeltebb kórokozó-nukleinsav-terhelésre utalhattak, azonban a sikertelen metagenomikai detektálás nem magyarázható kizárólag a Ct-értékkel. A légúti minták komplex mikrobiális összetétele és a gyakran jelentős gazdaeredetű nukleinsav-háttér csökkentheti a kórokozó-specifikus olvasatok relatív arányát, így a rendelkezésre álló szekvenálási kapacitás kisebb hányada fordítódik a célkórokozó genomjának reprezentálására (9,21). Eredményeink alapján ezért a PCR Ct-értéke önmagában nem tekinthető az mNGS sikeressége megbízható prediktorának; a kórokozó-terhelés mellett a gazda–mikroba nukleinsav arány, a minta összetétele és a szekvenálási mélység együttesen határozza meg a kimutathatóságot (9,16,21,22,38,51,84,240,242). A metagenomikai vizsgálat egyik legfontosabb hozzáadott értéke azokban a mintákban mutatkozott meg, amelyekben a célzott vírus-PCR nem adott etiológiai magyarázatot. Kilenc PCR-negatív mintában az mNGS további potenciálisan klinikailag releváns ágenseket azonosított, többek között *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, *Moraxella catarrhalis*, humán mastadenovírus B, humán rubulavírus 2, rhinovírusok és HCoV-HKU1 jelenlétét. Ezek az eredmények jól szemléltetik a nem célzott megközelítés előnyét, mivel olyan mikroorganizmusok felismerését is lehetővé teszik, amelyekre a kiinduló klinikai hipotézis vagy az alkalmazott diagnosztikai panel nem terjedt ki. Az azonosított bakteriális kórokozók esetében nem történt beküldés a bakteriológia vizsgálatokra, tehát első azonosítás történt az mNGS segítségével. A SARI keretében vírus transzport médiumban érkeztek a minták, ami önmagában nem alkalmas mintatípus a baktériumok többségének tenyésztésére (9,15,21,22,241).

Egy esetben felvetettük a *Streptococcus suis* infekció lehetőségét, amely zoonózisnak tekinthető. A *Streptococcus suis* az újonnan felbukkanó kórokozók közé tartozik, természetes rezervoárjai jelenlegi ismereteink szerint elsősorban a házisertések. Európában a humán megbetegedés ritka, a globális prevalencia mintegy 5%-át teszi ki (243). A fertőzés leggyakrabban sertésekkel vagy nyers sertéshússal történő kontaktushoz kapcsolódik, ezért elsősorban foglalkozási expozíció esetén merül fel a gyanú. Az emberi

fertőzés klinikai megjelenése változatos lehet, azonban leggyakrabban meningitis, szepszis, pneumonia, és súlyos invazív infekciók formájában jelentkezik (243).

Egy esetben fatális kimenetelű pneumoniás megbetegedéseből *Streptococcus pyogenes* és influenza A vírus (H1N1) koinfekcióját azonosítottuk. A járványügyi nyomozás kiderítette, hogy a beteg halála előtt nem részesült antibiotikum terápiában. Tekintettel arra, hogy a *S. pyogenes* penicillinérzékeny, az eset -összhangban a szakirodalmi adatokkal - rávilágít arra, hogy az influenza vírusfertőzéshez társuló bakteriális szuperinfekciók korai felismerése és empirikus antibiotikum-kezelése kulcsfontosságú lehet a súlyos kimenetel megelőzésében (244).

Egy-egy esetben *Mycoplasma pneumoniae*, illetve *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* fertőzést azonosítottunk olyan betegekben, akiknél ismételt mintabeküldés történt, azonban a jellegtelen klinikai tünetek miatt célzott antimikrobiális terápia nem került alkalmazásra. A *Mycoplasma pneumoniae* fertőzés esetében kontraindikáció hiányában a doxycyclin alkalmazása javasolt (245,246). A *F. tularensis* subsp. *holarctica* által okozott tularaemia egy zoonózis, Magyarországon endémiás a megbetegedés és évente mintegy 20-200 esetet jelentenek (105,247). A hazánkban előforduló *F. tularensis* subsp. *holarctica* természetes módon rezisztens a β-laktám antibiotikumokra (248,249). Az általunk azonosított *F. tularensis* subsp. *holarctica* a B.12 kládba tartozott, amely esetében makrolidrezisztencia is leírt, így a nem megfelelő antibiotikum-választás jelentősen befolyásolhatta a klinikai kimenetelt. Kontraidikáció hiányában a doxycyclin adása javasolt, de monoterábiában alkalamazott doxycyclin terápiában gyakran írnak le replapsusokat, így megfontolandó az aminoglikozidok, vagy a fluorokinolok alkalmazása is (249).

Egy esetben *Legionella pneumophila* infekciót azonosítottunk, amely fatális kimenetelű volt. A kezdeti klinikai tünetek alapján virális eredetet valószínűsítettek, ezért a beteg nem részesült megfelelő célzott antibiotikum-terápiában. Mivel a *Legionella pneumophila* intracelluláris kórokozó, kezelésére makrolid vagy fluorokinolon antibiotikum alkalmazása szükséges, amelynek késedelmes megkezdése kedvezőtlenül befolyásolhatja a betegség kimenetelét. Az eset jól példázza, hogy a metagenomikai diagnosztika a differenciáldiagnosztikában olyan atípusos kórokozók felismerését is lehetővé teszi, amelyek kimutatása közvetlen terápiás következményekkel járhat (84,92,240,242,250).

Az mNGS-vizsgálat során *Haemophilus influenzae* és *Streptococcus pneumoniae* is azonosításra került, azonban ezen baktériumok kórokoki szerepének értékelését megnehezíti, hogy mindkét baktérium a felső légutak normál kolonizáló flórájának részét képezheti, ezért puszta kimutatásuk önmagában nem igazolja etiológiai szerepüket (9,35,80,101,242). Ugyanakkor ezekben a mintákban egyéb potenciális légúti kórokozó nem volt kimutatható, így a klinikai kép figyelembevételével felmerült a kóroki szerepük lehetősége. Az ilyen eredmények ugyanakkor további célzott megerősítő vizsgálatokat is indokolhatnak, például alsó légúti mintából végzett tenyésztést vagy PCR-vizsgálatot, mivel az mNGS eredménye alapján már ismertté válik a potenciális kórokozó és a diagnosztika célzottan folytatható (251). A vírusok közül a SARS-CoV-2 volt a legnagyobb arányban azonosítható mNGS és PCR módszerrel egyaránt. Ez részben magyarázható azzal, hogy a minták a SARI surveillance-ból származnak, amikor is jellemző a magas vírusterhelés. Emellett a SARS-CoV-2 nem szegmentált, pozitív szálú RNS genommal rendelkezik, amely stabilabb, teljes hosszban könnyebben rekonstruálható (247,252–254). Ezzel szemben az influenza vírusok, szegmentált genommal rendelkeznek, ami nehezíti a metagenom-alapú megközelítések alkalmazását (84,240,242). A kimutatási határt egyes szakirodalmi források 25–30 közötti Ct-értékhez kötik, míg más vizsgálatok 439–706 kópia/mL koncentrációban határozzák meg (82,89). Ezen értékek közvetlen összehasonlítása, illetve egymásba történő átszámítása azonban nem megbízható, mivel a detektálhatóságot számos preanalitikai és analitikai tényező, többek között a mintatípus, a mintavétel és-kezelés, a nukleinsav-extrakció hatékonysága, a könyvtár-előkészítés módja, valamint az alkalmazott szekvenálási mélység is befolyásolja. Emellett a Ct-érték és a kópiaszám közötti kapcsolat vizsgálat- és assay-specifikus, ezért standardgörbe és az alkalmazott módszer részletes paramétereinek ismerete nélkül a kétféle mérőszám nem konvertálható megbízhatóan egymásba. A szakirodalomban alkalmazott eltérő módszertan és eredményközlés miatt ezért az mNGS általánosan érvényes kimutatási határa nem határozható meg egyetlen Ct- vagy kópiaszámértékkel (242).

Emellett az influenza vírusok, az RSV-B, a *Orthorubulavirus laryngotracheitidis* (Human parainfluenza virus 2, hPIV-2) és a hMPV negatív szálú RNS genommal rendelkeznek, ami az RNS stabilitása, az RNS integritása és az amplifikációs lépések

során potenciálisan bekövetkező torzítások révén befolyásolhatja a metagenomikai detektálás hatékonyságát (9,35,87,242).

Az influenza vírusok, az RSV-B, a hPIV-2 és a hMPV kiemelt jelentőséggel bírnak a SARI kialakulásában, különösen gyermekek, idősek és immunszupprimált betegek körében. Ezek a kórokozók szezonális járványokat okozhatnak, és jelentős terhet rónak az egészségügyi ellátórendszerre a hospitalizációk, intenzív osztályos kezelések és a megnövekedett mortalitás révén. A kórokozók gyors és pontos molekuláris diagnosztikája ezért alapvető fontosságú a megfelelő infekciókontroll, epidemiológiai surveillance és célzott betegellátás szempontjából. A vizsgálat során alkalmazott, mintánként körülbelül 1 millió read kihozatal megfelelőnek bizonyult a legtöbb kórokozó kimutatására, azonban a szekvenálási mélység növelése várhatóan tovább javítaná a módszer érzékenységét. A legújabb irodalmi adatok alapján komplex klinikai minták esetében a ≥5 millió read/minta szekvenálási mélység elősegítheti az alacsony abundanciájú kórokozók megbízhatóbb detektálását, ezért amennyiben a finanszírozási lehetőségek ezt lehetővé teszik, célszerű nagyobb szekvenálási kihozatalt alkalmazni (9,21,255,256).

Összességében eredményeink azt mutatják, hogy az mNGS nem a célzott molekuláris diagnosztikai módszerek helyettesítője, hanem azok értékes kiegészítője. Különösen nagy hozzáadott értékkel rendelkezik PCR-negatív, de klinikailag fertőzésgyanús esetekben, súlyos akut légúti fertőzésekben, valamint atípusos, ritka vagy emerging kórokozók felismerésében, ahol a hagyományos diagnosztikai algoritmusok korlátozott teljesítményt nyújtanak.

5.1.2 Egyéb klinikai minták eredményeinek megbeszélése

A nem-légúti klinikai minták metagenomikai elemzése során elért diagnosztikai hozam összhangban áll a nemzetközi irodalomban közölt klinikai mNGS eredményekkel, és megerősíti, hogy a nem célzott, shotgun-alapú szekvenálás különösen hasznos invazív minták és differenciáldiagnosztikai szempontból komplex esetek vizsgálatában. (9,65,87,257). A mintatípus szignifikánsan befolyásolta az eredményeket. A nem-CSF mintákban magasabb, míg CFS-ben alacsonyabb diagnosztikai hozam volt megfigyelhető. Ez illeszkedik a szakirodalomban leírt tapasztalatokhoz, miszerint CSF esetében a mikrobiális-eredetű nukleinsav mennyisége gyakran alacsony, és a gazda-DNS dominanciája tovább nehezíti a detektálást, különösen immunmediált vagy posztinfekciós

kórképekben (38). A CSF mintákban az alacsony mintaszám ellenére is azonosítottunk olyan ritka kórokozókat, mint a *Treponema phagedenis,* vagy a *Balamuthia mandrillaris.* A *Treponema phagedenis* egy neuroszifilisz gyanújával beküldött CSF mintából került azonosításra. Az mNGS vizsgálatot párhuzamosan végeztük a rutin diagnosztikával, mivel a neurosyphilis mellett egyéb etiológia is felmerült. A *Treponema phagedenis* elsősorban a szarvasmarhák fertőző csülökbőrgyulladásával (bovine digital dermatitis) összefüggésbe hozott spirochaeta, ugyanakkor a szakirodalomban humán központi idegrendszeri fertőzésből, mNGS-sel történő azonosításáról is beszámoltak (258). Ismert, hogy a *Treponema phagedenis* antigénjei keresztreakciót mutathatnak a *Treponema pallidum* hemagglutinációs vizsgálatban (TPHA), továbbá a baktérium a *Treponema pallidum* membránfehérjéivel (*Treponema pallidum* membrane protein A és B, TmpA és TmpB) homológ fehérjéket expresszál, ami megnehezítheti a *Treponema pallidum*-fertőzés szerológiai elkülönítését. (258). A *Balamuthia mandrillaris* granulomatosus amoebás encephalitist okoz, amely rendkívül magas 90% feletti mortalitással járó megbetegedés. A kórokozót egyazon fatális kimenetelű esetből származó agyszövet és CSF mintából is azonosítottuk. Európában mindössze négy esetet írtak le eddig, globálisan pedig kevesebb mint 200 eset ismert, ami kiemeli az ilyen ritka ágensek felismerésének jelentőségét (259,260). Bár a megbetegedés kimenetele általában kedvezőtlen, korai felismerés és hosszan tartó, kombinált terápia alkalmazása mellett a túlélés esélye növelhető (260). A ritka, zoonotikus, protozoon és atípusos kórokozók azonosítása, például a *Rickettsia africae, Rickettsia typhi*, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica, Spirometra erinaceieuropaei*, MPXV, *Leptospira santarosai* és parvovírus B19 koinfekció jól demonstrálja az mNGS klinikai hozzáadott értékét olyan esetekben, amelyek rutinszerű paneldiagnosztikával nem, vagy csak későn tisztázhatók (9,35,52).

Fontos kiemelni a módszer szerepét a nem, vagy nehezen tenyészthető kórokozók diagnosztikájában, például a *Rickettsia africae* az afrikai kullancscsípéses láz (African tick bite fever) kórokozóját, amely elsősorban utazók körében fordul elő, és a malária után ma már a második leggyakrabban diagnosztizált lázas megbetegedés az Afrikában járt utazók körében (261,262). A vektorai az *Amblyomma* genus tagjai, elsődlegesen az *Amblyomma variegatum és Amblyomma hebraeum* kullancsfajok (261–264). Az *Amblyomma variegatum* már Olaszországban is azonosításra került (263). Egy esetben azonosítottunk EDTA-s vérből *Rickettsia typhi-t,* amely az endémiás tífusz (murin tífusz)

megbetegedésért felelős. A megbetegedés világszerte előfordul, gyakran aluldiagnosztizált fertőzés és elsősorban különböző bolhák terjesztik (például a *Ctenocephalides felis, Xenopsylla cheopis) (265,266)*. A beteg Indonéziában járt mielőtt tünetei jelentkeztek.

A *Bacillus anthracis* megbetegedések hazánkban sporadikusan fordulnak elő és jellemzően a betegek a mintavételt megelőzően már valamilyen antimikrobiális terápiában részesülnek, így a tenyésztés, vagy akár a PCR vizsgálat negatív eredménnyel zárul. A vizsgálatainkban a betegeknek típusos bőranthrax tünetei voltak, korábban szarvasmarha vágásban vettek részt, amely alapján felvetették a klinikai gyanút (247,267). A *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* megbetegedések esetében sem volt már lehetőség tenyésztésre, mivel szintén a terápia megkezdését követően küldték be a mintákat, jellemzően a betegek elhúzódó tünetek miatt keresik fel a szakrendeléseket, ahol felmerül a gyanú (249). A tularémia és az anthrax is kiemelt jelentőségű potenciális bioterror ágensek által okozott megbetegedések- azonosításuk, tipizálásuk nagy fontossággal bír minden esetben (105,267,268).

Egy esetben *Leptospira santarosai* és parvovírus B19 koinfekciót azonosítottunk egy fatális kimenetelű megbetegedésből. A *Leptospira* fajok sok esetben súlyos, akár több szervi érintettséggel járó megbetegedést okozhatnak, míg a súlyos parvovírus B19 megbetegedések elsősorban haematológiai és immunológiai eltérésekkel rendelkező betegekkel hozható összefüggésbe (269,270). A koinfekció jelenléte felveti a két kórokozó potenciális additív vagy szinergista hatását a betegség súlyosságának alakulásában, bár ennek pontos klinikai jelentősége további vizsgálatokat igényel. Megerősítheti ezt a hipotézist, hogy a mintából nagy mennyiségű *Alphatorquevirus homin4* (torque teno vírus) read is azonosítható volt, ami a gazdaszervezet háttérben álló immunszuppressziójára vagy elégtelen immunreakciójára utaló markerként valószínűsítheti a súlyos koinfekció kialakulását (269–271). Az ilyen komplex infekciók felismerése különösen nehéz lehet célzott diagnosztikai módszerekkel, ami jól szemlélteti az mNGS előnyét több kórokozó egyidejű detektálásában.

Vizsgálataink során azonosítottunk egy orf vírus (ecthyma contagiosum) okozta megbetegedést, a beteg bőrtünetei és állatkontaktusa alapján feltételezték a megbetegdést. A vizsgálatok során két molluscum contagiosum vírus okozta megbetegedést is azonosítottunk. A molluscum contagiosum vírus (MCV) egy humánspecifikus, a

Poxviridae családba tartozó kettősszálú DNS-vírus, amely a bőrön jóindulatú, gyöngyházfényű papulákat (uszodaszemölcsöt) okoz, immunszupprimált betegeknél azonban széles körű, elhúzódó és atypusos formában jelenhet meg. Mindkét minta HIV-pozitív betegből származott és a beküldést az elhúzódó tünetek indikálták. Az azonosított vírusok a globálisan elterjedt 1-es genotípushoz tartoztak (272).

Egy esetben azonosítottunk agyi tályogból származó mintából *Spirometra erinaceieuropaei* infekciót, a mintát pedig elküldtük további patológiai vizsgálatra, de ennek eredménye nem érkezett vissza a tézis beadásáig. Ugyanakkor a megbetegedés anamnézisében szeméttelepen történő munkavégzés szerepelt, ami a szakirodalmi adatok alapján indikálhatja a fertőzést (273).

Biopsziás mintából mNGS alkalmazásával sikerült azonosítanunk és szekvenálnunk a hazai viszonylatban elsőként *Tropheryma whipplei* fertőzést, amely egy krónikus, több szervrendszert érintő megbetegedés etiológiai ágense. A tünetek között szerepel a krónikussá váló hasmenés, a felszívódási zavar, a fogyás, az ízületi fájdalmak. A diagnózisban a vékonybél-biopszia során alkalmazott PAS-festés (Periodic acid–Schiff) segít, amely megmutatja a baktériumokat tartalmazó, PAS-pozitív, diastase-rezisztens habos makrofágokat . Jelen beteg tünetei is krónikussá váló generalizált megbetegedésre utaltak (272) .

Eredményeink összességében azt mutatják, hogy a klinikai metagenomika különösen nagy értéket képvisel azokban az esetekben, amikor a hagyományos diagnosztikai algoritmusok nem vezetnek etiológiai diagnózishoz, illetve amikor ritka, atípusos vagy váratlan kórokozók szerepe merül fel. A módszer diagnosztikai jelentősége mellett közegészségügyi és egészségbiztonsági szempontból is kiemelkedő, mivel támogatja az emerging és re-emerging fertőző ágensek korai felismerését és genomikai jellemzését.

5.1.3 Akut nekrotizáló encephalopathia eredmények megbeszélése

Az ANE esetei különösen fontos tanulságokkal szolgáltak. Bár a CSF minták valamennyi esetben negatív eredményt adtak, a párhuzamosan vizsgált légúti minták mindegyikében influenza A(H1N1)pdm09 vírus (6B.1A.5a.2a klád) volt kimutatható. Ez összhangban áll az ANE feltételezett immunmediált patomechanizmusával, amely szerint a központi idegrendszeri károsodás hátterében nem feltétlenül a vírus közvetlen jelenléte, hanem a fertőzés által kiváltott kóros immunválasz áll (56,59,60,62,274). A szakirodalomban mindössze egy olyan esetet közöltek, amelyben az influenza A vírus a CSF-ből is

kimutatható volt, azonban a szerzők ezt a vér–agy gát fokozott permeabilitásával magyarázták, amely lehetővé tehette a vírus passzív diffúzióját a perifériából a liquorba (275). Az ANE kezelésére vonatkozóan jelenleg nem állnak rendelkezésre egységes, bizonyítékokon alapuló terápiás ajánlások, ugyanakkor a szakirodalom szerint a korán megkezdett kombinált immunmoduláns kezelés kedvezőbb kimenetellel társulhat. Influenza-asszociált ANE esetén emellett az antivirális kezelés, különösen az oseltamivir vagy a zanamivir alkalmazása is kiemelt jelentőségű (56,60,274–276). Mindez hangsúlyozza a metagenomikai vizsgálatok klinikai jelentőségét, mivel a kórokozó gyors azonosítása közvetlenül befolyásolhatja a terápiás döntéshozatalt és a célzott kezelés mielőbbi megkezdését. Eredményeink egyúttal megerősítik, hogy a CSF önálló vizsgálata nem minden esetben alkalmas a kórokozó közvetlen kimutatására, különösen szisztémás fertőzések vagy posztinfekciós, immunmediált kórfolyamatok esetén.

Összefoglalva, a légúti minták vizsgálata során kapott eredményeinkhez hasonlóan a nem légúti minták elemzése is alátámasztotta, hogy az mNGS elsősorban a célzott molekuláris diagnosztikai módszerek kiegészítéseként képvisel jelentős hozzáadott értéket. A nem légúti minták esetében ez különösen azokban a diagnosztikailag összetett esetekben mutatkozott meg, amelyekben a hagyományos mikrobiológiai vizsgálatok nem vezettek etiológiai diagnózishoz, illetve ritka, atípusos vagy előzetesen nem feltételezett kórokozók álltak a klinikai kép hátterében. A célzott módszerekkel szemben az mNGS hipotézismentes megközelítése lehetővé tette olyan mikroorganizmusok azonosítását is, amelyek bevonása a rutin diagnosztikai algoritmusba előzetesen nem feltétlenül lett volna indokolt. Eredményeink így arra utalnak, hogy a módszer különösen az ismeretlen etiológiájú, komplex fertőzésgyanús esetek kivizsgálásában tölthet be fontos kiegészítő szerepet.

5.2 *Burkholderia pseudomallei* eredmények megbeszélése

Vizsgálatunk célja a Magyarországon azonosított, utazással összefüggő *B. pseudomallei* fertőzésekből származó klinikai izolátumok teljesgenom-szekvenálási adatainak elemzése, valamint ezen eredmények nemzetközi kontextusba helyezése volt. A 2008 és 2024 közötti időszakban hazánkban két, utazással összefüggésbe hozható *B. pseudomallei* törzs került azonosításra és teljesgenom-szekvenálásra (584_OEK_2008

és 831_2019_NNK). A két eset klinikai spektruma is jól tükrözte a melioidosis heterogén megjelenését. Az első eset a betegség egyik legritkább, neurológiai érintettséggel járó súlyos formája volt, míg a második eset egy lokalizált tályogképződéssel járó forma, amely a melioidosis egyik leggyakoribb manifesztációjának tekinthető (118–121).

A neuromelioidosis az esetek 1–4%-ában fordul elő globálisan, és magas mortalitási rátával jellemezhető. Emellett a túlélők jelentős részénél maradványtünetek alakulnak ki, amelyek hosszan tartó, akár élethosszig tartó ellátást tehetnek szükségessé (162,277). Európában 2025. szeptember 30-ig összesen 195 megbetegedést publikáltak, ebből a leggyakrabban pneumonia fordult elő 46 esetben, amelyet a különböző tályogok követtek, és mindössze nyolc neurológiai esetet közöltek (104,131). A neuromelioidosis miatt vizsgált betegek életkora 26 és 58 év között volt (medián: 50 év). A leggyakoribb utazási célpont Thaiföld 4 esettel, amelyet 1-1 esettel India, Kambodzsa és Sri-Lanka követ. Olyan eset is ismert, ahol nem volt feltüntetve, vagy nem volt ismert a pontos utazási anamnézis (104). A jelen vizsgálatban szereplő neuromelioidosisban szenvedő beteg esetében gyengeség, láz, fejfájás, arcidegzsába, szepszis, majd központi idegrendszeri fertőzésre utaló tünetek jelentkeztek. A CSF vizsgálata kifejezett gyulladásos eltérést igazolt. Az emelkedett fehérjekoncentráció (1,69 g/L), a jelentős pleocytosis (343 sejt/μL) és a csökkent liquor-glükózszint (2,8 mmol/L) együttesen infekciós eredetű központi idegrendszeri folyamat, meningitis/meningoencephalitis lehetőségét vetették fel. A szakirodalmi adatok alapján neuromelioidosisban gyakori a sejtszám emelkedése, és az esetek jelentős részében limfocita-dominancia figyelhető meg. A CSF fehérjeszintje többnyire emelkedett, míg a liquor glükózszint csökkenése ritkább jelenség, csupán az esetek mintegy 20–25%-ában fordul elő (162,278).

Érdemes kiemelni, hogy a diagnózishoz vezető pozitív mikrobiológiai eredményt végül a többszörösen ismételt aerob hemokultúra szolgáltatta, míg a liquorvizsgálat negatív maradt. Ez összhangban áll a szakirodalommal, amely hangsúlyozza, hogy neuromelioidosis esetén a közvetlenül érintett szövetből, például agyi biopsziából származó minták tenyésztése vagy molekuláris vizsgálata adja a legnagyobb diagnosztikus értéket, míg a CSF pozitivitása alacsony, gyakran 20% alatti (277,279). A hemokultúra pozitivitása sem állandó, amelynek hátterében az intermittáló vagy alacsony fokú bakterémia állhat (162). Mindez arra utal, hogy a neuromelioidosis nem specifikus

tünetei és a mikrobiológiai diagnosztika korlátozott érzékenysége miatt a kórkép valószínűleg aluldiagnosztizált, különösen nem endémiás régiókban.

A diagnózis felállítását a klinikai mikrobiológiai diagnosztika mellett az MRI is segítheti. Neuromelioidosisban az MRI felvételeken gyakran észlelhető kiterjedt agytörzsi érintettség, a háromosztatú ideg (*nervus trigeminus)* megvastagodása, valamint a corticospinalis pályák mentén megjelenő hosszanti kontraszthalmozás („tunnel sign"), amelyek hozzájárulhatnak a kórkép elkülönítéséhez az encephalomyelitis egyéb okaitól, így például a posztinfekciós, autoimmun, paraneoplasztikus vagy virális eredetű folyamatoktól (162,278). E jellegzetes radiológiai mintázatok felismerése különösen fontos lehet nem endémiás területeken, mivel a korai diagnózis és az időben megkezdett célzott antimikrobiális terápia alapvetően befolyásolhatja a kimenetelt (120,159).

A második megbetegedés esetében a nyaki tályog kialakulását megelőzően felső légúti infekció zajlott, ami felveti annak lehetőségét, hogy a megelőző légúti fertőzéshez társuló lokális gyulladásos folyamat hozzájárulhatott a tályog kialakulásához, de ennek pontos szerepe azonban a rendelkezésre álló adatok alapján nem volt megítélhető egyértelműen. A tályogképződés immunológiai hátterében a veleszületett immunválasz intenzív aktivációja áll. A kórokozó felismerését követően neutrofil granulocyták és makrofágok toborzása történik, amelyet proinflammatorikus mediátorok, köztük elsősorban tumornekrózis faktor-α, interleukin-1 -1β (IL), IL-6 és kemokinek, különösen az IL-8/CXCL8 felszabadulása kísér (120,121,139). Ezek a mediátorok elősegítik a gyulladásos sejtek helyszínre jutását, fokozzák az endothel aktivációját, valamint hozzájárulnak a lokális szövetkárosodás és necrosis kialakulásához. Az elpusztult neutrofilek, sejttörmelékek, fibrin és mikrobiális komponensek felhalmozódása vezet a tályog központi, gennyel telt üregének kialakulásához. *B. pseudomallei* fertőzésben ezt a folyamatot tovább súlyosbíthatja a kórokozó intracelluláris perzisztenciája, amely megnehezíti a teljes immunológiai eliminációt, és elősegítheti a perzisztáló vagy recidiváló fertőzés fennmaradását (119,157). A folyamat részletesebb megértéséhez jövőbeni vizsgálatokban indokolt lehet a gyulladásos mediátorok, valamint adott esetben interferon-γ célzott elemzése is, mivel ezek hozzájárulhatnak a tályogképződés, a szöveti destrukció és a klinikai kimenetel összefüggéseinek pontosabb feltárásához (119–121,127,157,280)

A perzisztáló fertőzés epidemiológiai szempontból is kockázatot jelent, mivel elméletileg nem endémiás területen is hozzájárulhat a kórokozó környezeti megjelenéséhez. Ennek hátterében az állhat, hogy a baktérium bizonyos esetekben székletből és vizeletből is kimutatható tenyésztéssel, vagy molekuláris vizsgálatokkal, illetve a beteg krónikus baktérium ürítővé is válhat, ami hozzájárulhat a környezet kontaminációjához (120,146,157,166). Figyelembe véve a *B. pseudomallei* jelentős adaptációs képességét, ez hozzájárulhat a környezeti perzisztenciához (281). Bár ennek gyakorlati népegészségügyi jelentősége nem endémiás környezetben feltehetően korlátozott, a perzisztencia és intermittáló ürítés lehetőségét és dinamikáját a kórokozó járványtani sajátosságainak értékelésekor figyelembe kell venni (114,115,120,121). Az emberről-emberre terjedés ritka, a krónikus fertőzés és a környezeti rezervoárhoz való adaptáció lehetősége indokolttá teszi a betegkövetést, valamint a jövőben az esetleges surveillance-rendszerek kialakításának mérlegelését nem endémiás régiókban is (152,154,282).

A melioidosis Magyarországon ritka, ugyanakkor globálisan járványügyileg kiemelt jelentőségű utazással összefüggő fertőzésnek tekinthető ma már (104,131). A kórokozó súlyos klinikai megjelenési formái, a diagnosztikai nehézségek, valamint a magas letalitás és a potenciálisan elhúzódó kimenetel miatt az ilyen esetek mikrobiológiai vizsgálata és genomikai feldolgozása különös jelentőséggel bírnak (121).

Eredményeink azt is hangsúlyozzák, hogy a nem endémiás térségekben a melioidosis felismeréséhez az utazási anamnézis célzott felvétele, a klinikai gyanú fenntartása és a referencialaboratóriumi háttér egyaránt nélkülözhetetlen.

A teljesgenom-szekvenálás megerősítette a fajra jellemző genomikai struktúrát, ugyanakkor a tipizálási eredmények jelentős diverzitást tártak fel. Az in silico MLST eredmények alapján az 584_OEK_2008 izolátum az *ndh* gén új, eddig ismeretlen allélváltozata alapján új szekvenciatípusba (ST1643) tartozott, ami kiemeli a nem endémiás régiókban végzett genomikai surveillance jelentőségét és a globális populáció diverzitásának további feltérképezési igényét. A 831_NNK_2019 izolátum az ismert ST1051 típusba tartozott, amelynek ázsiai és ausztráliai előfordulása is ismert. Ez a megfigyelés rámutat a homoplasia jelentőségére a *B. pseudomallei* populációgenetikájában. A homoplasia egy olyan jelenség, amikor azonos vagy hasonló genetikai mintázatok egymástól függetlenül, nem közvetlen közös leszármazás következtében jelennek meg. A *B. pseudomallei* esetében ez különösen fontos, mivel az

MLST-alapú szekvenciatípusok földrajzi eredete és filogenetikai kapcsolatai nem mindig tükrözik egyértelműen a valódi evolúciós rokonságot. Ezt a jelenséget korábban már a szakirodalomban leírták (139,283). A PubMLST adatbázis átvizsgálása során az európai esetek aránya ~1% (74/7510 izolátum), melyek döntő többsége humán eredetű (238). Az európai esetek közel felében (33 izolátum, 44,6%) az expozíció földrajzi eredete nem volt egyértelműen meghatározható, ami az importált és potenciálisan aluldiagnosztizált esetek jelentőségére utalhat. A dokumentált eredetű izolátumok közül 24 (32,4%) ázsiai, 7 (9,4%) afrikai, míg 1 (1,4%) karibi forráshoz volt köthető.

A cgMLST-alapú összehasonlító analízis is nagy felbontású bizonyítékot szolgáltatott a két eset független, importált eredetére. A RAST-alapú funkcionális annotáció alapján az 584_2008_OEK izolátumban 299, míg a 831_2019_NNK izolátumban 300 virulencia - asszociált gén volt azonosítható. Ez arra utal, hogy a két vizsgált törzs virulencia-repertoárja összességében igen hasonló, ugyanakkor egyes, patogenetikai és epidemiológiai szempontból releváns különbségek is kimutathatók voltak közöttük. A virulenciafaktorok közül az ázsiai filogenetikai vonalakhoz jól illeszkedő YLF génklaszter mindkét izolátumban jelen volt, míg a neuromelioidosis esetben azonosított *bimA*$_{\text{bm}}$ variáns potenciálisan releváns genotípus-fenotípus összefüggést vet fel a neurotropizmus tisztázása érdekében, amely további vizsgálatokat indokolhat a jövőben, akár transzkriptomikai módszerekkel is (145,284). A két vizsgált genom emellett számos, a humán patogenitással összefüggésbe hozható determinánst hordozott, beleértve az *fhaB3* gént, a *toxA* jelenlétét, a T3SS komponenseit, valamint a tokpoliszacharid-bioszintézishez szükséges *wcb* operont is (139,141,142,144). Mindkét izolátumban azonosítható volt a LPS bioszintézisében szerepet játszó teljes wcb operon, de az attenuációval összefüggésbe hozható mutációt nem detektáltunk, ami arra utal, hogy a törzsek e virulencia-asszociált tulajdonságok tekintetében intakt genetikai háttérrel rendelkeznek. A két izolátum eltérő LPS szerotípusba tartozott, ami epidemiológiai és populációgenetikai szempontból is releváns lehet, mivel az LPS-típusok földrajzi megoszlása és klinikai jelentősége a szakirodalomban eltérő mintázatot mutat(148).

Az antimikrobiális rezisztenciagének vizsgálata szintén különbséget mutatott a két izolátum között. Az 584_OEK_2008 izolátumban azonosított *bla*OXA-*57*, *bla*PenI, valamint az *amr*AB efflux rendszer és az *omp*38 jelenléte összetettebb rezisztenciaprofilra utal, mint a 831_NNK_2019 izolátumban detektált, önmagában jelen

lévő *bla*OXA-59 gén. Ez a különbség klinikai szempontból sem elhanyagolható, mivel a *B. pseudomallei* terápiája eleve limitált számú hatékony szerre épül, és a természetes, illetve szerzett rezisztenciamechanizmusok jelenléte befolyásolhatja a kezelési stratégiát (119–121). Különösen fontos, hogy az efflux rendszerek és a membránpermeabilitással összefüggő faktorok nemcsak az antibiotikumokkal szembeni érzékenységet, hanem a baktérium perzisztenciáját és túlélési képességét is módosíthatják (119,127,139). A szakirodalmi adatok szerint az RND-típusú effluxrendszerek, köztük az AmrAB-OprA, valamint a külső membrán permeabilitását meghatározó struktúrák fontos szerepet töltenek be a *B. pseudomallei* különböző környezeti és antimikrobiális stresszhatásokkal szembeni adaptációjában. Az effluxaktivitás fokozódása, illetve a membránpermeabilitás csökkenése mérsékelheti az antimikrobiális szerek sejten belüli koncentrációját, ami kedvezhet a baktérium túlélésének tartós szelekciós nyomás mellett módosíthatják (119,127,139). A dél-ázsiai törzsek molekuláris epidemiológiájára vonatkozóan továbbra is korlátozott adat áll rendelkezésre, ami nehezíti a globális filogenetikai kapcsolatok pontos értelmezését (120,139). A teljesgenom-alapú tipizálás napjainkra meghatározó eszközzé vált az importált esetek epidemiológiai hátterének tisztázásában és a globális terjedési mintázatok feltérképezésében (120,139). A homoplasia problematiákájank feloldása érdekében a nagyobb felbontású módszerek, így különösen a cgMLST alkalmazása, alapvető fontosságú a pontosabb epidemiológiai következtetések levonásához (171).

Eredményeink összességében arra utalnak, hogy a molekuláris és genomikai módszerek alkalmazása nem endémiás régiókban is meghatározó jelentőségű a melioidosis korai felismerésében, epidemiológiai értelmezésében és kockázatbecslésében. Ez különösen releváns a globális mobilitás és a klímaváltozás kontextusában, amelyek hosszabb távon a kórokozó környezeti túlélésének és esetleges lokális megtelepedésének feltételeit is befolyásolhatják. Ennek megfelelően a genomikai alapú surveillance-rendszerek az európai és nemzetközi egészségbiztonsági keretrendszerekkel összhangban kulcsszerepet játszhatnak a behurcolt fertőzések korai felismerésében, valamint molekuláris epidemiológiai nyomon követésében (130,285).

5.3 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* eredmények megbeszélése

Vizsgálatunk a Magyarországon 2018 és 2025 között azonosított klinikailag releváns NTVC-izolátumok első átfogó klinikai, epidemiológiai és genomikai elemzését mutatja be. Eredményeink igazolják, hogy az NTVC törzsek hazánkban is klinikailag jelentős opportunista kórokozóknak tekinthetők, amelyek nemcsak gastrointestinalis, hanem súlyos extraintestinalis fertőzések kialakítására is képesek. A vizsgált kohorsz epidemiológiai jellemzői, szezonális megjelenése, valamint a genomikai vizsgálatok eredményei jól illeszkednek a nemzetközi trendekhez, amelyek az elmúlt évtizedben az NTVC-fertőzések fokozódó közegészségügyi jelentőségére hívták fel a figyelmet (183,189,190). Magyarországon korábban Szita János és munkatársai 1971 és 1976 között 200 NTVC-törzset izoláltak, amelyek közül 18 humán eredetű volt (286). Bár a korabeli azonosítási módszerek elsősorban klasszikus biokémiai vizsgálatokra és szerológiai reakciókra épültek, a szerzők már ekkor felhívták a figyelmet arra, hogy a nem agglutináló, atípusos *Vibrio cholerae* törzsek sem feltétlenül apatogének. Kísérletes modelljeikben ezek a törzsek nekrózist, illetve kifejezett citopátiás hatást okoztak, ami korán jelezte klinikai jelentőségüket (286).

A 25 klinikai eset közül mindössze három volt utazással összefüggésbe hozható, míg a betegek döntő többségénél külföldi expozíció nem volt igazolható. Ezzel párhuzamosan a referencia-laboratóriumba a vizsgált időszak során rendszeresen érkeztek hazai környezeti izolátumok megerősítő vizsgálatra, ami szintén megerősíti, hogy a baktérium tartósan jelen van a hazai vízi környezetben. Bár a fertőzések eredete valamennyi esetben nem igazolható egyértelműen, eredményeink és a nemzetközi tapasztalatok egyaránt azt valószínűsítik, hogy Magyarországon a NTVC hazai expozíció következtében is okozhat humán megbetegedéseket (183,192,210,287,288). Ez egyúttal arra is rámutat, hogy az NTVC-fertőzések valós előfordulása feltehetően magasabb a diagnosztizált esetek számánál, mivel az enyhébb, sokszor önkorlátozó megbetegedések, vagy empirikus antibiotikum-kezelés mellett gyógyuló esetek gyakran etiológiai tisztázás nélkül maradnak (186,289).

A három utazással összefüggő eset közül egy ausztriai édesvízi expozícióhoz, míg kettő kolera-endémiás országokhoz (India, Egyiptom) kapcsolódott. Meglepő módon az egyiptomi és az indiai eseteknél sem a klasszikus toxintermelő *V. cholerae*-t azonosítottunk, hanem NTVC-törzsek álltak a megbetegedések hátterében (175,190,290).

Ez jól illeszkedik ahhoz a nemzetközi megfigyeléshez, hogy NTVC-törzsek klinikai jelentősége világszerte növekszik, beleértve a korábban elsősorban kolera-endémiásként számontartott régiókat is (190,291).

A megbetegedések döntő többsége nyár végén és kora ősszel jelentkezett, ami jól illeszkedik a vízi környezethez köthető expozíciókhoz, a magasabb vízhőmérséklethez és a *Vibrio* fajok szezonális felszaporodásához, összhangban a hazai és európai megfigyelésekkel (175,210,286,287).

A vizsgált kohorsz klinikai jellemzői alapján az NTVC-fertőzések Magyarországon elsősorban nem enterális, hanem invazív megbetegedések formájában jelentkeztek. A leggyakoribb klinikai manifesztáció a szepszis volt, amely egyben a legsúlyosabb kimenetelű fertőzésnek is bizonyult, mivel mindkét haláleset ehhez a klinikai formához társult. Ez összhangban áll a nemzetközi tapasztalatokkal, amelyek szerint az NTVC elsősorban időskorban, illetve alapbetegségek fennállása esetén okoz opportunista, invazív fertőzéseket (178,197,210). A gastroenteritis a második leggyakoribb klinikai megjelenési forma volt, azonban ezek a fertőzések a klasszikus kolerával ellentétben többnyire enyhe, önkorlátozók lefolyásúak. Több esetben egyéb enterális kórokozóval kialakuló koinfekció is igazolható volt, ami korlátozta az NTVC egyértelmű etiológiai szerepének megítélését (192). Ezzel szemben az extraintestinalis fertőzések, különösen a szepszis, a sebfertőzés, valamint a pulmonalis manifesztációk nagyobb valószínűséggel tükröznek valódi patogenetikai szerepet.

A pulmonalis fertőzések külön figyelmet érdemelnek, mivel az NTVC által okozott pneumonia rendkívül ritka klinikai megjelenési forma. Vizsgálataink során két pneumoniahoz társuló esetet azonosítottunk. Az egyik beteg esetében a fertőzés fulladásközeli eseményt követően, édesvíz aspiráció után alakult ki. Egyedülálló lehetőséget biztosított, hogy a feltételezett expozíciós helyről három környezeti izolátumot is vizsgálni tudtunk. A cgMLST-analízis nulla allélikus eltérést igazolt a klinikai és valamennyi környezeti izolátum között, amely közvetlen genomikai bizonyítékot szolgáltatott a fertőzés környezeti és egyben autochton eredetére. Tudomásunk szerint ez az első Európában leírt primer pulmonalis NTVC-fertőzés, amelyhez teljes genomikai bizonyíték társult a környezeti forrás és a humán megbetegedés közötti kapcsolatra (198,203,292,293). A szakirodalom áttekintése alapján világszerte mindössze három hasonló eset ismert, amelyek közül kettő bacteraemiával

társuló pneumoniaként jelentkezett, míg csupán egy primer pulmonalis fertőzést írtak le az Egyesült Államokból, szintén édesvízi aspirációt követően (198,203,292,293). Bár más *Vibrio* fajok, például a *Vibrio vulnificus* és a *Vibrio metschnikovii* esetében szintén leírtak pneumoniahoz társuló megbetegedéseket, ugyanakkor a pulmonalis tropizmus hátterében álló virulenciafaktorok jelenleg nem ismertek (292,293). Vizsgálataink során a pneumoniahoz kapcsolódó környezeti és klinikai izolátumok gyakorlatilag azonos virulenciaprofillal rendelkeztek. A klasszikusan nagy virulenciájú determinánsok, például a T3SS vagy a VPS-régiók hiányoztak, míg a VSP1 és VSP2 régiók részleges jelenléte volt kimutatható, amelyek humán patogenitásban betöltött szerepe továbbra sem tisztázott (294). Eredményeink arra utalnak, hogy a pulmonalis fertőzés kialakulásában feltehetően nem egyetlen specifikus virulenciafaktor, hanem a gazdaszervezet fogékonysága, az aspiráció következtében kialakuló közvetlen expozíció és több, egymást kiegészítő bakteriális tulajdonság együttesen játszhat szerepet (198,203–205).

A teljesgenom-szekvenálás eredményei megerősítették, hogy a vizsgált klinikai izolátumok (n=25) egyike sem hordozta a klasszikus kolera kialakulásáért felelős virulenciagéneket, így a *ctx*AB, *ace*, *zot* és *tcp* determinánsokat. Ezzel szemben az alternatív virulenciafaktorok nagy gyakorisággal fordultak elő a vizsgált törzsekben. A *hly*A hemolizin gén az izolátumok 84%-ában, az RTX-toxin rendszerhez kapcsolódó gének 64%-ában, míg a vasfelvételben szerepet játszó *fur* és *feo*ABC gének egyaránt az izolátumok 76%-ában voltak kimutathatók. A T6SS komponensei az izolátumok közel felében (44%), míg a quorum sensing rendszerhez kapcsolódó *luxS* gén mindössze két izolátumban (8%) fordult elő. Ez a virulenciaprofil jól illeszkedik az NTVC-törzsekre korábban leírt molekuláris mintázathoz, és megerősíti, hogy ezen baktériumok a klasszikus koleratoxintól független virulenciamechanizmusok révén is képesek klinikailag jelentős fertőzések kialakítására (192,294,295). Különösen figyelemre méltó volt a vasfelvételben szerepet játszó *fur* és *feo*ABC gének magas prevalenciája. A gazdaszervezetben rendelkezésre álló szabad vas mennyisége rendkívül alacsony, ezért a hatékony vasfelvételi rendszerek a *Vibrio* fajok túlélésének és invazivitásának alapvető tényezői (296). Eredményeink alapján is feltételezhető, hogy ezen rendszerek hozzájárulhatnak ahhoz, hogy az NTVC-törzsek a klasszikus koleratoxin hiánya ellenére is képesek legyenek véráramfertőzések és egyéb invazív megbetegedések kialakítására (198,207).

Az antimikrobiális rezisztenciával összefüggő genetikai determinánsokat a vizsgált izolátumok 64%-ában azonosítottuk. A leggyakoribb gének a lipid A módosításában szerepet játszó *alm*E, *alm*F és *alm*G gének voltak, amelyeket a *qnr*VC családba tartozó kinolonrezisztencia-gének követtek. β-laktamáz gének az izolátumok 20%-ában fordultak elő, elsősorban *bla*CARB-7, kisebb gyakorisággal pedig *bla*PSE és *amp*C formájában. Bár a genomalapú rezisztenciapredikció önmagában nem helyettesíti a fenotípusos érzékenységi vizsgálatokat, eredményeink részletes képet adnak a hazai NTVC-populáció potenciális rezisztenciamechanizmusairól, és értékes alapot biztosítanak a rezisztenciatrendek hosszú távú monitorozásához (182,183,192).

A cgMLST-alapú elemzés jelentős genetikai heterogenitást igazolt a hazai klinikai NTVC-populációban. Ez a magas fokú polimorfizmus és diverzitás összhangban áll a nemzetközi és európai szakirodalmi adatokkal, igazolva, hogy a megbetegedéseket nem egyetlen domináns klonális vonal terjedése, hanem egymástól genetikailag távoli törzsek okozzák (175,181,210,297–302). A cgMLST-eredmények ugyanakkor nemcsak a populáció genetikai diverzitását igazolták, hanem a környezeti és klinikai izolátumok közötti kapcsolat vizsgálatára is alkalmasnak bizonyultak.

Összességében, eredményeink bizonyítják, hogy az NTVC Magyarországon valós, klinikailag releváns fertőzéseket okoz. A klasszikus koleratoxin hiánya ellenére e törzsek alternatív virulenciafaktorok révén képesek mind gastrointestinalis, mind súlyos extraintestinalis kórképek kiváltására (175,178,181,206,298,300,301). Mindez indokolja a klinikai éberség fokozását, a környezeti és humán izolátumok integrált monitorozását, valamint a nagy felbontású genomikai surveillance rutinszerűbb alkalmazását. Saját eredményeink különösen fontos bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a környezeti forrásból származó NTVC törzsek és a humán fertőzések közötti kapcsolat Magyarországon is közvetlenül igazolható, ami a jövőbeni járványügyi felügyelet és kockázatbecslés szempontjából kiemelt jelentőségű és szoros együttműködést igényel a társszakmák részéről.

Eredményeink időszerűségét tovább növeli, hogy az ECDC 2025-ben megkezdte az európai szintű önkéntes vibriosis surveillance rendszer kialakítását a tagállamok együttműködésével, felismerve a klímaváltozással összefüggésben növekvő közegészségügyi jelentőségét. Ebben a környezetben a nagy felbontású genomikai tipizálási módszerek alkalmazása, valamint a klinikai és környezeti adatok integrált

értékelése várhatóan egyre fontosabb szerepet kap a vibriózisok európai surveillance-ében és a fertőzések epidemiológiai hátterének feltárásában (247,303).

6.Következtetések

Jelen doktori értekezés célja az ismeretlen etiológiájú, ritka vagy újonnan megjelenő (emerging) kórokozók által okozott fertőző betegségek diagnosztikájának fejlesztése volt korszerű genomikai módszerek alkalmazásával. Az elvégzett vizsgálatok igazolták, hogy a klinikai mNGS és a teljesgenom-szekvenálás (WGS) a hagyományos mikrobiológiai módszereket hatékonyan kiegészítő, nagy hozzáadott értékű diagnosztikai és járványügyi eszközök.

Eredményeink igazolták, hogy a klinikai metagenomika hatékony kiegészítő diagnosztikai módszer olyan esetekben, amikor a rutin mikrobiológiai vagy célzott molekuláris vizsgálatok nem vezetnek etiológiai diagnózishoz. Az mNGS különösen hasznosnak bizonyult ritka, atípusos vagy váratlan kórokozók azonosításában, valamint komplex differenciáldiagnosztikai helyzetekben. A légúti minták vizsgálata során az mNGS nem célzott megközelítése lehetővé tette a mintákban jelen lévő kórokozók széles körű, egyidejű vizsgálatát, valamint a polimikrobiális fertőzések és az összetett fertőzéses kórképek felismerését. Eredményeink rámutattak arra, hogy a klinikai metagenomika elsősorban kiegészítő diagnosztikai módszerként alkalmazható jelenleg, különösen olyan esetekben, amikor a feltételezett kórokozó előzetesen nem ismert, több kórokozó együttes jelenléte merül fel, vagy a célzott vizsgálatok nem vezetnek etiológiai diagnózishoz.

A nem légúti minták vizsgálata során az mNGS számos ritka, atípusos vagy váratlan kórokozó azonosítását tette lehetővé. A *Balamuthia mandrillaris*, *Spirometra erinaceieuropaei*, *Tropheryma whipplei*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia typhi*, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* és *Bacillus anthracis* kimutatása alátámasztja, hogy a metagenomikai diagnosztika különösen nagy jelentőséggel bír ritka, alacsony prevalenciájú, illetve komplex differenciáldiagnosztikai helyzetet jelentő fertőzések kivizsgálásában. Az akut nekrotizáló encephalopathia vizsgálata során kapott eredmények továbbá megerősítették az influenza A-vírus-fertőzés és az immunmediált kórfolyamat közötti kapcsolatot.

A teljesgenom-szekvenálás alkalmazása lehetővé tette a Magyarországon azonosított *B. pseudomallei* törzsek nagy felbontású genetikai jellemzését. Eredményeink igazolták, hogy a két hazai melioidosis eset egymástól független, utazással összefüggő behurcolás következménye volt. A WGS-vizsgálatok részletes információt szolgáltattak a törzsek

filogenetikai eredetéről, valamint virulencia- és rezisztenciaprofiljáról, demonstrálva a genomikai epidemiológia közegészségügyi jelentőségét.

A Magyarországon 2018 és 2025 között azonosított NTVC izolátumok vizsgálata jelentős klinikai és genetikai diverzitást tárt fel. Eredményeink valószínűsítik, hogy a fertőzések döntően hazai környezeti expozícióhoz köthetők, és összefüggésben állnak a kórokozó hazai környezeti jelenlétével. A teljesgenom-szekvenálás igazolta, hogy az invazív fertőzések kialakulása nem egyetlen domináns klónhoz köthető, hanem genetikailag heterogén törzsekhez társul. A klasszikus koleratoxin-gének hiánya ellenére számos alternatív virulenciafaktor és rezisztenciával összefüggő genetikai determináns volt kimutatható, amelyek szerepet játszhatnak az extraintestinalis és invazív fertőzések kialakulásában. A primer nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* pneumonia klinikai és környezeti izolátumai közötti genomikai kapcsolat elsőként szolgált európai bizonyítékkal édesvízi expozícióhoz köthető aspirációs pneumonia kialakulására, és közvetlenül igazolta a klinikai és környezeti izolátumok közötti kapcsolatot, alátámasztva a fertőzés autochton eredetét.

Összességében eredményeim igazolják, hogy a genomikai módszerek, különösen a klinikai metagenomika és a teljesgenom-szekvenálás, a modern infektológiai diagnosztika és a közegészségügyi surveillance nélkülözhetetlen eszközeivé váltak. Alkalmazásuk nemcsak a ritka vagy újonnan megjelenő kórokozók gyorsabb és pontosabb felismerését teszi lehetővé, hanem hozzájárul a fertőzések epidemiológiai hátterének feltárásához, a kórokozók terjedésének nyomon követéséhez, valamint a közegészségügyi döntéshozatal támogatásához. A bemutatott eredmények alátámasztják, hogy a genomikai megközelítések integrálása a rutin mikrobiológiai diagnosztikába és a közegészségügyi surveillance rendszerekbe a jövőben meghatározó szerepet fog betölteni a fertőző betegségek felismerésében, monitorozásában és a hatékony járványügyi beavatkozások támogatásában.

Új tudományos eredmények:

1. **Hazai körülmények között elsőként validáltam és alkalmaztam klinikai metagenomikai újgenerációs szekvenálási (mNGS) munkafolyamatot légúti és egyéb klinikai minták vizsgálatára**, amely alkalmasnak bizonyult ritka, atípusos és hagyományos módszerekkel nehezen diagnosztizálható fertőző ágensek kimutatására. Eredményeim igazolták, hogy az mNGS jelentős diagnosztikai többletértéket képvisel a rutin mikrobiológiai módszerekhez képest.
2. **Teljesgenom-szekvenálással részletesen jellemeztem a Magyarországon azonosított két humán melioidosis esetet**, és cgMLST elemzéssel igazoltam, hogy a fertőzések egymástól független, utazással összefüggő behurcolások eredményei voltak. A vizsgált törzsek filogenetikai helyzetének meghatározásával hozzájárultam a hazai melioidosis esetek molekuláris epidemiológiai megismeréséhez.
3. **Elsőként végeztem átfogó genomikai epidemiológiai vizsgálatot a Magyarországon 2018–2025 között azonosított klinikai nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* izolátumokon**, amely során igazoltam a hazai törzsek jelentős genetikai diverzitását, valamint meghatároztam azok legfontosabb virulencia- és antimikrobiális rezisztenciadeterminánsait.
4. **Korábbi vizsgálatainkat kiegészítve teljesgenom-szekvenálási adatokkal igazoltam egy primer nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* pneumonia klinikai és környezeti izolátumai közötti közvetlen genomikai kapcsolatot**, amely Európában elsőként szolgált molekuláris bizonyítékkal édesvízi expozícióhoz kapcsolódó fertőzés kialakulására.

7. Összefoglalás

A fertőző betegségek diagnosztikájában a genomikai módszerek egyre meghatározóbb szerepet töltenek be. Jelen doktori értekezés célja az ismeretlen etiológiájú, ritka vagy újonnan megjelenő (emerging) kórokozók által okozott fertőző betegségek diagnosztikájának fejlesztése volt klinikai metagenomikai újgenerációs szekvenálás (mNGS) és teljesgenom-szekvenálás (WGS) alkalmazásával.

A dolgozat első részében légúti és egyéb klinikai minták metagenomikai vizsgálatát végeztem. Az mNGS lehetővé tette a kórokozók nem célzott, egyidejű kimutatását, valamint az összetett fertőzéses esetek etiológiai hátterének feltárását. Számos ritka vagy váratlan kórokozó azonosítására nyílt lehetőség, igazolva, hogy a klinikai metagenomika értékes kiegészítő diagnosztikai módszer a hagyományos mikrobiológiai vizsgálatokkal nem tisztázható fertőzések esetében. Az akut nekrotizáló encephalopathia vizsgálata megerősítette az influenza A-vírus-fertőzés és az immunmediált kórfolyamat kapcsolatát.

A dolgozat második részében két magyarországi melioidosis eset genomikai elemzését végeztem. A WGS- és cgMLST-vizsgálatok igazolták, hogy a fertőzések egymástól független, utazással összefüggő behurcolások következményei voltak.

A dolgozat harmadik részében a Magyarországon 2018 és 2025 között azonosított 25 klinikai, nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* izolátum molekuláris epidemiológiai és genomikai vizsgálatát végeztem. Eredményeink valószínűsítik, hogy a fertőzések döntően hazai környezeti expozícióhoz köthetők. A teljesgenom-szekvenálás jelentős genetikai diverzitást, valamint alternatív virulencia- és rezisztenciával összefüggő genetikai determinánsokat tárt fel. Kiemelt eredmény volt egy primer, NTVC pneumonia esetének vizsgálata, amely elsőként szolgáltatott európai genomikai bizonyítékot a klinikai és környezeti izolátumok közötti közvetlen kapcsolatra.

Eredményeim igazolják, hogy a klinikai metagenomika és a teljesgenom-szekvenálás jelentősen hozzájárul a ritka, újonnan megjelenő vagy ismeretlen etiológiájú fertőző betegségek diagnosztikájához és a közegészségügyi jelentőségű kórokozók molekuláris epidemiológiai vizsgálatához. A genomikai módszerek rutinszerű alkalmazása várhatóan tovább javítja a fertőző betegségek felismerését, a betegellátást és a közegészségügyi felkészültséget.

8. Summary

Genomic methods are playing an increasingly important role in the diagnosis of infectious diseases. The aim of this doctoral dissertation was to improve the diagnosis of infectious diseases caused by pathogens of unknown etiology, rare pathogens, and emerging pathogens through the application of clinical metagenomic next-generation sequencing (mNGS) and whole-genome sequencing (WGS).

The first part of the dissertation focused on the metagenomic analysis of respiratory and other clinical specimens. The non-targeted approach of mNGS enabled the simultaneous detection of a broad range of pathogens and facilitated the identification of the etiology of complex infectious cases. Numerous rare or unexpected pathogens were identified, demonstrating that clinical metagenomics represents a valuable complementary diagnostic tool in cases where conventional microbiological methods fail to establish the causative agent. Furthermore, the investigation of acute necrotizing encephalopathy confirmed the association between influenza A virus infection and immune-mediated pathogenesis.

The second part of the dissertation presents the genomic analysis of two melioidosis cases diagnosed in Hungary. WGS and cgMLST analyses demonstrated that the infections resulted from two independent travel-associated importation events.

The third part of the dissertation investigated the molecular epidemiology and genomic characteristics of 25 clinical non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* isolates identified in Hungary between 2018 and 2025. Our findings suggest that most infections were associated with domestic environmental exposure. Whole-genome sequencing revealed considerable genetic diversity together with alternative virulence- and antimicrobial resistance-associated genetic determinants. A major finding was the investigation of a primary non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* pneumonia case, providing the first genomic evidence in Europe of a direct link between clinical and environmental isolates.

Overall, the findings demonstrate that clinical metagenomics and whole-genome sequencing substantially contribute to the diagnosis of rare, emerging, and infectious diseases of unknown etiology, as well as to the molecular epidemiological investigation of pathogens of public health importance. The routine implementation of genomic methods is expected to further improve the diagnosis of infectious diseases, patient management, and public health preparedness.

9.Irodalomjegyzék

1. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. Nature. 2008 Feb;451(7181):990–3. doi:10.1038/nature06536
2. Cumming GS. Protected area management has significant spillover effects on vegetation. Nature. 2026 Feb 19;650(8102):642–51. doi:10.1038/s41586-025-09837-8
3. A genomic approach to microbiology. Nat Rev Genet. 2019 Jun 17;20(6):311–311. doi:10.1038/s41576-019-0131-5
4. Tartari E, Meşe EA, Bulabula ANH, Dancer SJ, Giacobbe DR, Krone M, et al. Position statement: integrating planetary health into infection prevention and control in healthcare settings—towards a balanced and evidence-based approach. Clinical Microbiology and Infection. 2026 Apr. doi:10.1016/j.cmi.2026.04.017
5. One Health Joint Plan of Action (2022-2026) - Working together for the health of humans, animals, plants and the environment. 2022 Nov. doi:10.20506/9789295121430
6. Banerjee S, van der Heijden MGA. Soil microbiomes and one health. Nat Rev Microbiol. 2023 Jan 23;21(1):6–20. doi:10.1038/s41579-022-00779-w
7. Musicha P, Morse T, Cocker D, Mugisha L, Jewell CP, Feasey NA. Time to define One Health approaches to tackling antimicrobial resistance. Nat Commun. 2024 Oct 10;15(1):8782. doi:10.1038/s41467-024-53057-z
8. Jevtic M. Planetary health as a paradigm shift towards health and well-being. Eur J Public Health. 2024 Nov 1;34(Supplement_3). doi:10.1093/eurpub/ckae144.829
9. Chiu CY, Miller SA. Clinical metagenomics. Nat Rev Genet. 2019 Jun 27;20(6):341–55. doi:10.1038/s41576-019-0113-7
10. Fournier PE, Dubourg G, Raoult D. Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. Genome Med. 2014 Nov 29;6(11):114. doi:10.1186/s13073-014-0114-2

11. Possas C, Marques ETA, Kuchipudi S V., Kumar P, Kim JH, Homma A. Disease X in the Tropics, preventing the next pandemic: how to accelerate spillover prevention and vaccine preparedness? Frontiers in Tropical Diseases. 2024 Jul 4;5. doi:10.3389/fitd.2024.1417065
12. Schlagenhauf P, Weld L, Goorhuis A, Gautret P, Weber R, von Sonnenburg F, et al. Travel-associated infection presenting in Europe (2008–12): an analysis of EuroTravNet longitudinal, surveillance data, and evaluation of the effect of the pre-travel consultation. Lancet Infect Dis. 2015 Jan;15(1):55–64. doi:10.1016/S1473-3099(14)71000-X
13. Chatterjee P, Nair P, Chersich M, Terefe Y, Chauhan AS, Quesada F, et al. One Health, “Disease X” & the challenge of “Unknown” Unknowns. Indian Journal of Medical Research. 2021 Mar;153(3):264–71. doi:10.4103/ijmr.IJMR_601_21
14. The European Union One Health 2023 Zoonoses report. EFSA Journal. 2024 Dec;22(12). doi:10.2903/j.efsa.2024.9106
15. Carroll KC, HJA, MS, MSA, MTA, DB, et al. (eds). Principles of diagnostic medical microbiology. Vol. 27e. New York, NY: McGraw-Hill Education: Jawetz, Melnick, & Adelberg’s medical microbiology; 2019.
16. Wang R, Wang H, Jiang J, Xu S, Dong M. Diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in the etiological diagnosis of lower respiratory tract infection. Sci Rep. 2025 Nov 14;15(1):39987. doi:10.1038/s41598-025-23695-4
17. Wang H, Zhang W, Tang YW. Clinical microbiology in detection and identification of emerging microbial pathogens: past, present and future. Emerg Microbes Infect. 2022 Dec 31;11(1):2579–89. doi:10.1080/22221751.2022.2125345
18. Kwong JC, Mccallum N, Sintchenko V, Howden BP. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. Pathology. 2015 Apr;47(3):199–210. doi:10.1097/PAT.0000000000000235
19. Motro Y, Moran-Gilad J. Next-generation sequencing applications in clinical bacteriology. Biomol Detect Quantif. 2017 Dec;14:1–6. doi:10.1016/j.bdq.2017.10.002

20. Nwadiugwu MC, Monteiro N. Applied genomics for identification of virulent biothreats and for disease outbreak surveillance. Postgrad Med J. 2023 Jun 8;99(1171):403–10. doi:10.1136/postgradmedj-2021-139916
21. Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2019 Jan 24;14(1):319–38. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751
22. Schlaberg R, Chiu CY, Miller S, Procop GW, Weinstock G. Validation of Metagenomic Next-Generation Sequencing Tests for Universal Pathogen Detection. Arch Pathol Lab Med. 2017 Jun 1;141(6):776–86. doi:10.5858/arpa.2016-0539-RA
23. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. Hum Immunol. 2021 Nov;82(11):801–11. doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012
24. Hilt EE, Ferrieri P. Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. Genes (Basel). 2022 Aug 31;13(9):1566. doi:10.3390/genes13091566
25. Anekpo CC, Okpara TC, Nnadi CG. Application of genomic studies in epidemiological surveillance: A mini-overview. Bio-Research. 2024 Mar 18;22(1):2292–301. doi:10.4314/br.v22i1.7
26. Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TEA, Crook DW. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. Nat Rev Genet. 2012 Sep 7;13(9):601–12. doi:10.1038/nrg3226
27. Köser CU, Ellington MJ, Cartwright EJP, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M, et al. Routine Use of Microbial Whole Genome Sequencing in Diagnostic and Public Health Microbiology. PLoS Pathog. 2012 Aug 2;8(8):e1002824. doi:10.1371/journal.ppat.1002824
28. Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, et al. Whole-genome sequencing to delineate Mycobacterium tuberculosis outbreaks: a retrospective observational study. Lancet Infect Dis. 2013 Feb;13(2):137–46. doi:10.1016/S1473-3099(12)70277-3

29. Goldberg B, Sichtig H, Geyer C, Ledeboer N, Weinstock GM. Making the Leap from Research Laboratory to Clinic: Challenges and Opportunities for Next-Generation Sequencing in Infectious Disease Diagnostics. mBio. 2015 Dec 31;6(6). doi:10.1128/mBio.01888-15
30. Wilson MR, Sample HA, Zorn KC, Arevalo S, Yu G, Neuhaus J, et al. Clinical Metagenomic Sequencing for Diagnosis of Meningitis and Encephalitis. New England Journal of Medicine. 2019 Jun 13;380(24):2327–40. doi:10.1056/NEJMoa1803396
31. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 2001 Feb 15;409(6822):860–921. doi:10.1038/35057062
32. Reyes GR, Kim JP. Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations. Mol Cell Probes. 1991 Dec;5(6):473–81. doi:10.1016/S0890-8508(05)80020-9
33. Jain K, Tagliafierro T, Marques A, Sanchez-Vicente S, Gokden A, Fallon B, et al. Development of a capture sequencing assay for enhanced detection and genotyping of tick-borne pathogens. Sci Rep. 2021 Jun 11;11(1):12384. doi:10.1038/s41598-021-91956-z
34. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. J Clin Microbiol. 2007 Sep;45(9):2761–4. doi:10.1128/JCM.01228-07
35. Batool M, Galloway-Peña J. Clinical metagenomics—challenges and future prospects. Front Microbiol. 2023 Jun 28;14. doi:10.3389/fmicb.2023.1186424
36. Hempel CA, Wright N, Harvie J, Hleap JS, Adamowicz SJ, Steinke D. Metagenomics versus total RNA sequencing: most accurate data-processing tools, microbial identification accuracy and perspectives for ecological assessments. Nucleic Acids Res. 2022 Sep 9;50(16):9279–93. doi:10.1093/nar/gkac689
37. Charalampous T, Richardson H, Kay G, Baldan R, Jeanes C, Turner D, et al. Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections using nanopore

sequencing. In: Respiratory infections. European Respiratory Society; 2018. p. PA5308. doi:10.1183/13993003.congress-2018.PA5308

38. Miller S, Naccache SN, Samayoa E, Messacar K, Arevalo S, Federman S, et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic sequencing assay for pathogen detection in cerebrospinal fluid. Genome Res. 2019 May;29(5):831–42. doi:10.1101/gr.238170.118

39. Blauwkamp TA, Thair S, Rosen MJ, Blair L, Lindner MS, Vilfan ID, et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease. Nat Microbiol. 2019 Feb 11;4(4):663–74. doi:10.1038/s41564-018-0349-6

40. Forbes JD, Knox NC, Ronholm J, Pagotto F, Reimer A. Metagenomics: The Next Culture-Independent Game Changer. Front Microbiol. 2017 Jul 4;8. doi:10.3389/fmicb.2017.01069

41. Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. BMC Biol. 2014 Dec 12;12(1):87. doi:10.1186/s12915-014-0087-z

42. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev. 2004 Oct;17(4):840–62. doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004

43. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012 Apr 17;109(16):6241–6. doi:10.1073/pnas.1117018109

44. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 2003 Feb 7;270(1512):313–21. doi:10.1098/rspb.2002.2218

45. Chan AHE, Chaisiri K, Saralamba S, Morand S, Thaenkham U. Assessing the suitability of mitochondrial and nuclear DNA genetic markers for

molecular systematics and species identification of helminths. Parasit Vectors. 2021 May 1;14(1):233. doi:10.1186/s13071-021-04737-y

46. Gasc C, Peyretaillade E, Peyret P. Sequence capture by hybridization to explore modern and ancient genomic diversity in model and nonmodel organisms. Nucleic Acids Res. 2016 Jun 2;44(10):4504–18. doi:10.1093/nar/gkw309
47. Wang X, Brown JJ, Lilly M V., Plimpton L, Murrell CM, Llanos-Soto SG, et al. TICKHUNTER: A Targeted Hybridization-Capture Sequencing Approach for the Detection and Characterization of Tick-borne Pathogens and Blood Meals. 2025. doi:10.1101/2025.06.06.658355
48. Gaudin M, Desnues C. Hybrid Capture-Based Next Generation Sequencing and Its Application to Human Infectious Diseases. Front Microbiol. 2018 Nov 27;9. doi:10.3389/fmicb.2018.02924
49. Bisso YI, Duron O, Plantard O, Prevost G, Jaulhac B, Boyer P. High throughput sequencing in the diagnosis and surveillance of tick-borne diseases: A narrative review. One Health. 2026 Jun;22:101312. doi:10.1016/j.onehlt.2025.101312
50. Zhang J, Tang F, Ni B, Zhang Q, Gong X, Mao F, et al. PGIP: a web server for the rapid taxonomic identification of parasite genomes. Parasit Vectors. 2025 Aug 28;18(1):365. doi:10.1186/s13071-025-07007-3
51. Benoit P, Brazer N, de Lorenzi-Tognon M, Kelly E, Servellita V, Oseguera M, et al. Seven-year performance of a clinical metagenomic next-generation sequencing test for diagnosis of central nervous system infections. Nat Med. 2024 Dec 12;30(12):3522–33. doi:10.1038/s41591-024-03275-1
52. Han D, Li Z, Li R, Tan P, Zhang R, Li J. mNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity. Crit Rev Microbiol. 2019 Nov 2;45(5–6):668–85. doi:10.1080/1040841X.2019.1681933
53. Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, Biagtan M, Bashir H, Yu G, et al. Actionable Diagnosis of Neuroleptospirosis by Next-Generation Sequencing. New England Journal of Medicine. 2014 Jun 19;370(25):2408–17. doi:10.1056/NEJMoa1401268

54. Ramchandar N, Coufal NG, Warden AS, Briggs B, Schwarz T, Stinnett R, et al. Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection and Transcriptomic Analysis in Pediatric Central Nervous System Infections. Open Forum Infect Dis. 2021 Jun 1;8(6). doi:10.1093/ofid/ofab104
55. Liu J, Dong Y, Huang Y, Xie M, Wang H, Wang Q, et al. Clinical metagenomic next-generation sequencing test for diagnosis of central nervous system infections in ICU: a multicenter retrospective study. International Journal of Infectious Diseases. 2025 Dec;161:108094. doi:10.1016/j.ijid.2025.108094
56. Sener RN. Acute necrotizing encephalopathy. Eur Radiol. 2005 Feb 21;15(2):395–6. doi:10.1007/s00330-004-2395-0
57. Mizuguchi M, Abe J, Mikkaichi K, Noma S, Yoshida K, Yamanaka T, et al. Acute necrotising encephalopathy of childhood: a new syndrome presenting with multifocal, symmetric brain lesions. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1995 May 1;58(5):555–61. doi:10.1136/jnnp.58.5.555
58. Shashi V, Schoch K, Ganetzky R, Kranz PG, Sondheimer N, Markert ML, et al. Biallelic variants in ribonuclease inhibitor (RNH1), an inflammasome modulator, are associated with a distinctive subtype of acute, necrotizing encephalopathy. Genetics in Medicine. 2023 Sep;25(9):100897. doi:10.1016/j.gim.2023.100897
59. Hoshino A, Saitoh M, Miyagawa T, Kubota M, Takanashi J i, Miyamoto A, et al. Specific HLA genotypes confer susceptibility to acute necrotizing encephalopathy. Genes Immun. 2016 Sep 28;17(6):367–9. doi:10.1038/gene.2016.32
60. Fasano A, Natoli GF, Cianfoni A, Ferraro D, Loria G, Bentivoglio AR, et al. Acute necrotizing encephalopathy: a relapsing case in a European adult. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2008 Feb 1;79(2):227–8. doi:10.1136/jnnp.2007.127670
61. Jiang J, Wang YE, Palazzo AF, Shen Q. Roles of Nucleoporin RanBP2/Nup358 in Acute Necrotizing Encephalopathy Type 1 (ANE1)

and Viral Infection. Int J Mol Sci. 2022 Mar 24;23(7):3548. doi:10.3390/ijms23073548

62. Mizuguchi M, Tomonaga M, Fukusato T, Asano M. Acute necrotizing encephalopathy with widespread edematous lesions of symmetrical distribution. Acta Neuropathol. 1989;78(1):108–11. doi:10.1007/BF00687411

63. Zhang Y, Cui P, Zhang HC, Wu HL, Ye MZ, Zhu YM, et al. Clinical application and evaluation of metagenomic next-generation sequencing in suspected adult central nervous system infection. J Transl Med. 2020 Dec 13;18(1):199. doi:10.1186/s12967-020-02360-6

64. Oordt-Speets AM, Bolijn R, van Hoorn RC, Bhavsar A, Kyaw MH. Global etiology of bacterial meningitis: A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2018 Jun 11;13(6):e0198772. doi:10.1371/journal.pone.0198772

65. Liu Y, Ma Y. Clinical applications of metagenomics next-generation sequencing in infectious diseases. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B. 2024 Jun 17;25(6):471–84. doi:10.1631/jzus.B2300029

66. Susiyanti M, Febrina F, Putera I, Jelita A, Rokim FS, Edwar L, et al. METAGENOMIC SEQUENCING IN VARIOUS OCULAR INFECTIONS: A SYSTEMATIC REVIEW OF DIAGNOSTIC UTILITY. Surv Ophthalmol. 2026 Feb. doi:10.1016/j.survophthal.2026.01.006

67. Farnaes L, Wilke J, Ryan Loker K, Bradley JS, Cannavino CR, Hong DK, et al. Community-acquired pneumonia in children: cell-free plasma sequencing for diagnosis and management. Diagn Microbiol Infect Dis. 2019 Jun;94(2):188–91. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.12.016

68. Qin C, Zhang S, Zhao Y, Ding X, Yang F, Zhao Y. Diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in sepsis and bloodstream infection. Front Cell Infect Microbiol. 2023 Feb 10;13. doi:10.3389/fcimb.2023.1117987

69. Jing C, Chen H, Liang Y, Zhong Y, Wang Q, Li L, et al. Clinical Evaluation of an Improved Metagenomic Next-Generation Sequencing

Test for the Diagnosis of Bloodstream Infections. Clin Chem. 2021 Aug 5;67(8):1133–43. doi:10.1093/clinchem/hvab061

70. Geng S, Mei Q, Zhu C, Fang X, Yang T, Zhang L, et al. Metagenomic next-generation sequencing technology for detection of pathogens in blood of critically ill patients. International Journal of Infectious Diseases. 2021 Feb;103:81–7. doi:10.1016/j.ijid.2020.11.166
71. Kamau E, Yang S. Metagenomic Sequencing of Positive Blood Culture Fluid for Accurate Bacterial and Fungal Species Identification: A Pilot Study. Microorganisms. 2023 May 10;11(5):1259. doi:10.3390/microorganisms11051259
72. Li SL, Zhao X, Tao JZ, Yue ZZ, Zhao XY. Application of metagenomic next-generation sequencing in patients with infective endocarditis. Front Cell Infect Microbiol. 2023;Volume 13-2023. doi:10.3389/fcimb.2023.1107170
73. Anilet VK, Tammiraju I, Koduri M. Clinical Characteristics of a Zoonotic Occupational Disease— *Brucella endocarditis* with Review of Literature. Indian Journal of Cardiovascular Disease in Women. 2022 Jan 25;06:235. doi:10.1055/s-0041-1742213
74. Wang Q, Miao Q, Pan J, Jin W, Ma Y, Zhang Y, et al. The clinical value of metagenomic next-generation sequencing in the microbiological diagnosis of skin and soft tissue infections. International Journal of Infectious Diseases. 2020 Nov;100:414–20. doi:10.1016/j.ijid.2020.09.007
75. Wang Q, Miao Q, Pan J, Jin W, Ma Y, Zhang Y, et al. The clinical value of metagenomic next-generation sequencing in the microbiological diagnosis of skin and soft tissue infections. International Journal of Infectious Diseases. 2020 Nov;100:414–20. doi:10.1016/j.ijid.2020.09.007
76. Peng JM, Du B, Qin HY, Wang Q, Shi Y. Metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of suspected pneumonia in immunocompromised patients. Journal of Infection. 2021 Apr;82(4):22–7. doi:10.1016/j.jinf.2021.01.029
77. Shi T, Lin Y, Zheng X, Ruan H, Zhang R, Liu Y, et al. Metagenomic next-generation sequencing for the clinical identification of spinal infection-

associated pathogens. Front Cell Infect Microbiol. 2025 Jan 7;14. doi:10.3389/fcimb.2024.1437665

78. Shi H, Li H, Zheng L, Qian W, Wang Z, Xie L, et al. Metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of oral and maxillofacial space infections. J Dent Sci. 2023 Jul;18(3):1199–205. doi:10.1016/j.jds.2022.09.002

79. Jia K, Huang S, Shen C, Li H, Zhang Z, Wang L, et al. Enhancing urinary tract infection diagnosis for negative culture patients with metagenomic next-generation sequencing (mNGS). Front Cell Infect Microbiol. 2023 Mar 3;13. doi:10.3389/fcimb.2023.1119020

80. Qian YY, Wang HY, Zhou Y, Zhang HC, Zhu YM, Zhou X, et al. Improving Pulmonary Infection Diagnosis with Metagenomic Next Generation Sequencing. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Jan 26;10. doi:10.3389/fcimb.2020.567615

81. Jain S, Self WH, Wunderink RG, Fakhran S, Balk R, Bramley AM, et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. New England Journal of Medicine. 2015 Jul 30;373(5):415–27. doi:10.1056/NEJMoa1500245

82. Lewandowski K, Xu Y, Pullan ST, Lumley SF, Foster D, Sanderson N, et al. Metagenomic Nanopore Sequencing of Influenza Virus Direct from Clinical Respiratory Samples. J Clin Microbiol. 2019 Dec 23;58(1). doi:10.1128/JCM.00963-19

83. Lewandowski K, Xu Y, Pullan ST, Lumley SF, Foster D, Sanderson N, et al. Metagenomic Nanopore Sequencing of Influenza Virus Direct from Clinical Respiratory Samples. J Clin Microbiol. 2019 Dec 23;58(1). doi:10.1128/JCM.00963-19

84. Zheng Y, Qiu X, Wang T, Zhang J. The Diagnostic Value of Metagenomic Next–Generation Sequencing in Lower Respiratory Tract Infection. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Sep 9;11. doi:10.3389/fcimb.2021.694756

85. Liu N, Kan J, Cao W, Cao J, Jiang E, Zhou Y, et al. Metagenomic next-generation sequencing diagnosis of peripheral pulmonary infectious lesions through virtual navigation, radial EBUS, ultrathin bronchoscopy,

and ROSE. Journal of International Medical Research. 2019 Oct 22;47(10):4878–85. doi:10.1177/0300060519866953

86. Langelier C, Zinter MS, Kalantar K, Yanik GA, Christenson S, O'Donovan B, et al. Metagenomic Sequencing Detects Respiratory Pathogens in Hematopoietic Cellular Transplant Patients. Am J Respir Crit Care Med. 2018 Feb 15;197(4):524–8. doi:10.1164/rccm.201706-1097LE
87. Forbes JD, Knox NC, Ronholm J, Pagotto F, Reimer A. Metagenomics: The Next Culture-Independent Game Changer. Front Microbiol. 2017 Jul 4;8. doi:10.3389/fmicb.2017.01069
88. Centurioni DA, Diaz AJ, Perry MJ, Egan CT. The use of metagenomics for biothreat and emerging threat applications. In: Metagenomics for Microbiology. Elsevier; 2025. p. 47–65. doi:10.1016/B978-0-443-22376-1.00001-5
89. Tan JK, Servellita V, Stryke D, Kelly E, Streithorst J, Sumimoto N, et al. Laboratory validation of a clinical metagenomic next-generation sequencing assay for respiratory virus detection and discovery. Nat Commun. 2024 Nov 12;15(1):9016. doi:10.1038/s41467-024-51470-y
90. Honda H, Warren DK. Central Nervous System Infections: Meningitis and Brain Abscess. Infect Dis Clin North Am. 2009 Sep;23(3):609–23. doi:10.1016/j.idc.2009.04.009
91. Guo Y, Li H, Chen H, Li Z, Ding W, Wang J, et al. Metagenomic next-generation sequencing to identify pathogens and cancer in lung biopsy tissue. EBioMedicine. 2021 Nov 1;73. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103639
92. Prachayangprecha S, Schapendonk CME, Koopmans MP, Osterhaus ADME, Schürch AC, Pas SD, et al. Exploring the Potential of Next-Generation Sequencing in Detection of Respiratory Viruses. J Clin Microbiol. 2014 Oct;52(10):3722–30. doi:10.1128/JCM.01641-14
93. Mahfouz ME, Grayson TH, Dance DA, Gilpin ML. Characterization of the mrgRS locus of the opportunistic pathogen Burkholderia pseudomallei: temperature regulates the expression of a two-component signal transduction system. BMC Microbiol. 2006 Dec 7;6(1):70. doi:10.1186/1471-2180-6-70

94. Heacock-Kang Y, McMillan IA, Norris MH, Sun Z, Zarzycki-Siek J, Bluhm AP, et al. The Burkholderia pseudomallei intracellular 'TRANSITome.' Nat Commun. 2021 Mar 26;12(1):1907. doi:10.1038/s41467-021-22169-1
95. Kim JI, Maguire F, Tsang KK, Gouliouris T, Peacock SJ, McAllister TA, et al. Machine Learning for Antimicrobial Resistance Prediction: Current Practice, Limitations, and Clinical Perspective. Clin Microbiol Rev. 2022 Sep 21;35(3). doi:10.1128/cmr.00179-21
96. Hendriksen RS, Munk P, Njage P, van Bunnik B, McNally L, Lukjancenko O, et al. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. Nat Commun. 2019 Mar 8;10(1):1124. doi:10.1038/s41467-019-08853-3
97. Wang S, Li W, Wang Z, Yang W, Li E, Xia X, et al. Emerging and reemerging infectious diseases: global trends and new strategies for their prevention and control. Signal Transduct Target Ther. 2024 Sep 11;9(1):223. doi:10.1038/s41392-024-01917-x
98. Possas C, Marques ETA, Kuchipudi S V., Kumar P, Kim JH, Homma A. Disease X in the Tropics, preventing the next pandemic: how to accelerate spillover prevention and vaccine preparedness? Frontiers in Tropical Diseases. 2024 Jul 4;5. doi:10.3389/fitd.2024.1417065
99. Mehand MS, Al-Shorbaji F, Millett P, Murgue B. The WHO R&D Blueprint: 2018 review of emerging infectious diseases requiring urgent research and development efforts. Antiviral Res. 2018 Nov;159:63–7. doi:10.1016/j.antiviral.2018.09.009
100. Armstrong GL, MacCannell DR, Taylor J, Carleton HA, Neuhaus EB, Bradbury RS, et al. Pathogen Genomics in Public Health. New England Journal of Medicine. 2019 Dec 26;381(26):2569–80. doi:10.1056/NEJMsr1813907
101. Sawyer A, Free T, Martin J. Metagenomics: Preventing Future Pandemics. Biotechniques. 2021 Jan 15;70(1):1–4. doi:10.2144/btn-2020-0166
102. Henczkó J, Kienle Z, Kádár J, Kádár-Hürkecz E, Tárnoki-Boross K, Sütő P, et al. Laboratory-Acquired Brucella abortus Infection Mimicking

Autoimmune Disease: A Case Report with Genomic Confirmation. Pathogens. 2026 Apr 23;15(5):460. doi:10.3390/pathogens15050460

103. Henczkó J, Ungvári E, Novák B, Pályi B, Kis Z. Rapid sequencing methods for identification of high-consequence bacterial pathogens [Internet]. 2023. Available from: https://doi.org/10.13140/RG.2.2.24039.71848 doi:10.13140/RG.2.2.24039.71848

104. Henczkó J, Tóth Á, Knausz M, Gartner B, Reményi Á, Bíró E, et al. Whole Genome Sequencing and Comparative Genomics of the Emerging Pathogen Burkholderia pseudomallei Isolated from Two Travel-Related Infections in Hungary. Pathogens. 2025 Oct 31;14(11):1108. doi:10.3390/pathogens14111108

105. Isidro J, Escudero R, Luque-Larena JJ, Pinto M, Borges V, González-Martín-Niño R, et al. Strengthening the genomic surveillance of Francisella tularensis by using culture-free whole-genome sequencing from biological samples. Front Microbiol. 2024 Jan 5;14. doi:10.3389/fmicb.2023.1277468

106. Abdad MY, Abou Abdallah R, Fournier PE, Stenos J, Vasoo S. A Concise Review of the Epidemiology and Diagnostics of Rickettsioses: Rickettsia and Orientia spp. J Clin Microbiol. 2018 Aug;56(8). doi:10.1128/JCM.01728-17

107. Brett PJ, Deshazer D, Woods DE. Characterization of Burkholderia pseudomallei and Burkholderia pseudomallei-like strains. Epidemiol Infect. 1997 Apr 1;118(2):137–48. doi:10.1017/S095026889600739X

108. Hall CM, Baker AL, Sahl JW, Mayo M, Scholz HC, Kaestli M, et al. Expanding the Burkholderia pseudomallei Complex with the Addition of Two Novel Species: Burkholderia mayonis sp. nov. and Burkholderia savannae sp. nov. Appl Environ Microbiol. 2022 Jan 11;88(1). doi:10.1128/AEM.01583-21

109. Sahl JW, Vazquez AJ, Hall CM, Busch JD, Tuanyok A, Mayo M, et al. The Effects of Signal Erosion and Core Genome Reduction on the

Identification of Diagnostic Markers. mBio. 2016 Nov 2;7(5). doi:10.1128/mBio.00846-16

110. Segonds C, Clavel-Batut P, Thouverez M, Grenet D, Le Coustumier A, Plésiat P, et al. Microbiological and Epidemiological Features of Clinical Respiratory Isolates of Burkholderia gladioli. J Clin Microbiol. 2009 May;47(5):1510–6. doi:10.1128/JCM.02489-08
111. Centers for Disease Control, Prevention, Animal, Service PHI. Select Agents and Toxins List [Internet]. 2024. Available from: https://www.selectagents.gov/sat/list.htm
112. Shams AM, Rose LJ, Hodges L, Arduino MJ. Survival of Burkholderia pseudomallei on Environmental Surfaces. Appl Environ Microbiol. 2007 Dec 15;73(24):8001–4. doi:10.1128/AEM.00936-07
113. Pumpuang A, Chantratita N, Wikraiphat C, Saiprom N, Day NPJ, Peacock SJ, et al. Survival of Burkholderia pseudomallei in distilled water for 16 years. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2011 Oct;105(10):598–600. doi:10.1016/j.trstmh.2011.06.004
114. Wuthiekanun V, Amornchai P, Langla S, White NJ, Day NPJ, Limmathurotsakul D. Survival of Burkholderia pseudomallei and Pathogenic Leptospira in Cola, Beer, Energy Drinks, and Sports Drinks. Am J Trop Med Hyg. 2020 Jul 8;103(1):249–52. doi:10.4269/ajtmh.19-0948
115. O'Rourke A, Lee MD, Nierman WC, Everroad RC, Dupont CL. Genomic and phenotypic characterization of Burkholderia isolates from the potable water system of the International Space Station. PLoS One. 2020 Feb 19;15(2):e0227152. doi:10.1371/journal.pone.0227152
116. Savelkoel J, Dance DAB. Alfred Whitmore and the Discovery of Melioidosis. Emerg Infect Dis. 2024 Apr;30(4). doi:10.3201/eid3004.230693
117. Mohapatra PR. History of Melioidosis. In: Clinical Melioidosis. CRC Press. 2023. 19–26 p.
118. Dance DA. Melioidosis: the tip of the iceberg? Clin Microbiol Rev. 1991 Jan;4(1):52–60. doi:10.1128/CMR.4.1.52

119. Cheng AC, Currie BJ. Melioidosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Management. Clin Microbiol Rev. 2005 Apr;18(2):383–416. doi:10.1128/CMR.18.2.383-416.2005
120. Karunanayake P. Melioidosis: clinical aspects. Clinical Medicine. 2022 Jan;22(1):6–8. doi:10.7861/clinmed.2022-0014
121. Limmathurotsakul D, Peacock SJ. Melioidosis: a clinical overview. Br Med Bull. 2011 Sep 1;99(1):125–39. doi:10.1093/bmb/ldr007
122. Chewapreecha C, Holden MTG, Vehkala M, Välimäki N, Yang Z, Harris SR, et al. Global and regional dissemination and evolution of Burkholderia pseudomallei. Nat Microbiol. 2017 Jan 23;2(4):16263. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.263
123. Sarovich DS, Garin B, De Smet B, Kaestli M, Mayo M, Vandamme P, et al. Phylogenomic Analysis Reveals an Asian Origin for African Burkholderia pseudomallei and Further Supports Melioidosis Endemicity in Africa. mSphere. 2016 Apr 27;1(2). doi:10.1128/mSphere.00089-15
124. Hall CM, Jaramillo S, Jimenez R, Stone NE, Centner H, Busch JD, et al. Burkholderia pseudomallei, the causative agent of melioidosis, is rare but ecologically established and widely dispersed in the environment in Puerto Rico. PLoS Negl Trop Dis. 2019 Sep 5;13(9):e0007727. doi:10.1371/journal.pntd.0007727
125. Limmathurotsakul D, Wongratanacheewin S, Teerawattanasook N, Wongsuvan G, Chaisuksant S, Chetchotisakd P, et al. Increasing Incidence of Human Melioidosis in Northeast Thailand. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2010 Jun;82(6):1113–7. doi:10.4269/ajtmh.2010.10-0038
126. Limmathurotsakul D, Thammasart S, Warrasuth N, Thapanagulsak P, Jatapai A, Pengreungrojanachai V, et al. Melioidosis in Animals, Thailand, 2006–2010. Emerg Infect Dis. 2012 Feb;18(2):325–7. doi:10.3201/eid1802.111347
127. Pal M, Tewari A, Gerbaba ND, Shuramo MY. Melioidosis: An emerging yet neglected bacterial zoonosis. Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access. 2022;10(2):32–7. doi:10.15406/jbmoa.2022.10.00323

128. Norman FF, Blair BM, Chamorro-Tojeiro S, González-Sanz M, Chen LH. The Evolving Global Epidemiology of Human Melioidosis: A Narrative Review. Pathogens. 2024 Oct 24;13(11):926. doi:10.3390/pathogens13110926
129. Virk HS, Mukhopadhyay C, Wiersinga WJ. Melioidosis: A Neglected Cause of Community-Acquired Pneumonia. Semin Respir Crit Care Med. 2020 Aug 6;41(04):496–508. doi:10.1055/s-0040-1710570
130. Pal M, Tewari A, Gerbaba ND, Shuramo MY. Melioidosis: An emerging yet neglected bacterial zoonosis. Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access. 2022;10(2):32–7. doi:10.15406/jbmoa.2022.10.00323
131. Le Tohic S, Montana M, Koch L, Curti C, Vanelle P. A review of melioidosis cases imported into Europe. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2019 Aug 4;38(8):1395–408. doi:10.1007/s10096-019-03548-5
132. Currie BJ, Ward L, Cheng AC. The Epidemiology and Clinical Spectrum of Melioidosis: 540 Cases from the 20 Year Darwin Prospective Study. PLoS Negl Trop Dis. 2010 Nov 30;4(11):e900. doi:10.1371/journal.pntd.0000900
133. Sprague LD, Neubauer H. Melioidosis in Animals: A Review on Epizootiology, Diagnosis and Clinical Presentation. Journal of Veterinary Medicine, Series B. 2004 Sep 2;51(7):305–20. doi:10.1111/j.1439-0450.2004.00797.x
134. Busch JD, Kaestli M, Mayo M, Roe CC, Vazquez AJ, Choy JL, et al. Melioidosis in goats at a single Australian farm was caused by multiple diverse lineages of Burkholderia pseudomallei present in soil. PLoS Negl Trop Dis. 2024 Dec 19;18(12):e0012683. doi:10.1371/journal.pntd.0012683
135. Rachlin A, Kleinecke M, Kaestli M, Mayo M, Webb JR, Rigas V, et al. A cluster of melioidosis infections in hatchling saltwater crocodiles (Crocodylus porosus) resolved using genome-wide comparison of a common north Australian strain of Burkholderia pseudomallei. Microb Genom. 2019 Aug 1;5(8). doi:10.1099/mgen.0.000288

136. Elschner MC, Hnizdo J, Stamm I, El-Adawy H, Mertens K, Melzer F. Isolation of the highly pathogenic and zoonotic agent Burkholderia pseudomalleifrom a pet green Iguana in Prague, Czech Republic. BMC Vet Res. 2014 Dec 28;10(1):283. doi:10.1186/s12917-014-0283-7
137. Sprague LD, Neubauer H. Melioidosis in Animals: A Review on Epizootiology, Diagnosis and Clinical Presentation. Journal of Veterinary Medicine, Series B. 2004 Sep 2;51(7):305–20. doi:10.1111/j.1439-0450.2004.00797.x
138. Hellebuyck T, Wattiau P, Boyen F, Moeremans I, Roosens NH, Vanneste K, et al. Isolation of Burkholderia pseudomallei from a Pet Green Iguana, Belgium. Emerg Infect Dis. 2018 Dec;24(12):2331–3. doi:10.3201/eid2412.171661
139. Holden MTG, Titball RW, Peacock SJ, Cerdeño-Tárraga AM, Atkins T, Crossman LC, et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, Burkholderia pseudomallei. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2004 Sep 28;101(39):14240–5. doi:10.1073/pnas.0403302101
140. Tuanyok A, Leadem BR, Auerbach RK, Beckstrom-Sternberg SM, Beckstrom-Sternberg JS, Mayo M, et al. Genomic islands from five strains of Burkholderia pseudomallei. BMC Genomics. 2008 Dec 27;9(1):566. doi:10.1186/1471-2164-9-566
141. Bzdyl NM, Moran CL, Bendo J, Sarkar-Tyson M. Pathogenicity and virulence of Burkholderia pseudomallei. Virulence. 2022;13(1). doi:10.1080/21505594.2022.2139063
142. Sarovich DS, Price EP, Webb JR, Ward LM, Voutsinos MY, Tuanyok A, et al. Variable virulence factors in Burkholderia pseudomallei (Melioidosis) associated with human disease. PLoS One. 2014;9((3):e91682). doi:10.1371/journal.pone.0091682
143. Larsen JC, Johnson NH. Pathogenesis of Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei. Mil Med. 2009 Jun;174(6):647–51. doi:10.7205/MILMED-D-03-0808

144. Sarkar-Tyson M, Thwaite JE, Harding S V., Smither SJ, Oyston PCF, Atkins TP, et al. Polysaccharides and virulence of Burkholderia pseudomallei. J Med Microbiol. 2007 Aug 1;56(8):1005–10. doi:10.1099/jmm.0.47043-0

145. Stevens MP, Stevens JM, Jeng RL, Taylor LA, Wood MW, Hawes P, et al. Identification of a bacterial factor required for actin-based motility of Burkholderia pseudomallei. Mol Microbiol. 2005 Apr 18;56(1):40–53. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04528.x

146. Sarovich DS, Ward L, Price EP, Mayo M, Pitman MC, Baird RW, et al. Recurrent Melioidosis in the Darwin Prospective Melioidosis Study: Improving Therapies Mean that Relapse Cases Are Now Rare. J Clin Microbiol. 2014 Feb;52(2):650–3. doi:10.1128/JCM.02239-13

147. Morris JL, Fane A, Sarovich DS, Price EP, Rush CM, Govan BL, et al. Increased Neurotropic Threat from *Burkholderia pseudomallei* Strains with a *B. mallei* –like Variation in the *bimA* Motility Gene, Australia. Emerg Infect Dis. 2017 May;23(5). doi:10.3201/eid2305.151417

148. Tuanyok A, Stone JK, Mayo M, Kaestli M, Gruendike J, Georgia S, et al. The Genetic and Molecular Basis of O-Antigenic Diversity in Burkholderia pseudomallei Lipopolysaccharide. PLoS Negl Trop Dis. 2012 Jan 3;6(1):e1453. doi:10.1371/journal.pntd.0001453

149. Lipsitz R, Garges S, Aurigemma R, Baccam P, Blaney DD, Cheng AC, et al. Workshop on Treatment of and Postexposure Prophylaxis for Burkholderia pseudomallei and B. mallei Infection, 2010. Emerg Infect Dis. 2012 Dec;18(12):e2–e2. doi:10.3201/eid1812.120638

150. Ngauy V, Lemeshev Y, Sadkowski L, Crawford G. Cutaneous Melioidosis in a Man Who Was Taken as a Prisoner of War by the Japanese during World War II. J Clin Microbiol. 2005 Feb;43(2):970–2. doi:10.1128/JCM.43.2.970-972.2005

151. Nemhauser J, LaRocque R, Alvarado-Ramy F, Angelo K, Ericsson C, Gertz A, et al. Copyright Page. In: CDC Yellow Book 2024. Oxford University Press:New York,NY,USA; 2023. p. iv–vi. doi:10.1093/oso/9780197570944.002.0004

152. Aziz A, Currie BJ, Mayo M, Sarovich DS, Price EP. Comparative genomics confirms a rare melioidosis human-to-human transmission event and reveals incorrect phylogenomic reconstruction due to polyclonality. Microb Genom. 2020 Feb 1;6(2). doi:10.1099/mgen.0.000326
153. Chang CY, Lau NLJ, Currie BJ, Podin Y. Disseminated melioidosis in early pregnancy - an unproven cause of foetal loss. BMC Infect Dis. 2020 Dec 6;20(1):201. doi:10.1186/s12879-020-4937-8
154. McCORMICK JB, SEXTON DJ, McMURRAY JG, CAREY E, HAYES P, FELDMAN RA. Human-to-Human Transmission of Pseudomonas pseudomallei. Ann Intern Med. 1975 Oct 1;83(4):512–3. doi:10.7326/0003-4819-83-4-512
155. 51. Siddique MH; SMA; MA; NSZH; RFU; KF; AA; QMA; KW. Burkholderia (Mallei and Pseudomallei) Related Zoonosis Drastic Zoonotic and Biological Warfare Potential. International Journal of Agriculture and Biosciences. 2023;(Zoonosis Volume 4):82–99. doi:10.47278/book.zoon/2023.140
156. Jarrett O, Seng S, Fitzgerald DA. Paediatric melioidosis. Paediatr Respir Rev. 2024 Jun;50:31–7. doi:10.1016/j.prrv.2023.11.002
157. W Chaowagul 1 YSDADARJP arechachai, NJW. Relapse in melioidosis: incidence and risk factors . J Infect Dis 1993 Nov;168(5):1181-5 . 1993 Nov;168(5):1181–5.
158. Frangoulidis D, Schwab D, Scholz H, Tomaso H, Hogardt M, Meyer H, et al. 'Imported' melioidosis in Germany: relapse after 10 years. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008 Dec;102:S40–1. doi:10.1016/S0035-9203(08)70011-7
159. Cheng AC, Currie BJ, Dance DAB, Funnell SGP, Limmathurotsakul D, Simpson AJH, et al. Clinical Definitions of Melioidosis. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2013 Mar 6;88(3):411–3. doi:10.4269/ajtmh.12-0555
160. Phongphithakchai A, Chatatikun M, Tangpong J, Laklaeng S ngob, Huang JC, Wongyikul P, et al. C-Reactive Protein for Early Diagnosis and

Severity Monitoring in Melioidosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. 2025 Aug 27;15(9):1360. doi:10.3390/life15091360

161. Meumann EM, Limmathurotsakul D, Dunachie SJ, Wiersinga WJ, Currie BJ. Burkholderia pseudomallei and melioidosis. Nat Rev Microbiol. 2024 Mar 4;22(3):155–69. doi:10.1038/s41579-023-00972-5
162. Gupta N, Singh S, Kumar TP, Malla S, Sethi A, Boodman C, et al. Tunnel sign on magnetic resonance imaging in neuromelioidosis: A systematic literature review. New Microbes New Infect. 2025 Dec;68:101639. doi:10.1016/j.nmni.2025.101639
163. Schweizer HP. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Burkholderia Pseudomallei: Implications for Treatment of Melioidosis. Future Microbiol. 2012 Dec 12;7(12):1389–99. doi:10.2217/fmb.12.116
164. Phillips ED, Garcia EC. Burkholderia pseudomallei. Trends Microbiol. 2024 Jan;32(1):105–6. doi:10.1016/j.tim.2023.07.008
165. Gassiep I, Armstrong M, Norton R. Human Melioidosis. Clin Microbiol Rev. 2020 Mar 18;33(2). doi:10-1128/CMR.00006-19
166. Gassiep I, Chewapreecha C, Chantratita N, Oakley T, Mukhopadhyay C, Lal PB, et al. Laboratory diagnosis of melioidosis. PLoS Negl Trop Dis. 2025 Dec 4;19(12):e0013761. doi:10.1371/journal.pntd.0013761
167. Ashdown LR. An improved screening technique for isolation of pseudomonas pseudomallei from clinical specimens. Pathology. 1979;11(2):293–7. doi:10.3109/00313027909061954
168. Gassiep I, Chewapreecha C, Chantratita N, Oakley T, Mukhopadhyay C, Lal PB, et al. Laboratory diagnosis of melioidosis. PLoS Negl Trop Dis. 2025 Dec 4;19(12):e0013761. doi:10.1371/journal.pntd.0013761
169. Novak RT, Glass MB, Gee JE, Gal D, Mayo MJ, Currie BJ, et al. Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay Targeting the Type III Secretion System of Burkholderia pseudomallei. J Clin Microbiol. 2006 Jan;44(1):85–90. doi:10.1128/JCM.44.1.85-90.2006
170. Pakdeerat S, Boonklang P, Angchagun K, Chomkatekaew C, Apichaidejudom N, Dokket Y, et al. Benchmarking CRISPR-BP34 for point-of-care melioidosis detection in low-income and middle-income

countries: a molecular diagnostics study. Lancet Microbe. 2024 Apr 1;5(4):e379–89. doi:10.1016/S2666-5247(23)00378-6

171. Lichtenegger S, Trinh TT, Assig K, Prior K, Harmsen D, Pesl J, et al. Development and Validation of a Burkholderia pseudomallei Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme To Facilitate Molecular Surveillance. J Clin Microbiol. 2021 Jul 19;59(8). doi:10.1128/JCM.00093-21
172. Tognotti E. The dawn of medical microbiology: germ hunters and the discovery of the cause of cholera. J Med Microbiol. 2011 Apr 1;60(4):555–8. doi:10.1099/jmm.0.025700-0
173. Snow J. On the Mode of Communication of Cholera. London: John Churchill; 1855.
174. Vezzulli L, Baker-Austin C, Kirschner A, Pruzzo C, Martinez-Urtaza J. Global emergence of environmental non-O1,O139 Vibrio cholerae infections linked with climate change: a neglected research field? Environ Microbiol. 2020 Oct 15;22(10):4342–55. doi:10.1111/1462-2920.15040
175. Baker-Austin C, Trinanes J, Gonzalez-Escalona N, Martinez-Urtaza J. Non-Cholera Vibrios: The Microbial Barometer of Climate Change. Trends Microbiol. 2017 Jan 1;25(1):76–84. doi:10.1016/j.tim.2016.09.008
176. Faruque SM, Sack DA, Sack RB, Colwell RR, Takeda Y, Nair GB. Emergence and evolution of Vibrio cholerae O139. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003 Feb 4;100(3):1304–9. doi:10.1073/pnas.0337468100
177. Islam MS, Zaman MH, Islam MS, Ahmed N, Clemens JD. Environmental reservoirs of Vibrio cholerae. Vaccine. 2020 Feb;38:A52–62. doi:10.1016/j.vaccine.2019.06.033
178. Crowe SJ, Newton AE, Gould LH, Parsons MB, Stroika S, Bopp CA, et al. Vibriosis, not cholera: toxigenic Vibrio cholerae non-O1, non-O139 infections in the United States, 1984-2014 [Internet]. 2016. doi:10.1017/S0950268816001783
179. Sack DA, Sack RB, Nair GB, Siddique A. Cholera. The Lancet. 2004 Jan;363(9404):223–33. doi:10.1016/S0140-6736(03)15328-7

180. Newton A, Kendall M, Vugia DJ, Henao OL, Mahon BE. Increasing Rates of Vibriosis in the United States, 1996–2010: Review of Surveillance Data From 2 Systems. Clinical Infectious Diseases. 2012 Jun 1;54(suppl_5):S391–5. doi:10.1093/cid/cis243
181. Huhulescu S, Indra A, Feierl G, Stoeger A, Ruppitsch W, Sarkar B, et al. Occurrence of Vibrio cholerae serogroups other than O1 and O139 in Austria. Wien Klin Wochenschr. 2007;119(7–8). doi:10.1007/s00508-006-0747-2
182. Hirk S, Huhulescu S, Allerberger F, Lepuschitz S, Rehak S, Weil S, et al. Necrotizing fasciitis due to Vibrio cholerae non-O1/non-O139 after exposure to Austrian bathing sites. Wien Klin Wochenschr. 2016;128(3–4). doi:10.1007/s00508-015-0944-y
183. Schmidt K, Scholz HC, Appelt S, Michel J, Jacob D, Dupke S. Virulence and resistance patterns of Vibrio cholerae non-O1/non-O139 acquired in Germany and other European countries. Front Microbiol. 2023 Nov 22;14. doi:10.3389/fmicb.2023.1282135
184. Rehm C, Lippert K, Indra A, Kolarević S, Kračun-Kolarević M, Leopold M, et al. First report on the occurrence of <scp> *Vibrio cholerae* nonO1 </scp> / <scp>nonO139</scp> in natural and artificial lakes and ponds in Serbia: Evidence for a long-distance transfer of strains and the presence of <scp> *Vibrio paracholerae* </scp>. Environ Microbiol Rep. 2023 Apr 13;15(2):142–52. doi:10.1111/1758-2229.13136
185. Henczkó J, Vargha M, Kállai A, Kristóf K, Tóth Á, Tóth S, et al. Genomic characterization of non-O1, non-O139 Vibrio cholerae causing rare clinical manifestation. BMC Infect Dis. 2025 Dec 9;26(1):58. doi:10.1186/s12879-025-12191-9
186. Henczkó J, Tóth Á, Magyar N, Balázs A, Tóth S, Pályi B, et al. Magyarországon előforduló, klinikai mintákból származó nem- O1/O139 Vibrio cholerae izolátumok teljes genom szekvenálásának eredményei . Microbiological Circular. Budapest; 2019. Report XIX. évfolyam 1. szám.
187. Kirschner AKT, Schauer S, Steinberger B, Wilhartitz I, Grim CJ, Huq A, et al. Interaction of Vibrio cholerae non-O1/non-O139 with Copepods,

Cladocerans and Competing Bacteria in the Large Alkaline Lake Neusiedler See, Austria. Microb Ecol. 2011;61(3). doi:10.1007/s00248-010-9764-9

188. Kirschner AKT, Schlesinger J, Farnleitner AH, Hornek R, Süß B, Golda B, et al. Rapid growth of planktonic Vibrio cholerae non-O1/non-O139 strains in a large alkaline lake in Austria: Dependence on temperature and dissolved organic carbon quality. Appl Environ Microbiol. 2008;74(7). doi:10.1128/AEM.01739-07
189. Ceccarelli D, Garriss G, Choi SY, Hasan NA, Stepanauskas R, Pop M, et al. Characterization of Two Cryptic Plasmids Isolated in Haiti from Clinical Vibrio cholerae Non-O1/Non-O139. Front Microbiol. 2017 Nov 23;8. doi:10.3389/fmicb.2017.02283
190. Dutta D, Chowdhury G, Pazhani GP, Guin S, Dutta S, Ghosh S, et al. Vibrio cholerae Non-O1, Non-O139 Serogroups and Cholera-like Diarrhea, Kolkata, India [Internet]. Vol. 19. 2013;19(3). doi:10.3201/eid1903.121156
191. Ramamurthy T, Pragasam AK, Taylor-Brown A, Will RC, Vasudevan K, Das B, et al. Vibrio cholerae O139 genomes provide a clue to why it may have failed to usher in the eighth cholera pandemic. Nat Commun. 2022 Jul 5;13(1):3864. doi:10.1038/s41467-022-31391-4
192. Roux F Le, Wegner KM, Baker-Austin C, Vezzulli L, Osorio CR, Amaro C, et al. The emergence of Vibrio pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). Front Microbiol. 2015 Aug 13;6. doi:10.3389/fmicb.2015.00830
193. Octavia S, Salim A, Kurniawan J, Lam C, Leung Q, Ahsan S, et al. Population Structure and Evolution of Non-O1/Non-O139 Vibrio cholerae by Multilocus Sequence Typing. PLoS One. 2013 Jun 11;8(6):e65342. doi:10.1371/journal.pone.0065342
194. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. Front Microbiol. 2014 Jun 2;5. doi:10.3389/fmicb.2014.00258

195. Balagurusamy R, Gopi L, Kumar DSS, Viswanathan K, Meganathan V, Sathiyamurthy K, et al. Significance of Viable But Non-culturable (VBNC) State in Vibrios and Other Pathogenic Bacteria: Induction, Detection and the Role of Resuscitation Promoting Factors (Rpf). Curr Microbiol. 2024 Dec 21;81(12):417. doi:10.1007/s00284-024-03947-8
196. Xie H, Wu Y, Liu C, Guo J, Ma J, Li X, et al. Oral infection caused by non-o1/non-o139 vibrio cholerae in a patient with esophageal cancer undergoing esophagectomy and chemoradiotherapy: A case report. Infect Drug Resist. 2020;13. doi:10.2147/IDR.S274077
197. Agyei FK, Scharf B, Duodu S. Vibrio cholerae Bacteremia: An Enigma in Cholera-Endemic African Countries. Trop Med Infect Dis. 2024 May 2;9(5):103. doi:10.3390/tropicalmed9050103
198. Marinello S, Marini G, Parisi G, Gottardello L, Rossi L, Besutti V, et al. Vibrio cholerae non-O1, non-O139 bacteraemia associated with pneumonia, Italy 2016. Infection. 2017;45(2). doi:10.1007/s15010-016-0961-4
199. Hao Y, Wang Y, Bi Z, Sun B, Jin Y, Bai Y, et al. A case of non-O1/non-O139 Vibrio cholerae septicemia and meningitis in a neonate. International Journal of Infectious Diseases. 2015;35. doi:10.1016/j.ijid.2015.05.004
200. Chen WD, Lai LJ, Hsu WH, Huang TY. Vibrio cholerae non-O1 - The first reported case of keratitis in a healthy patient. BMC Infect Dis. 2019;19(1). doi:10.1186/s12879-019-4475-4
201. Halabi M, Haditsch M, Renner F, Brinninger G, Mittermayer H. Vibrio cholerae non-O1 septicaemia in a patient with liver cirrhosis and billroth-II-gastrectomy. Journal of Infection. 1997;34(1). doi:10.1016/S0163-4453(97)80016-3
202. Zhang X, Lu Y, Qian H, Liu G, Mei Y, Jin F, et al. Non-O1, Non-O139 Vibrio cholerae (NOVC) Bacteremia: Case report and literature review, 2015-2019. Infect Drug Resist. 2020;13. doi:10.2147/IDR.S245806

203. Niederman MS, Cilloniz C. Aspiration pneumonia. Revista Española de Quimioterapia. 2022 Apr 22;35(Suppl1):73–7. doi:10.37201/req/s01.17.2022
204. Cerland L, Mégarbane B, Kallel H, Brouste Y, Mehdaoui H, Resiere D. Incidence and Consequences of Near-Drowning–Related Pneumonia—A Descriptive Series from Martinique, French West Indies. Int J Environ Res Public Health. 2017 Nov 17;14(11):1402. doi:10.3390/ijerph14111402
205. Reizine F, Delbove A, Tattevin P, Santos A Dos, Bodenes L, Bouju P, et al. Clinical and microbiological features of drowning-associated pneumonia: a retrospective multicentre cohort study. Clinical Microbiology and Infection. 2023 Jan;29(1):108.e7-108.e13. doi:10.1016/j.cmi.2022.07.027
206. Montero DA, Vidal RM, Velasco J, George S, Lucero Y, Gómez LA, et al. Vibrio cholerae, classification, pathogenesis, immune response, and trends in vaccine development. Front Med (Lausanne). 2023 May 5;10. doi:10.3389/fmed.2023.1155751
207. Li X, Wu Y, Sun X, Ma J, Li X, Liu C, et al. Non-O1/non-O139 Vibrio cholerae bacteraemia in mainland China from 2005-2019: Clinical, epidemiological and genetic characteristics. Epidemiology and Infection. 2020. doi:10.1017/S0950268820001545
208. Lu B, Zhou H, Li D, Li F, Zhu F, Cui Y, et al. The first case of bacteraemia due to non-O1/non-O139 Vibrio cholerae in a type 2 diabetes mellitus patient in mainland China. International Journal of Infectious Diseases. 2014;25. doi:10.1016/j.ijid.2014.04.015
209. Marinello S, Marini G, Parisi G, Gottardello L, Rossi L, Besutti V, et al. Vibrio cholerae non-O1, non-O139 bacteraemia associated with pneumonia, Italy 2016. Infection. 2017 Apr 11;45(2):237–40. doi:10.1007/s15010-016-0961-4
210. Špačková M, Košťálová J, Fabiánová K. Non-O1/non-O139 vibrios – occurrence not only in Europe in recent years. Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie. 2021;70(2).

211. Jiang X, Hu M, wu huiyi, Huang T. Clinical–laboratory–therapeutic decision analysis of non-O1/O139 Vibrio cholerae bloodstream infection in high-risk patients: A case report and literature review. IDCases. 2026;43:e02533. doi:10.1016/j.idcr.2026.e02533
212. Zhang Q, Alter T, Fleischmann S. Non-O1/Non-O139 Vibrio cholerae—An Underestimated Foodborne Pathogen? An Overview of Its Virulence Genes and Regulatory Systems Involved in Pathogenesis. Microorganisms. 2024 Apr 18;12(4):818. doi:10.3390/microorganisms12040818
213. Zhou Y, Gu S, Li J, Ji P, Zhang Y, Wu C, et al. Complete Genome Analysis of Highly Pathogenic Non-O1/O139 Vibrio cholerae Isolated From Macrobrachium rosenbergii Reveals Pathogenicity and Antibiotic Resistance-Related Genes. Front Vet Sci. 2022;9. doi:10.3389/fvets.2022.882885
214. Verma J, Bag S, Saha B, Kumar P, Ghosh TS, Dayal M, et al. Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2019 Mar 26;116(13):6226–31. doi:10.1073/pnas.1900141116
215. Bier N, Schwartz K, Guerra B, Strauch E. Survey on antimicrobial resistance patterns in Vibrio vulnificus and Vibrio cholerae non-O1/non-O139 in Germany reveals carbapenemase-producing Vibrio cholerae in coastal waters. Front Microbiol. 2015 Oct 28;6. doi:10.3389/fmicb.2015.01179
216. Blackstone GM, Nordstrom JL, Bowen MD, Meyer RF, Imbro P, DePaola A. Use of a real time PCR assay for detection of the ctxA gene of Vibrio cholerae in an environmental survey of Mobile Bay. J Microbiol Methods. 2007;68(2). doi:10.1016/j.mimet.2006.08.006
217. Lang Z, Lin S, Li J, Xie Z, Cao H. A microfluidic based stem-loop probes mediated isothermal amplification for multiplex detection of Vibrio parahaemolyticus. Food Chem. 2025 Nov;492:145571. doi:10.1016/j.foodchem.2025.145571

218. Loo KY, Law JWF, Tan LTH, Pusparajah P, Letchumanan V, Lee LH. Diagnostic techniques for rapid detection of Vibrio species. Aquaculture. 2022 Dec;561:738628. doi:10.1016/j.aquaculture.2022.738628
219. Liang KYH, Orata FD, Islam MT, Nasreen T, Alam M, Tarr CL, et al. A Vibrio cholerae Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme To Facilitate the Epidemiological Study of Cholera. J Bacteriol. 2020 Nov 19;202(24). doi:10.1128/JB.00086-20
220. Dávid Kuti. A leggyakoribb légúti fertőzéseket okozó vírusok és azok szerepe a 2023/2024-es légúti szezonban. Microbiological Circular. 2024;3(2016 16:22-43).
221. Brinkmann A, Uddin S, Krause E, Surtees R, Dinçer E, Kar S, et al. Utility of a Sequence-Independent, Single-Primer-Amplification (SISPA) and Nanopore Sequencing Approach for Detection and Characterization of Tick-Borne Viral Pathogens. Viruses. 2021 Jan 29;13(2):203. doi:10.3390/v13020203
222. Bioline. Clean-up using AMPure XP beads v1. 2016. doi:10.17504/protocols.io.f3ebqje
223. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014 Aug 1;30(15):2114–20. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
224. Wood DE, Salzberg SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. Genome Biol. 2014 Mar 3;15(3):R46. doi:10.1186/gb-2014-15-3-r46
225. Marcelino VR, Clausen PTLC, Buchmann JP, Wille M, Iredell JR, Meyer W, et al. CCMetagen: comprehensive and accurate identification of eukaryotes and prokaryotes in metagenomic data. Genome Biol. 2020 Dec 28;21(1):103. doi:10.1186/s13059-020-02014-2
226. Aksamentov I, Roemer C, Hodcroft E, Neher R. Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. J Open Source Softw. 2021 Nov 30;6(67):3773. doi:10.21105/joss.03773
227. Steinig E, Coin L. Nanoq: ultra-fast quality control for nanopore reads. J Open Source Softw. 2022 Jan 8;7(69):2991. doi:10.21105/joss.02991

228. Bertani G. Studies on Lysogenesis I. J Bacteriol. 1951 Sep;62(3):293–300. doi:10.1128/jb.62.3.293-300.1951
229. Lasch P, Nattermann H, Erhard M, Stämmler M, Grunow R, Bannert N, et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry Compatible Inactivation Method for Highly Pathogenic Microbial Cells and Spores. Anal Chem. 2008 Mar 15;80(6):2026–34. doi:10.1021/ac701822j
230. International Standard ISO 8199:2018. Water quality. General requirements and guidance for microbiological examinations by culture [Internet]. 2018 [cited 2025 Apr 10]. Report 3. Available from: https://www.iso.org/standard/65350.html
231. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. Journal of Computational Biology. 2012 May;19(5):455–77. doi:10.1089/cmb.2012.0021
232. Schwengers O, Jelonek L, Dieckmann MA, Beyvers S, Blom J, Goesmann A. Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. Microb Genom. 2021 Nov 5;7(11). doi:10.1099/mgen.0.000685
233. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. BMC Genomics. 2008 Dec 8;9(1):75. doi:10.1186/1471-2164-9-75
234. Couvin D, Bernheim A, Toffano-Nioche C, Touchon M, Michalik J, Néron B, et al. CRISPRCasFinder, an update of CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. Nucleic Acids Res. 2018 Jul 2;46(W1):W246–51. doi:10.1093/nar/gky425
235. Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. Nucleic Acids Res. 2016 Jan 4;44(D1):D694–7. doi:10.1093/nar/gkv1239
236. Florensa AF, Kaas RS, Clausen PTLC, Aytan-Aktug D, Aarestrup FM. ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of

phenotypes from genotypes. Microb Genom. 2022 Jan 17;8(1). doi:10.1099/mgen.0.000748

237. Lichtenegger S, Trinh TT, Assig K, Prior K, Harmsen D, Pesl J, et al. Development and Validation of a Burkholderia pseudomallei Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme To Facilitate Molecular Surveillance. J Clin Microbiol. 2021 Jul 19;59(8). doi:10.1128/JCM.00093-21
238. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res. 2018 Sep 24;3:124. doi:10.12688/wellcomeopenres.14826.1
239. Zhou Z, Alikhan NF, Sergeant MJ, Luhmann N, Vaz C, Francisco AP, et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. Genome Res. 2018 Sep;28(9):1395–404. doi:10.1101/gr.232397.117
240. Thorburn F, Bennett S, Modha S, Murdoch D, Gunson R, Murcia PR. The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of respiratory infections. Journal of Clinical Virology. 2015 Aug;69:96–100. doi:10.1016/j.jcv.2015.06.082
241. Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2019 Jan 24;14(1):319–38. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012751
242. dos Santos MM, Salles TS, de Campos GM, Brcko IC, Lima ARJ, Sampaio SC, et al. Acute Respiratory Infections (ARIs): Current Etiological Perspectives and Advances in Viral Metagenomics—A Review. Viruses. 2025 Nov 27;17(12):1554. doi:10.3390/v17121554
243. Brizuela J, Roodsant TJ, Hasnoe Q, van der Putten BCL, Kozakova J, Slotved HC, et al. Molecular Epidemiology of Underreported Emerging Zoonotic Pathogen *Streptococcus suis* in Europe. Emerg Infect Dis. 2024 Mar;30(3):413–22. doi:10.3201/eid3003.230348

244. Bartley PS, Deshpande A, Yu PC, Klompas M, Haessler SD, Imrey PB, et al. Bacterial coinfection in influenza pneumonia: Rates, pathogens, and outcomes. Infect Control Hosp Epidemiol. 2022 Feb 23;43(2):212–7. doi:10.1017/ice.2021.96

245. Zhao Q, Sang X, Gao D, Zhang Z, Xuan A, Peng W. Efficacy and safety of doxycycline for severe Mycoplasma pneumoniae pneumonia in pediatric patients. Clin Exp Med. 2025 Jul 22;25(1):259. doi:10.1007/s10238-025-01793-x

246. Ren R, Xu Y, Cui X, Zhang M, Wu X, Wang T, et al. Doxycycline treatment for drug-resistant Mycoplasma pneumoniae pneumonia and evaluation of key predictive factors for refractory disease. Front Med (Lausanne). 2026 Apr 8;13. doi:10.3389/fmed.2026.1714717

247. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Internet]. 2026 [cited 2026 Jul 14]. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases

248. Gyuranecz M, Birdsell DN, Splettstoesser W, Seibold E, Beckstrom-Sternberg SM, Makrai L, et al. Phylogeography of Francisella tularensis subsp. holarctica, Europe. Emerg Infect Dis. 2012 Feb;18(2):290–3. doi:10.3201/eid1802.111305

249. Maurin M, Pondérand L, Hennebique A, Pelloux I, Boisset S, Caspar Y. Tularemia treatment: experimental and clinical data. Front Microbiol. 2024 Jan 17;14. doi:10.3389/fmicb.2023.1348323

250. World Health Organization (WHO). Preparedness and resilience for emerging threats. Module 1: planning for respiratory pathogen pandemics. Geneva: WHO; 2024.

251. Wang Y nan, Wu Y ting, Cao L, Niu W quan. Application of metagenomic next-generation sequencing in the etiological diagnosis of refractory pneumonia in children. Front Microbiol. 2024 Jul 15;15. doi:10.3389/fmicb.2024.1357372

252. Organization WH. Global epidemiological surveillance standards for influenza [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2013. Available from: https://apps.who.int/iris/handle/10665/311268

253. ECDC. Surveillance Report, Seasonal influenza, 2023−2024. 2024.
254. World Health Organization. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. . 2002.
255. Zhang K, Bai Y zhe, Liu C, Liu S shan, Lu X xin, Yang R gong. Composition of pathogenic microorganism in chronic osteomyelitis based on metagenomic sequencing and its application value in etiological diagnosis. BMC Microbiol. 2023 Oct 28;23(1):313. doi:10.1186/s12866-023-03046-x
256. Liu Y, Ma Y. Clinical applications of metagenomics next-generation sequencing in infectious diseases. Journal of Zhejiang University-SCIENCE B. 2024 Jun 17;25(6):471–84. doi:10.1631/jzus.B2300029
257. Brown JR, Bharucha T, Breuer J. Encephalitis diagnosis using metagenomics: application of next generation sequencing for undiagnosed cases. Journal of Infection. 2018 Mar;76(3):225–40. doi:10.1016/j.jinf.2017.12.014
258. Yuan C, Xu W, Zhao C, Gao W, Wu G. Case Report: Detection of Treponema phagedenis in cerebrospinal fluid of a neurosyphilis patient by metagenomic next-generation sequencing. Front Cell Infect Microbiol. 2023 Aug 29;13. doi:10.3389/fcimb.2023.1218049
259. Tsagkli P, Piperaki ET, Chra E, Charakida M, Georgaki I, Syrimi N, et al. Balamuthia mandrillaris Encephalitis in a 12-Year-old Girl: Report of the First Case Diagnosed in Greece. Pediatric Infectious Disease Journal. 2026 Jan 3;45(1):e25–7. doi:10.1097/INF.0000000000004977
260. Saffioti C, Mesini A, Caorsi R, Severino M, Gattorno M, Castagnola E. Balamuthia mandrillaris infection: report of 1st autochthonous, fatal case in Italy. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2022 Apr 20;41(4):685–7. doi:10.1007/s10096-022-04404-9
261. Jensenius M, Fournier PE, Vene S, Hoel T, Hasle G, Henriksen AZ, et al. African Tick Bite Fever in Travelers to Rural Sub-Equatorial Africa. Clinical Infectious Diseases. 2003 Jun 1;36(11):1411–7. doi:10.1086/375083

262. Camprubí-Ferrer D, Cobuccio L, Van Den Broucke S, Genton B, Bottieau E, d'Acremont V, et al. Causes of fever in returning travelers: a European multicenter prospective cohort study. J Travel Med. 2022 Mar 21;29(2). doi:10.1093/jtm/taac002
263. Pintore E, Olivieri E, Floriano AM, Sassera D, Sanna N, Garippa G. First detection of Amblyomma variegatum and molecular finding of Rickettsia africae in Sardinia, Italy. Ticks Tick Borne Dis. 2021 Jan;12(1):101561. doi:10.1016/j.ttbdis.2020.101561
264. Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. Clin Microbiol Rev. 2013 Oct;26(4):657–702. doi:10.1128/CMR.00032-13
265. Talhelm CF, Helms JL, Tran LT, Contreras BX, Stevens ML, Sierra-Hoffman M, et al. Rickettsia typhi central nervous system infection. IDCases. 2020;21:e00852. doi:10.1016/j.idcr.2020.e00852
266. McLeod MP, Qin X, Karpathy SE, Gioia J, Highlander SK, Fox GE, et al. Complete Genome Sequence of Rickettsia typhi and Comparison with Sequences of Other Rickettsiae. J Bacteriol. 2004 Sep;186(17):5842–55. doi:10.1128/JB.186.17.5842-5855.2004
267. Liu Y, Zheng G, Li J, Yang N, Li J, Liu Z, et al. A Case Report of Cutaneous Anthrax Diagnosed by Using a Metagenomic Next-Generation Sequencing (mNGS) Approach. Infect Drug Resist. 2023 Jun;Volume 16:3601–6. doi:10.2147/IDR.S411717
268. Zhang J, Hou XY, Wang JY, Lu B. Case report: Cutaneous anthrax diagnosed using mNGS of a formalin-fixed paraffin-embedded tissue sample. Front Cell Infect Microbiol. 2024 Apr 4;14. doi:10.3389/fcimb.2024.1329235
269. Haake DA, Levett PN. Leptospirosis in Humans. In. 2015. p. 65–97. doi:10.1007/978-3-662-45059-8_5
270. Hu HY, Wei SY, Huang WH, Pan CH. Fatal parvovirus B19 infections: a report of two autopsy cases. Int J Legal Med. 2019 Mar 5;133(2):553–60. doi:10.1007/s00414-018-1921-6

271. Timmerman AL, Schönert ALM, van der Hoek L. Anelloviruses versus human immunity: how do we control these viruses? FEMS Microbiol Rev. 2024 Jan 12;48(1). doi:10.1093/femsre/fuae005
272. Meza-Romero R, Navarrete-Dechent C, Downey C. Molluscum contagiosum: an update and review of new perspectives in etiology, diagnosis, and treatment. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2019 May;Volume 12:373–81. doi:10.2147/CCID.S187224
273. Kuchta R, Kołodziej-Sobocińska M, Brabec J, Młocicki D, Sałamatin R, Scholz T. Sparganosis (Spirometra) in Europe in the Molecular Era. Clinical Infectious Diseases. 2021 Mar 1;72(5):882–90. doi:10.1093/cid/ciaa1036
274. Togashi T, Matsuzono Y, Narita M, Morishima T. Influenza-associated acute encephalopathy in Japanese children in 1994–2002. Virus Res. 2004 Jul;103(1–2):75–8. doi:10.1016/j.virusres.2004.02.016
275. Steininger C, Popow-Kraupp T, Laferl H, Seiser A, Gödl I, Djamshidian S, et al. Acute Encephalopathy Associated with Influenza A Virus Infection. Clinical Infectious Diseases. 2003 Mar 1;36(5):567–74. doi:10.1086/367623
276. Alsolami A, Shiley K. Successful Treatment of Influenza-Associated Acute Necrotizing Encephalitis in an Adult Using High-Dose Oseltamivir and Methylprednisolone: Case Report and Literature Review. Open Forum Infect Dis. 2017 Jul 1;4(3). doi:10.1093/ofid/ofx145
277. Deuble M, Aquilina C, Norton R. Neurologic Melioidosis. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2013 Sep 4;89(3):535–9. doi:10.4269/ajtmh.12-0559
278. Dimitriou NG, Flüh G, Zange S, Aytulun A, Turowski B, Hartung HP, et al. Case report: First case of neuromelioidosis in Europe: CNS infection caused by Burkholderia pseudomallei. Front Neurol. 2022 Jul 29;13. doi:10.3389/fneur.2022.899396
279. Hesstvedt L, Reikvam DH, Dunlop O. Neurological melioidosis in Norway presenting with a cerebral abscess. IDCases. 2015;2(1):16–8. doi:10.1016/j.idcr.2014.11.001

280. Wiersinga WJ, Virk HS, Torres AG, Currie BJ, Peacock SJ, Dance DAB, et al. Melioidosis. Nat Rev Dis Primers. 2018 Feb 1;4(1):17107. doi:10.1038/nrdp.2017.107
281. Sanchez-Villamil JI, Tapia D, Borlee GI, Borlee BR, Walker DH, Torres AG. Burkholderia pseudomallei as an Enteric Pathogen: Identification of Virulence Factors Mediating Gastrointestinal Infection. Infect Immun. 2020 Dec 15;89(1). doi:10.1128/IAI.00654-20
282. Abbink FC, Orendi JM, de Beaufort AJ. Mother-to-Child Transmission of Burkholderia pseudomallei. New England Journal of Medicine. 2001 Apr 12;344(15):1171–2. doi:10.1056/NEJM200104123441516
283. Aziz A, Sarovich DS, Harris TM, Kaestli M, McRobb E, Mayo M, et al. Suspected cases of intracontinental Burkholderia pseudomallei sequence type homoplasy resolved using whole-genome sequencing. Microb Genom. 2017 Nov 14;3(11). doi:10.1099/mgen.0.000139
284. Heacock-Kang Y, McMillan IA, Norris MH, Sun Z, Zarzycki-Siek J, Bluhm AP, et al. The Burkholderia pseudomallei intracellular 'TRANSITome.' Nat Commun. 2021 Mar 26;12(1):1907. doi:10.1038/s41467-021-22169-1
285. Savelkoel J, Dance DAB, Currie BJ, Limmathurotsakul D, Wiersinga WJ. A call to action: time to recognise melioidosis as a neglected tropical disease. Lancet Infect Dis. 2022 Jun;22(6):e176–82. doi:10.1016/S1473-3099(21)00394-7
286. Szita J, SA, SH, CE& SK. Incidence of non-cholera vibrios in Hungary. Acta Microbiol Acad Sci Hung. 1979;26:71–83.
287. Amato E, Riess M, Thomas-Lopez D, Linkevicius M, Pitkänen T, Wołkowicz T, et al. Epidemiological and microbiological investigation of a large increase in vibriosis, northern Europe, 2018. Eurosurveillance. 2022 Jul 14;27(28). doi:10.2807/1560-7917.ES.2022.27.28.2101088
288. Pretzer C, Druzhinina IS, Amaro C, Benediktsdóttir E, Hedenström I, Hervio-Heath D, et al. High genetic diversity of Vibrio cholerae in the European lake Neusiedler See is associated with intensive recombination

in the reed habitat and the long-distance transfer of strains. Environ Microbiol. 2017;19(1). doi:10.1111/1462-2920.13612

289. Judit Henczkó, Szilárd Tóth, Ákos Tóth, Bereniké Novák, Márta Vargha, Bernadett Khayer, et al. Emergence of non-O1, non-O139 Vibrio cholerae infections in Hungary P1186. In: ESCMID. Barcelona; 2024.
290. Dalsgaard A, Forslund A, Bodhidatta L, Serichantalergs O, Pitarangsi C, Pang L, et al. A high proportion of Vibrio cholerae strains isolated from children with diarrhoea in Bangkok, Thailand are multiple antibiotic resistant and belong to heterogenous non-O1, non-O139 O-serotypes. Epidemiol Infect. 1999 Apr 1;122(2):217–26. doi:10.1017/S0950268899002137
291. Igere BE, Okoh AI, Nwodo UU. Non-serogroup O1/O139 agglutinable Vibrio cholerae: a phylogenetically and genealogically neglected yet emerging potential pathogen of clinical relevance. Arch Microbiol. 2022 Jun 14;204(6):323. doi:10.1007/s00203-022-02866-1
292. Shannon JD, Kimbrough RC. Pulmonary Cholera Due to Infection with a Non-O1 *Vibrio cholerae* Strain. J Clin Microbiol. 2006 Sep;44(9):3459–60. doi:10.1128/JCM.02343-05
293. Ceccarelli D, Chen A, Hasan NA, Rashed SM, Huq A, Colwell RR. Non-O1/Non-O139 Vibrio cholerae carrying multiple virulence factors and V. cholerae O1 in the Chesapeake Bay, Maryland. Appl Environ Microbiol. 2015;81(6). doi:10.1128/AEM.03540-14
294. Kumar A, Das B, Kumar N. Vibrio Pathogenicity Island-1: The Master Determinant of Cholera Pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol. 2020 Oct 6;10. doi:10.3389/fcimb.2020.561296
295. Zhang Q, Alter T, Fleischmann S. Non-O1/Non-O139 Vibrio cholerae—An Underestimated Foodborne Pathogen? An Overview of Its Virulence Genes and Regulatory Systems Involved in Pathogenesis. Microorganisms. 2024 Apr 18;12(4):818. doi:10.3390/microorganisms12040818
296. Byun H, Jung IJ, Chen J, Larios Valencia J, Zhu J. Siderophore piracy enhances Vibrio cholerae environmental survival and pathogenesis.

Microbiology (N Y). 2020 Dec 1;166(11):1038–46. doi:10.1099/mic.0.000975

297. Baker-Austin C, Trinanes J, Martinez-Urtaza J. The new tools revolutionizing Vibrio science. Environ Microbiol. 2020 Oct 23;22(10):4096–100. doi:10.1111/1462-2920.15083
298. Rehm C, Kolm C, Pleininger S, Heger F, Indra A, Reischer GH, et al. Vibrio cholerae—An emerging pathogen in Austrian bathing waters? Wien Klin Wochenschr. 2023 Nov 2;135(21–22):597–608. doi:10.1007/s00508-023-02241-0
299. Sampaio A, Silva V, Poeta P, Aonofriesei F. Vibrio spp.: Life Strategies, Ecology, and Risks in a Changing Environment. Diversity (Basel). 2022 Jan 29;14(2):97. doi:10.3390/d14020097
300. Leroy AG, Lerailler F, Quilici ML, Bourdon S. Otite à Vibrio cholerae non-O1/non-O139 en France métropolitaine. Med Mal Infect. 2019 Aug;49(5):359–61. doi:10.1016/j.medmal.2019.03.003
301. Rehulka J, Petras P, Marejkova M, Aldova E. Vibrio cholerae non-O1/non-O139 infection in fish in the Czech Republic. Vet Med (Praha). 2015 Jan 31;60(1):16–22. doi:10.17221/7921-VETMED
302. Jacqueline C, Román Soto S, Herrera-Leon S. Non-toxigenic cases of Vibrio cholerae in Spain from 2012 to 2022. Microb Genom. 2024 Dec 11;10(12). doi:10.1099/mgen.0.001315
303. European Centre for Disease Prevention and Control. European Centre for Disease Prevention and Control. Single Programming Document 2026–202. 2026.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1 Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

1.

Henczkó Judit, Vargha Márta, Kállai András, Kristóf Katalin, Tóth Ákos, Tóth Szilárd, Pályi Bernadett, Khayer Bernadett, Róka Eszter, Novák Bereniké, Mag Tünde, Mezei Eszter, Molnár Zsuzsanna, Kis Zoltán

Genomic characterization of non-O1, non-O139 Vibrio cholerae causing rare clinical manifestation

BMC INFECTIOUS DISEASES 26: 1 Paper: 58, 9 p. (2026)

Közlemény: 36490552 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Infectious Diseases SJR indikátor: Q1

IF: 3,2

2.

Henczkó Judit

Veszélyes bakteriális kórokozók

In: Kappelmayer János (szerk.) Az orvosdiagnosztikai szakmák fejlődése Magyarországon

Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetemi Kiadó (2026) 333 p. p. 217-218.

Közlemény: 37359620 | Szaktanulmány (Könyvrészlet) | Tudományos

3.

Henczkó Judit, Tóth Ákos, Knausz Márta, Gartner Béla, Reményi Ákos, Bíró Edit, Létay Erzsébet, Rókusz László, Tóth Szilárd, Pályi Bernadett, Mag Tünde, Erdősi Tímea, Deézsi-Magyar Nóra, Molnár Zsuzsanna, Kis Zoltán

Whole Genome Sequencing and Comparative Genomics of the Emerging Pathogen Burkholderia pseudomallei Isolated from Two Travel-Related Infections in Hungary

PATHOGENS 14: 11 Paper: 1108, 23 p. (2025)

Közlemény: 36425734 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Immunology and Microbiology (miscellaneous) SJR indikátor: Q1

Scopus - Immunology and Allergy SJR indikátor: Q2

Scopus - Infectious Diseases SJR indikátor: Q2

Scopus - Microbiology (medical) SJR indikátor: Q2

Scopus - Molecular Biology SJR indikátor: Q2

IF: 3,8

10.2 Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

1.

Henczkó Judit, Kienle Zsuzsa, Kádár János, Kádár-Hürkecz Enikő, Tárnoki-Boross Katalin, Sütő Panna, Pályi Bernadett, Tóth Ákos, Kamotsay Katalin, Molnár Zsuzsanna, Kis Zoltán. Laboratory-Acquired Brucella abortus Infection Mimicking Autoimmune Disease: A Case Report with Genomic Confirmation PATHOGENS 15: 5 Paper: 460, 9 p. (2026)

Közlemény: 37310438 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Immunology and Microbiology (miscellaneous) SJR indikátor: Q1

Scopus - Immunology and Allergy SJR indikátor: Q2

Scopus - Infectious Diseases SJR indikátor: Q2

Scopus - Microbiology (medical) SJR indikátor: Q2

Scopus - Molecular Biology SJR indikátor: Q2

IF: 3,8

2.

Deézsi-Magyar Nóra, Dénes Béla, Novák Bereniké, Zsidei Gyula, Déri Dániel, **Henczkó Judit**, Pályi Bernadett, Kis Zoltán. First Broad-Range Serological Survey of Crimean–Congo Hemorrhagic Fever among Hungarian Livestock VIRUSES 16: 6 Paper: 875, 10 p. (2024)

Közlemény: 34912465 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Infectious Diseases SJR indikátor: Q1

Scopus - Virology SJR indikátor: Q1

IF: 3,5

3.

Nagy Anna, Horváth András, Mezei Eszter, **Henczkó Judit**, Magyar Nóra, Nagy Orsolya, Koroknai Anita, Csonka Nikolett, Takács Mária. West Nile virus infections in Hungary: Epidemiological update and phylogenetic analysis of the Hungarian virus

strains between 2015 and 2022 ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 70: 2 pp. 111-118. (2023)

Közlemény: 33936872 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Immunology and Microbiology (miscellaneous) SJR indikátor: Q3

Scopus - Infectious Diseases SJR indikátor: Q3

Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR indikátor: Q3

Scopus - Microbiology (medical) SJR indikátor: Q3

IF: 1,3

4.

Takács Mária, **Henczkó Judit**, Déri Dániel, Barcsay Erzsébet, Pályi Bernadett, Kis Zoltán. Majomhimlő: Régi kórokozó új köntösben ORVOSOK LAPJA 19: 4 pp. 18-20. (2022)

Közlemény: 33083273 | Összefoglaló cikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

5.

Pándics Tamás, Róka Eszter, **Henczkó Judit**, Khayer Bernadett, Kis Zoltán, Málnási Tibor, Pályi Bernadett, Schuler Eszter, Vargha Márta. A hazai szennyvízalapú COVID-19 előrejelző rendszer – másfél év tanulságai NÉPEGÉSZSÉGÜGY 99: 1 pp. 154-161. (2022)

Közlemény: 34021167 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

6.

Vaughan Aisling M, Cenciarelli Orlando, Colombe Soledad, Alves de Sousa Luís, Fischer Natalie, Gossner Celine M, Pires Jeff, Scardina Giuditta, Aspelund Gudrun, Avercenko Margarita, Bengtsson Sara, Blomquist Paula, Caraglia Anna, Chazelle Emilie, Cohen Orna, Diaz Asuncion, Dillon Christina, Dontsenko Irina, Kotkavaara Katja, Fafangel Mario, Ferraro Federica, Firth Richard, Fonager Jannik, Frank Christina, Carrasco Mireia G, Gkolfinopoulou Kassiani, Grenersen Marte Petrikke, Guzmán Herrador Bernardo R, **Henczkó Judit**, Hoornenborg Elske, Igoe Derval, Ilić Maja, Jansen Klaus, Janță Denisa-Georgiana, Johansen Tone Bjordal, Kasradze Ana, Koch Anders, Kyncl Jan, Martins João Vieira, McAuley Andrew, Mellou Kassiani, Molnár Zsuzsanna, Mor Zohar, Mossong Joël, Novacek Alina, Orlikova Hana, Pem

Novosel Iva, Rossi Maria K, Sadkowska-Todys Malgorzata, Sawyer Clare, Schmid Daniela, Sîrbu Anca, Sondén Klara, Tarantola Arnaud, Tavares Margarida, Thordardottir Marianna, Učakar Veronika, Van Ewijk Catharina, Varjas Juta, Vergison Anne, Vivancos Roberto, Zakrzewska Karolina, Pebody Richard, Haussig Joana M. A large multi-country outbreak of monkeypox across 41 countries in the WHO European Region, 7 March to 23 August 2022 EUROSURVEILLANCE 27: 36 Paper: 2200620, 9 p. (2022)

Közlemény: 35746476 | Sokszerzős vagy csoportos szerzőségű szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Epidemiology SJR indikátor: D1

Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR indikátor: D1

Scopus - Public Health, Environmental and Occupational Health SJR indikátor: D1

Scopus - Virology SJR indikátor: D1

IF: 19,0

7.

Tscherne Alina, Mantel Enrico, Boskani Talar, Budniak Sylwia, Elschner Mandy, Fasanella Antonio, Feruglio Siri L, Galante Domenico, Giske Christian G, Grunow Roland, **Henczkó Judit**, Hinz Christin, Iwaniak Wojciech, Jacob Daniela, Kedrak-Jablonska Agnieszka, Jensen Veronica K, Johansen Tone B, Kahlmeter Gunnar, Manzulli Viviana, Matuschek Erika, Melzer Falk, Nuncio Maria S, Papaparaskevas Joseph, Pelerito Ana, Solheim Margrete, Thomann Susanne, Tsakris Athanasios, Wahab Tara, Weiner Marcin, Zoeller Lothar, Zange Sabine. Adaptation of Brucella melitensis Antimicrobial Susceptibility Testing to the ISO 20776 Standard and Validation of the Method MICROORGANISMS 10: 7 p. 1470, 18 p. (2022)

Közlemény: 35746482 | Sokszerzős vagy csoportos szerzőségű szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Microbiology (medical) SJR indikátor: Q2

Scopus - Microbiology SJR indikátor: Q2

Scopus - Virology SJR indikátor: Q2

IF: 4,5

8.

Magyar Nóra, Kis Zoltán, Barabás Éva, Nagy Anna, **Henczkó Judit**, Damjanova Ivelina, Takács Mária, Pályi Bernadett. New geographical area on the map of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: First serological evidence in the Hungarian population TICKS AND TICK-BORNE DISEASES 12: 1 Paper: 101555, 5 p. (2021)

Közlemény: 31808129 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Insect Science SJR indikátor: D1

Scopus - Infectious Diseases SJR indikátor: Q1

Scopus - Microbiology SJR indikátor: Q1

Scopus - Parasitology SJR indikátor: Q1

IF: 3,817

9.

Horváti Kata, Fodor Kinga, Pályi Bernadett, **Henczkó Judit**, Balka Gyula, Gyulai Gergő, Kiss Éva, Biri-Kovács Beáta, Senoner Zsuzsanna, Bősze Szilvia. Novel Assay Platform to Evaluate Intracellular Killing of Mycobacterium tuberculosis: In Vitro and In Vivo Validation FRONTIERS IN IMMUNOLOGY 12 Paper: 750496, 19 p. (2021)

Közlemény: 32498437 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Immunology SJR indikátor: Q1

Scopus - Immunology and Allergy SJR indikátor: Q1

IF: 8,787

10.

Ricci Maria, Horváti Kata, Juhász Tünde, Szigyártó Imola, Török György, Sebák Fanni, Bodor Andrea, Homolya László, **Henczkó Judit**, Pályi Bernadett, Mlinkó Tamás, Mihály Judith, Bilal Nizami, Zihuayuan Yang, Fengming Lin, Xiaolin Lu, Románszki Loránd, Bóta Attila, Varga Zoltán, Bősze Szilvia, Zsila Ferenc, Beke-Somfai Tamás. Anionic food color tartrazine enhances antibacterial efficacy of histatin-derived peptide DHVAR4 by fine-tuning its membrane activity QUARTERLY REVIEWS OF BIOPHYSICS 53 Paper: e5, 11 p. (2020)

Közlemény: 31202443 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Biophysics SJR indikátor: D1

IF: 5,318

11.

Quemé-Peña Mayra, Juhász Tünde, Mihály Judith, Szigyártó Imola Csilla, Horváti Kata, Bősze Szilvia, **Henczkó Judit**, Pályi Bernadett, Németh Csaba, Varga Zoltán, Zsila Ferenc, Beke-Somfai Tamás. Manipulating active structure and function of cationic antimicrobial peptide CM15 with the polysulfonated drug suramin: a step closer to in vivo complexity CHEMBIOCHEM 20: 12 pp. 1578-1590. (2019)

Közlemény: 30432275 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Organic Chemistry SJR indikátor: Q1

Scopus - Biochemistry SJR indikátor: Q2

Scopus - Molecular Biology SJR indikátor: Q2

Scopus - Molecular Medicine SJR indikátor: Q2

IF: 2,576

12.

Horváti Kata, Pályi Bernadett, **Henczkó Judit**, Balka Gyula, Szabó Eleonóra, Farkas Viktor, Biri-Kovács Beáta, Szeder Bálint, Fodor Kinga. A Convenient Synthetic Method to Improve Immunogenicity of Mycobacterium tuberculosis Related T-Cell Epitope Peptides VACCINES (BASEL) 7: 3 Paper: 101, 15 p. (2019)

Közlemény: 30777753 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Pharmacology (medical) SJR indikátor: D1

Scopus - Pharmacology SJR indikátor: D1

Scopus - Drug Discovery SJR indikátor: Q1

Scopus - Immunology SJR indikátor: Q1

Scopus - Infectious Diseases SJR indikátor: Q1

IF: 4,086

13.

Pályi B, Magyar N, **Henczkó J**, Szalai B, Farkas Á, Strecker T, Takács M, Kis Z. Determining the effect of different environmental conditions on Ebola virus viability in clinically relevant specimens EMERGING MICROBES & INFECTIONS 7: 1 Paper: 52, 7 p. (2018)

Közlemény: 3369223 | Szakcikk (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Drug Discovery SJR indikátor: D1

Scopus - Infectious Diseases SJR indikátor: D1

Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR indikátor: D1

Scopus - Parasitology SJR indikátor: D1

Scopus - Epidemiology SJR indikátor: Q1

Scopus - Immunology SJR indikátor: Q1

Scopus - Microbiology SJR indikátor: Q1

Scopus - Virology SJR indikátor: Q1

IF: 6,212

14.

Balla Eszter, Petrovay Fruzsina, Erdősi Tímea, Balázs Andrea, **Henczkó Judit**, Urbán Edit, Gilbert GG Donders. Distribution of Chlamydia trachomatis genotypes in neonatal conjunctivitis in Hungary JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY 66: 7 pp. 915-918. (2017)

Közlemény: 3251628 | Rövid közlemény (Folyóiratcikk) | Tudományos

Scopus - Medicine (miscellaneous) SJR indikátor: Q1

Scopus - Microbiology (medical) SJR indikátor: Q2

Scopus - Microbiology SJR indikátor: Q2

IF: 2,112

11. Köszönetnyilvánítás

Konzulensemnek Dr. Kis Zoltánnak, aki segítette fejlődésemet, munkámat és mindig rendelkezésemre állt, ha segítségre volt szükségem.

Pályi Bernadettnek, aki mindig lehetővé tette módszerfejlesztési törekvéseimet, aki Zoltánnal együtt lehetővé tette, hogy számos nemzetközi együttműködésben, képzésen, valamint munkacsoport munkájában vegyek részt és akitől megtanultam a BSL-3 és BSL-4 szinten történő munkavégzés minden fortéját.

Dr. Tóth Ákosnak, aki mindig lehetőséget adott nekem a tanulásra, aki mindig kiállt értem és mindig biztosított róla, hogy az erő velem van.

Dr. Balla Eszternek és Dr. Kienle Zsuzsának, akik mindig szeretettel és sok-sok türelemmel támogatták törekvéseimet.

Közvetlen kollégáimnak a Nemzeti Biztonsági Laboratóriumban és a Mikrobiológiai Laboratóriumi Referencia Főosztályon.

A Légúti Vírusok Nemzeti Referencia Laboratóriumának a SARI mintákban nyújtott segítségért.

Professzor Dr. Czeizel Endrének, aki visszatérő előadóként látogatott középiskolámba és a genetikáról tartott előadásainak köszönhetően véglegesen és visszafordíthatatlanul megszerettette velem a genomika világát is.

Dr. Solymosi Norbertnek, aki bioinformatikai kérdésekben mindig a segítségemre sietett.

Professzor Dr. Takács Máriának, amiért mindig segítő érdeklődéssel támogatta tanulmányaimat.

Professzor Dr. Pál Tibornak, amiért mindig töretlen türelemmel segíti publikációs törekvéseimet.

Családomnak, Lucámnak és Zsoltnak, akik nélkül ez a munka soha nem valósult volna meg.

Függelék

1-es számú függelék. A jelenleg alkalmazott első- és újgenerációs szekvenálási platformok összehasonlítása

Platform	Technológia	Jellemző olvasási hossz	Áteresztőképesség / kimenet	Pontosság	Jellemző alkalmazási terület
Első generációs szekvenálási módszerek					
Sanger (Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer)	Lánctermináció (didezoxi) szekvenálás	~600–1000 bp	Alacsony; egyedi amplikonok	Nagyon magas (>99,9%)	PCR-termékek validálása, egyedi gének és genomrégiók szekvenálása, referencia-ellenőrzés
Második generációs módszerek (short-read szekvenálás)					
Ion Torrent PGM	Félvezető-alapú szekvenálás; a nukleotidbeépülés során felszabaduló H^+ detektálása	~200–400 bp	Alacsony–közepes	Magas, de homopolimer régiókban nagyobb hibaarány	Célzott és amplikonszekvenálás, kisebb genomok szekvenálása

Platform	**Technológia**	**Jellemző olvasási hossz**	**Áteresztőképesség / kimenet**	**Pontosság**	**Jellemző alkalmazási terület**
Illumina (MiSeq, iSeq, NextSeq 1000/2000 stb.)	Sequencing by synthesis (SBS), reverzibilis terminátorokkal	Jellemzően 50–300 bp/read; platformfüggően paired-end	Közepes–magas, platformfüggő	Nagyon magas; ≥Q30 (≥99,9% bázishívási pontosság)	Amplikonszekvenálás, WGS, metagenomika, mikrobiom- és transzkriptomikai vizsgálatok
MGI (DNBSEQ-G99, DNBSEQ-T7)	DNA nanoball (DNB) alapú szekvenálás, cPAS technológia	Jellemzően 100–300 bp/read, paired-end	Magas–nagyon magas, platformfüggő	Nagyon magas	WGS, metagenomika, célzott szekvenálás, transzkriptomika
GeneMind (SURFSeq 5000, GenoLab M, FASTASeq 300)	Sequencing by synthesis, felületi amplifikációval	Platform- és konfigurációfüggő short readek	Közepes–magas, platformfüggő	Magas	WGS, célzott szekvenálás, metagenomika, transzkriptomikai alkalmazások

Platform	**Technológia**	**Jellemző olvasási hossz**	**Áteresztőképesség / kimenet**	**Pontosság**	**Jellemző alkalmazási terület**
AVITI (Element Biosciences)	Avidity sequencing; szintézisalapú, aviditásvezérelt detektálás	Jellemzően 2 × 150 bp	Magas	Nagyon magas; a futtatási konfigurációtól függően magas Q30-arány	WGS, amplikonszekvenálás, metagenomika, transzkriptomika
Harmadik generációs módszerek (long-read szekvenálás)					
PacBio (Sequel II/IIe, Revio)	SMRT (Single Molecule Real-Time); HiFi/CCS szekvenálás	HiFi: jellemzően ~10–25 kb	Magas, platformfüggő	Nagyon magas HiFi-pontosság ≥99,9%	De novo genom-összeállítás, WGS, strukturális variánsok, haplotípus-meghatározás, teljes hosszúságú transzkriptumok
Oxford Nanopore Technologies (MinION, GridION, PromethION)	Nanopórus-alapú, egymolekula-szekvenálás	Nincs elméletileg rögzített felső határ; több kb–több tíz kb, ultra-long readek >100 kb	Alacsonytól nagyon magasig, platform- és flow cell-függő	Magas, basecalling- és kémiaváltozattól függő	De novo assembly, WGS, metagenomika, strukturális variánsok, valós idejű szekvenálás, direkt nukleinsav- és módosításanalízis

2-es számú függelék. A nem- O1, nem-O139 *V. cholerae* legfontosabb, ismert virulencia tulajdonságai

Virulenciafaktor / marker	Megnevezés	Hatás / patogenetikai jelentőség
*hly*A	Hemolizin A	Pórusformáló toxin; hemolitikus, citotoxikus és enterotoxikus hatás; hozzájárul extraintestinalis fertőzésekhez és szövetkárosodáshoz, alveoláris destrukció
MARTX (*rtx*A)	Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin	Pórusformáló citotoxin; antifagociter hatás; immunválasz-gátlás; kulcsszerep bacteraemiában és szepszisben
*rtx*C / *rtx*BD	MARTX aktivátor és transzporter	A MARTX toxin aktivációját és szekrécióját biztosítják; hiányukban a toxin hatása csökken
*chx*A	Cholix toxin	Mono-ADP-riboziláló exotoxin; EF-2 gátlás; elsősorban enterális infekciókban, más faktorokkal együtt fejti ki hatását
stn (NAG-ST)	Hőstabil enterotoxin	Az ETEC ST toxinjának funkcionális megfelelője; egyértelmű patogenitási marker enterális fertőzésekben
*hap*A	Hemagglutinin/proteáz A	Zn-dependens metalloproteáz; szövetkárosítás, kolonizáció elősegítése, gyulladás modulálása

Virulenciafaktor / marker	**Megnevezés**	**Hatás / patogenetikai jelentőség**
*nan*H	Neuraminidáz H	Szinergikus hatás a koleratoxinnal; fokozza a CT kötődését és sejten belüli penetrációját
zot	Zonula occludens toxin	Tight junction károsítás; bélpermeabilitás fokozása; szerep szisztémás disszeminációban és neurotropizmusban
ace	Akcesszórikus kolera enterotoxin	Enterális folyadékszekréció fokozása; enyhébb, de hozzájáruló virulenciafaktor
dermonekrotikus citotoxin	Bőrnekrózist okozó toxin	Lágyrész- és bőrfertőzésekhez, valamint szisztémás toxikus hatásokhoz köthető
vibriobaktin	Siderofor (vasmegkötő molekula)	A gazdaszervezet ’vasmegvonó’ környezetében biztosítja a baktérium számára a szükséges vas felvételét, ezáltal elősegíti a túlélést és szaporodást, különösen invazív fertőzések, például szepszis során
enterobaktin	Nagy affinitású siderofor	nagy affinitású vasmegkötése révén hozzájárul a baktérium túléléséhez és virulenciájához a gazdaszervezetben

Virulenciafaktor / marker	**Megnevezés**	**Hatás / patogenetikai jelentőség**
*feo*ABC	Ferrovas (Fe^{2+}) felvételi rendszer	Siderofor-független vasfelvételt biztosít, elősegítve a baktérium túlélését a gazdaszervezetben
*hut*A	Heme/hemoglobin vasfelvételi receptor	A gazdaszervezetből származó hem vas hasznosítását teszi lehetővé, hozzájárulva a baktérium növekedéséhez és perzisztenciájához szöveti és szisztémás fertőzésekben
LPS	Endotoxin (lipid A komponens)	A TLR4 jelátviteli út aktiválásán keresztül erőteljes gyulladásos választ indukál, amely hozzájárul a szisztémás gyulladáshoz és a szepszis kialakulásához
T3SS	3-as típusú szekréciós rendszer	Kulcsvirulencia-faktor CT-negatív törzsekben; effektorfehérjék gazdasejtbe juttatása; citotoxicitás és immunmoduláció
T6SS	6-os típusú szekréciós rendszer	Bakteriális kompetíció és kolonizáció; szerep a bélflóra kiszorításában és perzisztenciában
VPI-1	Vibrio patogenitási sziget 1	*tcpA/tcpI*, ACF, *toxT*, *tcpPH* gének; kolonizáció és virulencia reguláció

Virulenciafaktor / marker	Megnevezés	Hatás / patogenetikai jelentőség
VPI-2	Vibrio patogenitási sziget 2	Sialidáz-, metabolikus és kolonizációs gének; marker számos patogén izolátumban
VSP-1	Hetedik pandémia patogenitási sziget 1	Elsősorban El Tor és O139 törzsekben; nem tipikus NTVC marker
VSP-2	Hetedik pandémia patogenitási sziget 2	El Tor/O139-specifikus gének; járványtani jelentőség
Quorum sensing (LuxO, HapR)	Sejtsűrűség-függő reguláció	A virulenciafaktorok koordinált expressziója; adaptáció környezeti és humán niche-ekhez
Biofilm-képzési képesség	Kolonizációs és túlélési mechanizmus	Környezeti perzisztencia, fertőző dózis csökkentése, antibiotikum-tolerancia

3-as számú függelék. A cgMLST-analízisbe bevont *Burkholderia pseudomallei* izolátumok NCBI azonosítói*

409OB,
1668
2NCTC_13178,
3110
4MSHR305,
5NCTC_13179,
6MSHR543,
7MSHR2138,
8MSHR1435,
91655
10SiteD_1A,
11SiteD_10J,
12SiteA_10J,
13SiteE_6D,
14SiteC_5E,
152013746776
16InDRE_1Son2018,
173000015486
183000015237
137A_281_02_2_09,
1382604STDY5519149,
1392604STDY5519143,
1407400
1419601
1427803
1439501KV,
1449501
145619s010,
14656,
1474094_225,
1484,
1494,
150619s074,
151619s081,
152619s066,
153490
154BUPS_27_14,
155BUPS_23_14,
27451W_S70,
27558W_S73,
27660W_S74,
277284
278A_202_02_1_06,
279A_041_05_2_03,
2802604STDY5518879,
281A_266_02_1_05,
282A_266_02_1_10,
28364W_S75,
28491W_S76,
285134K,
286134
287A_050_05_2_08,
288A_050_05_2_06,
2892604STDY5518991,
290A_281_02_2_03,
2912604STDY5519281,
292A_055_05_1_07,

192002734728
202013746777
212008724734
223000047530
23294H,
24294H,
252013746878
262013746877
27VB976100,
283000465972
293000465972
302010007509
312008724860
322002721684
332002721171
347894
352002721184
362011756189
372002721123
382002721100
156153
157619s064,
15817_96,
15927_96,
16010__96,
1614086_21,
162619s069,
163488
164619s071,
165619s067,
166413
16715_96,
168457_96,
169619s072,
170619s065,
171612
1724090_0390,
173115
17435,
17535,
293A_055_05_1_03,
294A_055_05_1_09,
2952604STDY5519315,
296619s093,
2972604STDY5519179,
298A_266_02_1_08,
299A_266_02_1_07,
300A_266_02_1_04,
3012604STDY5519011,
302A_050_05_2_02,
303A_050_05_2_04,
304A_050_05_2_10,
305A_050_05_2_05,
306A_229_05_2_09,
307A_229_05_2_08,
308A_229_05_2_07,
309A_229_05_2_05,
310A_229_05_2_06,
311A_229_05_2_10,
312A_229_05_2_04,

392011756295
402011756296
412013833055
422013833057
43BP169,
44BPHN1,
45619s103,
46584_HUN_OEK_2008,
472008724758
48BPs112,
49BPs116,
50BPs115,
51BPs123,
52BPs111,
53BPs110,
54BPs122,
55BPs133,
56BPs114,
57831_NNK_2019,
5845S_S65,
176147
177561
17859,
1794009_19,
180BUPS_26_14,
181BUPS_09_17,
182LMF,
18314M0960418,
184619s078,
185619s079,
186619s082,
187619s088,
188619s084,
1894044_138,
1904094_0081,
19148,
19254,
1934033_10,
19433,
19517,
313A_229_05_2_03,
3142604STDY5519001,
315A_229_05_2_02,
316BUPS_22_19,
317BUPS_14_19,
318619s046,
319982
320982
321HNBP001,
322BUPS_01_17,
323A_202_02_1_07,
324A_278_05_2_03,
325A_278_05_2_10,
326A_278_05_2_08,
327A_278_05_2_06,
328A_278_05_2_04,
329A_266_02_1_03,
330A_266_02_1_09,
3312604STDY5519271,
3322604STDY5518899,

5946W_S66,
60576
61M1,
62MARAN,
6340S_S61,
6443S_S63,
652604STDY5519251,
662604STDY5519103,
67A_277_02_2_05,
68A_277_02_2_09,
69A_277_02_2_06,
70A_277_02_2_02,
71A_277_02_2_03,
72A_277_02_2_04,
73A_277_02_2_07,
74A_277_02_2_08,
752604STDY5519021,
76A_099_05_2_07,
77A_099_05_2_05,
78A_099_05_2_06,
19610,
197107
198BUPS_11_09,
199D286,
200NZ_LR595896_NZ_LR595897,
201D286,
202619s008,
203619s005,
204SP32285_S1,
205SP32285_S2,
20611,
20720,
2088,
209PMC2000,
210NZ_LR595894_NZ_LR595895,
211A_095_05_2_05,
212A_095_05_2_04,
213A_095_05_2_02,
214A_095_05_2_06,
215A_095_05_2_09,
3332604STDY5519283,
33452W_S71,
33553W_S72,
336CMS,
337THE,
338BUPS_04_17,
339BUPS_05_18,
340BUPS_11_18,
341BUPS_06_17,
3422604STDY5519092,
343350105
344350105
345350105
346A_055_05_1_04,
347A_050_05_2_07,
348A_050_05_2_09,
3492604STDY5518889,
3502604STDY5519180,
351A_055_05_1_05,
352A_175_05_2_09,

79A_099_05_1_03,
8021013
8121013
8221198
832119B,
84vgh16R,
85vgh16W,
862604STDY5519261,
872604STDY5519159,
88A_288_02_1_02,
892604STDY5519293,
9044W_S64,
9143W_S62,
9247W_S67,
9349W_S68,
94A_177_01_2_10,
95A_177_01_2_02,
96A_177_01_2_04,
97A_177_01_2_08,
98A_177_01_2_07,
2162604STDY5518931,
217A_095_05_2_03,
218A_095_05_2_08,
219A_095_05_2_07,
220A_095_05_2_10,
221A_202_02_1_09,
2222604STDY5519231,
223BPC006,
2242125
2252125
226A_099_05_2_09,
2272604STDY5519082,
228A_055_05_1_08,
229A_055_05_1_10,
230A_099_05_1_04,
2311106a,
2321106b,
233A_161_02_1_07,
234A_161_02_1_03,
235A_161_02_1_10,
3532604STDY5518971,
354A_175_05_2_06,
355A_202_02_1_08,
356A_202_02_1_05,
357A_202_02_1_03,
358A_202_02_1_02,
3592604STDY5519169,
3602604STDY5518951,
361A_055_05_1_02,
3622604STDY5518900,
363A_055_05_1_06,
3642604STDY5519133,
365A_175_05_2_05,
366A_175_05_2_10,
367A_175_05_2_08,
3682604STDY5519123,
369A_041_05_2_06,
370A_041_05_2_02,
371A_041_05_2_09,
372A_041_05_2_10,

99A_177_01_2_03,
1002604STDY5518981,
101A_177_01_2_06,
102A_177_01_2_05,
103A_177_01_2_09,
1042604STDY5519303,
105A_161_02_1_02,
1062604STDY5518941,
107A_099_05_1_02,
108619s085,
1092604STDY5519042,
110708a,
111K96243,
1122604STDY5519072,
113A_107_05_2_05,
1141026b,
1152604STDY5519112,
1162604STDY5519200,
117A_202_02_1_10,
118A_202_02_1_04,
236A_161_02_1_06,
237A_161_02_1_08,
238A_161_02_1_05,
2392604STDY5518961,
240A_161_02_1_04,
241A_161_02_1_09,
2422604STDY5519324,
2432604STDY5519210,
244A_107_05_2_02,
245A_107_05_2_09,
246A_107_05_2_03,
247A_107_05_2_08,
248A_107_05_2_04,
249A_107_05_2_10,
250A_107_05_2_06,
251A_107_05_2_07,
252BPK1,
2532604STDY5519190,
254577cii,
255406E,
373A_041_05_2_08,
374A_041_05_2_07,
375A_041_05_2_05,
3762746b,
377A_175_05_2_02,
378A_175_05_2_04,
379A_175_05_2_03,
3806,
381BUPS_36_19,
382A_281_02_2_02,
383A_281_02_2_05,
384A_281_02_2_10,
385A_281_02_2_07,
386A_281_02_2_06,
387VEL,
388BUPS_11_17,
389BUPS_09_19,
390BPK2,
39135_96,
3921701

1192604STDY5519241,
120619s105,
121A_058_02_2_07,
122A_058_02_2_06,
1232604STDY5518910,
124A_058_02_2_02,
125A_058_02_2_09,
126A_058_02_2_04,
127A_058_02_2_08,
128A_058_02_2_10,
129A_058_02_2_05,
130A_099_05_2_08,
131A_099_05_2_10,
1327403
1338400
1347801
135619s004,
136619s011,
256A_064_05_2_08,
257A_064_05_2_07,
2582604STDY5518920,
259A_064_05_2_02,
260A_064_05_2_03,
261A_064_05_2_06,
262A_064_05_2_10,
263A_064_05_2_05,
264A_064_05_2_09,
265A_064_05_2_04,
266BUPS_06_14,
267A_266_02_1_06,
268A_266_02_1_02,
269111_2,
2702604STDY5519221,
2711710b,
2721710a,
27350W_S69,
3934802R,
3944802
3954811
3964811R,
397619s007,
398H10,
399NZ_LR595892_NZ_LR595893,
400H10,
401497_96,
40221_96,
4032_96,
404504_96,
405CB,
406CS,
4076__96,
408619s006,

*az azonosítók három oszlopba szedve találhatók

4-es számú függelék. Az aspirációs pneumónia eset vizsgálata során végzett cgMLST-analízisbe bevont nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* izolátumok*

14-VB00057; 14-VB00059; 14-VB00093; 14-VB00094; 14-VB00095; 16-VB00025; 16-VB00026; 16-VB00031; 16-VB00032; 16-VB00033; 16-VB00077; 16-VB00110; 16-VB00130; 16-VB00175; 16-VB00176; 16-VB00246; 16-VB00247; 17-VB00001; 17-VB00067; 17-VB00080; 17-VB00084; 17-VB00089; 17-VB00115; 17-VB00119; 17-VB00123; 17-VB00124; 17-VB00147; 17-VB00162; 17-VB00206; 17-VB00226; 17-VB00339; 22-VB00037-1; 22-VB00037-2; V917-19; V918-19; V919-19; V920-19; V921-19; V922-19; V923-19; V924-19; VN-00459; VN-10133. 920006-15; 920008-15; A110509W1; A110523Z4; A110621W3; A110704W4; A110829Z5; A110829Z6; A110912Z1; A110912Z3; A110926W4; A111010Z3; A120416W2; A120502W2; A120502Z1; A120502Z5; A120618Z1; A120716Z3; A120730Z1; A121001W1; A121001W2; A12JL36W17; A12JL36W25; A12JL36W30; A12JL36W49; A12JL36W5; A12JL36W52; A12JL36W67; A12JL36W74; A12JL36W75; A12JL36W82; A12JL36W90; A12JL36W91; A12JL36W92; A12JL4W15; A12JL4W21; A12JL4W4; A12JL4W64; A12JL4W72; A12JL4W81; A12JL4W93; A12JL5W13; A12JL5W14; A12JL5W24; A12JL5W63; A12JL5W86; A12JL5W90; A12JL5W97; P10-CHT64-05; P12-CHT68-05; P19-CHT78-07; P2-CHT15-00; P7-CHT61-04; P9-CHT63-05.

Magyarország:

Vibrio_33; Vibrio_35; Vibrio_36; Vibrio_37.

5-ös számú függelék. A metagenomikai újgenerációs szekvenálási vizsgálatba bevont légúti minták szekvenálási és minőségellenőrzési adata

Minta azonosító	Összes read	Taxon	Read Count	RPM	AdjRPM	RPM-r
Légúti-1	1 225 783	RSV-B	188 492	153 772,73	153 772,73	n.a.*
Légúti-1	1 225 783	*Pseudomonas aeruginosa*	258 088	210 549,50	210 549,26	877 290
Légúti-2	1 900 266	Influenza A vírus (H1N1)	424 881	223 590,28	223 590,28	n.a.*
Légúti-2	1 900 266	*Streptococcus pyogenes*	333 201	175 344,40	175 190,76	1 141,27
Légúti-3	1 136 338	Influenza A vírus,(H1N1)	409 756	360 593,41	360 593,41	n.a.*
Légúti-4	1 026 338	Influenza A vírus,(H3N2)	400 721	390 437,65	390 437,65	n.a.*
Légúti-5	1 236 476	Influenza A vírus,(H3N2)	341 180	275 929,33	275 929,33	n.a.*
Légúti-6	1 276 054	*Legionella pneumophila*	145 193	113 782,80	113 782,80	n.a.*
Légúti-7	1 017 478	Influenza A, (H1N1)	124 092	121 960,38	121 960,38	n.a.*
Légúti-7	1 017 478	*Haemophilus influenzae*	124 092	121 960,38	121 951,51	13 749,76
Légúti-8	1 017 478	Influenza A vírus,(H1N1)	43 179	42 437,28	42 437,28	n.a.*
Légúti-9	1 057 819	*Moraxella catarrhalis*	100 668	95 165,62	95 165,62	n.a.*
Légúti-9	1 057 819	rhinovírus A	12 892	12 187,34	12 187,34	n.a.*
Légúti-10	1 084 920	rhinovírus C	110 200	101 574,31	101 386,45	540,69
Légúti-11	1 294 261	Negatív	-	–		–
Légúti-12	1 267 274	Negatív	–	–		–
Légúti-13	1 373 257	SARS-CoV-2	764 328	556 580,45	556 566,03	38 597,81
Légúti-13	1 373 257	*Streptococcus pneumoniae*	32 122	23 391,11	23 155,26	99,18
Légúti-14	1 100 543	SARS-CoV-2	–	–		-
Légúti-15	1 347 835	SARS-CoV-2	–	–		-

Minta azonosító	Összes read	Taxon	Read Count	RPM	AdjRPM	RPM-r
Légúti-16	1 066 667	*Streptococcus suis*	106 666	100 000,00	99 961,59	2 603,49
Légúti-17	1 100 426	*Mycoplasma pneumoniae*	160 000	145 398,28	145 398,28	n.a.*
Légúti-18	1 201 568	SARS-CoV-2	169 335	140 928,24	140 913,71	9 699,12
Légúti-19	1 015 374	Negatív	–	–		–
Légúti-20	1 009 855	hAdV-B	165 400	163 785,89	163 785,89	n.a.*
Légúti-21	1 064 652	hPIV-2	23 875	22 425,17	22 425,17	n.a.*
Légúti-22	1 149 701	negatív	–	–		–
Légúti-23	1 418 118	SARS-CoV-2	91 300	64 381,10	64 366,58	4 433,96
Légúti-24	1 030 179	Negatív	–	–		–
Légúti-25	1 159 264	Rhinovírus C	198 721	171 419,97	171 419,97	n.a.*
Légúti-25	1 159 264	Rhinovírus A	123 110	106 196,69	106 196,69	n.a.*
Légúti-26	1 178 067	Influenza A vírus, (H3N2)	255 400	216 795,82	216 795,82	n.a.*
Légúti-27	1 029 227	negatív	–	–		–
Légúti-28	1 009 954	negatív	–	–		–
Légúti-29	1 057 825	SARS-CoV-2	600 110	567 305,56	567 291,13	39 314,31
Légúti-30	1 063 530	SARS-CoV-2	341 000	320 630,35	320 615,93	22 235,11
Légúti-31	1 081 242	Negatív	–	–		–
Légúti-32	1 024 373	hMPV	111 023	108 381,42	108 381,42	n.a.*
Légúti-33	1 197 504	Negatív	223 383	186 540,50		–
Légúti-34	1 031 715	SARS-CoV-2	143 200	138 798,02	138 783,60	9 625,38
Légúti-35	1 031 715	SARS-CoV-2	720 100	697 964,07	697 949,65	48 402,50
Légúti-36	1 241 536	SARS-CoV-2	722 000	581 537,71	581 523,18	40 023,24
Légúti-37	1 202 700	RSV-B	20 000	16 629,25	16 629,25	n.a.*
Légúti-38	1 265 500	hCov-HKU1	53 982	42 656,66	42 656,66	n.a.*
Légúti-39	1 086 675	hMPV	30 023	27 628,32	27 628,32	n.a.*
Légúti-39	1 086 675	Rhinovírus A	2 460	2 263,79	2 263,79	n.a.*

* az adott taxon a negatív kontrollban nem volt kimutatható (RPM = 0), ezért az RPM-r nem számítható.

6-os számú függelék. A légúti metagenomikai új-generációs szekvenálás vizsgálatba bevont minták összefoglaló adatai

	PCR (Ct érték)							mNGS				
Sorszám	Influenza A	Influenza B	SARS-CoV-2	RSV	hMPV	Adenovírus	HCoV-HKU1	mNGS eredmény	Klád	Subklád	Pangoline Nextclade	Megjegyzés
1	-	-	-	18,69	-	-	-	RSV-B +*Pseudomonas aeruginosa*	B.D.E.1			SARI
2	23	-	-	-	-	-	-	Influenza A (H1N1) + *Streptococcus pyogenes*	6B.1A.5a.2a	C.1.9.2		SARI, boncanyag fatális kimenetelű megbetegedés
3	24,97	-	-	-	-	-		Influenza A (H3N2)	3C.2a1b.2a.2a.1b	G.1.1		SARI
4	21,87	-	-	-	-	-	-	Influenza A (H3N2)	3C.2a1b.2a.2a.1b	G.1.1		SARI
5	24,97	-	-	-	-	-	-	Influenza A (H3N2)				SARI
6	-	-	-	-	-	-	-	*Legionella pneumophila*				SARI, trachea szivadék

	PCR (Ct érték)							mNGS				
Sorszám	**Influenza A**	**Influenza B**	**SARS-CoV-2**	**RSV**	**hMPV**	**Adenovírus**	**HCoV-HKU1**	**mNGS eredmény**	**Klád**	**Subklád**	**Pangoline Nextclade**	**Megjegyzés**
7	21,24	-	-	-	-	-	-	Influenza A (H1N1) + *Haemophilus influenzae*	6B.1A.5a.2a	C.1.1		SARI
8	19,96	-	-	-	-	-	-	Influneza A (H1N1)	6B.1A.5a.2a	C.1.1		SARI
9	-	-	-	-	-	-	-	*Moraxella catarrhalis*, rhinovírus A				SARI, BAL
10	-	-	-	-	-	-	-	*Streptococcus pneumoniae* + rhinovírus C				SARI
11	-	-	-	-	-	-	-	Negatív				SARI
12	-	-	-	-	29,3	-	-	Negatív				SARI

	PCR (Ct érték)							mNGS				
Sorszám	Influenza A	Influenza B	SARS-CoV-2	RSV	hMPV	Adenovírus	HCoV-HKU1	mNGS eredmény	Klád	Subklád	Pangoline Nextclade	Megjegyzés
13	-	-	26,16	-	-	-	-	SARS-CoV-2 + *Streptococcus pneumoniae*			BQ.1.1	SARI
14	-	-	28,1	-	-	-	-	SARS-CoV-2			BN.1.3	SARI
15	-	-	27	-	-	-	-	SARS-CoV-2			BQ.1.1	SARI
16	-	-	-	-	-	-	-	*Streptococcus suis*				SARI
17	-	-	-	-	-	-	-	*Mycoplasma pneumoniae*				SARI
18	-	-	28,36	-	-	-	-	SARS-CoV-2			BN.1.3	SARI
19	-	-	-	-	-	-	-	negatív				SARI
20	-	-		-	-	-	-	hADV-B				SARI
21	-	-	-	-	-	-	-	hPIV-2				SARI
22	28,01	-	-	-	-	-	-	negatív				SARI
23	-	-	28,62	-	-	-	-	SARS-CoV-2			BQ.1.1.23	SARI
24	27,14	-	-	-	-	-	-	Negatív				SARI

	PCR (Ct érték)							mNGS				
Sorszám	Influenza A	Influenza B	SARS-CoV-2	RSV	hMPV	Adenovírus	HCoV-HKU1	mNGS eredmény	Klád	Subklád	Pangoline Nextclade	Megjegyzés
25	-	-	-	-	-	-	-	Rhinovírus B				SARI
26	-	-	-	-	-	-	-	Influenza A (H3N2)	3C.2a1b.2 a.2a.1b	G.1.1		SARI
27	-	-	-	-	-	-	-	negatív				SARI
28	-	-	-	-	-	-	-	negatív				SARI
29	-	-	-	-	-	-	-	SARS-CoV-2			BN.1.3	SARI
30	-	-	-	-	-	-	-	SARS-CoV-2			BQ.1.1.23	SARI
31	-	-	-	27,34	-	-	-	negatív				SARI
32	-	-	-	-	-	-	-	hMPV				SARI
33	-	-	-	-	-	-	-	negatív				SARI
34	-	-	-	-	-	-	-	SARS-CoV-2			BQ.1.1	SARI
35	-	-	28,1	-	-	-	-	SARS-CoV-2			BQ.1.1	SARI
36	-	-	21,36	-	-	-	-	SARS-CoV-2			BN.1.3	SARI
37	-	-	-	27,36	-	-	-	negatív				SARI
38	-	-	-	-	-	-	9,47	hCoV-HKU1				SARI

	PCR (Ct érték)							mNGS				
Sorszám	**Influenza A**	**Influenza B**	**SARS-CoV-2**	**RSV**	**hMPV**	**Adenovírus**	**HCoV-HKU1**	**mNGS eredmény**	**Klád**	**Subklád**	**Pangoline Nextclade**	**Megjegyzés**
39	-	-	-	-	28,3	-	-	hMPV +rhinovírus A				SARI
40	-	-	-	-	-	-	-	*Francisella tularensis* subsp. *holarctica*				SARI
41	23,2	-	-	-	-	-	-	Influenza A (H1N1)	6B.1A.5a.2a	C.1.9.2		ANE-gyanú
42	25,1	-	-	-	-	-	-	Influenza A (H1N1)	6B.1A.5a.2a	C.1.9.2		ANE-gyanú
43	23,3	-	-	-	-	-	-	Influenza A (H1N1)	6B.1A.5a.2a	C.1.9		ANE-gyanú
44	23,5	-	-	-	-	-	-	Influenza A (H1N1)	6B.1A.5a.2a	C.1.9.3		ANE-gyanú
45	23,5	-	-	-	-	-	-	Influenza A (H1N1)	6B.1A.5a.2a	C.1.9.3		ANE-gyanú
46	22,1	-	-	-	-	-	-	Influenza A (H1N1)	6B.1A.5a.2a	C.1.9.3		ANE-gyanú

7-es számú függelék. A metagenomikai újgenerációs szekvenálási vizsgálatba bevont egyéb (nem-légúti) minták szekvenálási és minőségellenőrzési adatai

Minta azonosító	Összes read	Taxon	Read Count	RPM	AdjRPM	RPM-r
Nem-légúti-1	1 451 209	*Francisella tularensis* subsp. *holarctica*	33 378	23 000,13	22 400,13	11,26
Nem-légúti-2	1 110 002	*Bacillus anthracis*	110 020	99 116,94	98 106,94	49,3
Nem-légúti-3	1 765 230	*Rickettsia africae*	88 262	50 000,28	49 020,28	24,63
Nem-légúti-4	1 165 921	*Rickettsia typhi*	48 969	42 000,27	41 050,27	20,63
Nem-légúti-5	1 521 043	negatív	-	–	–	–
Nem-légúti-6	1 000 045	MPXV	200 009	200 000,00	198 000,00	99,5
Nem-légúti-7	1 100 236	*Streptococcus pyogenes*	165 035	149 999,64	147 999,64	74,37
Nem-légúti-8	1 000 389	*Francisella tularensis* subsp. *holarctica*	32 012	31 999,55	30 989,55	15,57
Nem-légúti-9	1 298 092	*Molluscum contagiosum vírus*	259 618	199 999,69	198 999,69	100
Nem-légúti-10	1 968 720	*Francisella tularensis*	137 810	69 999,80	68 999,80	34,67
Nem-légúti-11	1 110 650	*Leptospira santarosai*	13 328	12 000,18	12 000,18	6,03
Nem-légúti-11	1 110 650	parvoB19 vírus	22 213	20 000,00	20 000,00	10,05
Nem-légúti-11	1 110 650	torque teno vírus	133 278	120 000,00	120 000,00	60,3

Minta azonosító	Összes read	Taxon	Read Count	RPM	AdjRPM	RPM-r
Nem-légúti-12	1 000 045	orf vírus	152 007	152 000,16	152 000,16	76,38
Nem-légúti-13	1 301 000	negatív	-	–	–	–
Nem-légúti-14	1 000 087	*Cryptococcus neoformans*	4 652	4 651,60	4 651,60	2,34
Nem-légúti-15	1 000 000	*Massilia timonae*	100 010	100 010,00	100 011,00	50,26
Nem-légúti-16	1 000 000	*Acinetobacter baumannii*	4 652	4 651,60		–
Nem-légúti-17	1 000 056	Negatív	-	–	–	–
Nem-légúti-18	1 421 034	Negatív	-	–	–	–
Nem-légúti-19	1 230 121	Negatív	-	–	–	–
Nem-légúti-20	1 100 120	*Ralstonia insidiosa*	55 006	50 000,00	50 000,00	25,13
Nem-légúti-21	1 300 123	*Streptococcus pyogenes*	27 303	21 000,32	21 000,32	10,55
Nem-légúti-22	1 100 024	*Escherichia coli*	16 500	14 999,67	14 999,67	7,54
Nem-légúti-23	1 523 450	Negatív	-	–	–	–
Nem-légúti-24	1 005 681	*Escherichia coli*	26 148	26 000,29	26 000,29	13,07
Nem-légúti-25	1 000 340	Negatív	-	-	-	–
Nem-légúti-26	1 123 789	*Streptococcus pneumoniae*	114 626	101 999,57	101 999,57	51,26
Nem-légúti-27	1 000 567	*Streptococcus pneumoniae*	112 064	112 000,50	112 000,50	56,28

Minta azonosító	Összes read	Taxon	Read Count	RPM	AdjRPM	RPM-r
Nem-légúti-28	1 200 001	Negatív	-	–	–	–
Nem-légúti-29	1 104 001	Negatív	-	–	–	–
Nem-légúti-30	1 000 076	*Escherichia coli*	13 001	13 000,01	13 000,01	6,53
Nem-légúti-31	1040025	*Acinetobacter baumannii*	24 961	24 000,38	24 000,38	12,06
Nem-légúti-31	1040025	*Staphylococcus aureus*	33 281	32 000,19	32 000,19	16,08
Nem-légúti-32	1000210	*Treponema phagedenis*	6 570	6 568,62	6 568,62	3,3
Nem-légúti-33	1020250	Negatív	-	–	–	–
Nem-légúti-34	1203730	Negatív	-	–	–	–
Nem-légúti-35	1104212	Negatív	-	–	–	–
Nem-légúti-36	1200218	Negatív	-	–	–	–
Nem-légúti-37	1104212	*Spirometra erinaceieuropaei*	28 710	26 000,44	26 000,44	13,07
Nem-légúti-38	1104212	*Tropheryma whipplei*	23 188	20 999,59	20 999,59	10,55

Minta azonosító	Összes read	Taxon	Read Count	RPM	AdjRPM	RPM-r
Nem-légúti-39	1133311	*Molluscum contagiosum vírus*	135 997	119 999,72	119 999,72	60,3
Nem-Légúti-40	1 496 655	*Balamuthia mandrillaris*	10738	7 174,67	7173,1	1,00
Nem-légúti-41	2 569 946	*Balamuthia mandrillaris*	17638	42 000,27	42 000,27	3,45
Nem-légúti-42	1003946	Negatív	-	-	-	–
Nem-légúti-43	1056397	*Bacillus anthracis*	4 754	4 500,20	4 500,20	2,26
Nem-légúti-44	128576	*Mycoplasma hominis*	18 774	146 014,81	146 014,81	73,37
Nem-légúti-45	1002147	*Burkholderia multivorans*	26 056	26 000,18	26 000,18	13,07

8-as számú függelék. A nem-légúti minták metagenomikai új-generációs szekvenálás eredményei

ID	Mintatípus	Beérkezés dátuma	Eredmény	Megjegyzés
1	punktátum (nyirokcsomó)	2016	*Francisella tularensis* subsp. *holarctica*	Differenciáldiagnosztikai célból beküldve, nem múló tünetek
2	sebváladék	2018	*Bacillus anthracis*	Marhavágást követően bőranthrax tünetek, antibiotikum terápia megkezdése után beérkezett minta
3	sebváladék	2018	*Rickettsia africae*	Utazási anamnézis: Dél-Afrika
4	EDTA-s vér	2018	*Rickettsia typhi*	Utazási anamnézis: Indonézia, lázas állapot, bőrtünetek
5	hemokultúra	2021	negatív	Hajléktalan, endocarditis
6	hólyagbennék	2022	MPXV	Első MPX-megbetegdés Magyarországon
7	sebváladék	2022	*Streptococcus pyogenes*	Utazási anamnézis: Dél-Amerika
8	sebváladék	2022	*Francisella tularensis* subsp. *holarctica*	Kullancscsípést követően

ID	Mintatípus	Beérkezés dátuma	Eredmény	Megjegyzés
9	sebváladék	2024	Molluscum contagiosum vírus	HIV (*Lentivirus humimdef1* ,Human Immunodeficiency Virus, Humán immundeficiencia vírus) -pozitív beteg
10	punktátum (nyirokcsomó)	2024	*Francisella tularensis* subsp. *holarctica*	Kullancscsípést követően lázas állapot, majd nyirokcsomó-gyulladás, beolvadással járó folyamat
11	boncanyag (májszövet)	2024	*Leptospira santarosai* + parvoB19 vírus + torque teno vírus	Fatális kimenetelű megbetegedés
12	sebváladék	2024	orf vírus	Bőrelváltozás a kézen, állatkontaktus (birka)
13	biopszia (endocarditis)	2024	negatív	Ismeretlen eredetű láz
14	CSF	2024	*Cryptococcus neoformans*	Visszatérő neurológiai tünetek, immunszuppresszió nélkül
15	CSF	2024	*Massilia timonae*	Neurológiai tünetek
16	CSF	2024	*Massilia timonae* + *Acinetobacter baumannii*	Neurológiai tünetek

ID	Mintatípus	Beérkezés dátuma	Eredmény	Megjegyzés
17	CSF	2024	Negatív	Neurológiai tünetek
18	CSF	2024	Negatív	Neurológiai tünetek
19	CSF	2024	Negatív	Neurológiai tünetek
20	CSF	2024	*Ralstonia insidiosa*	Neurológiai tünetek
21	CSF	2024	*Streptococcus pyogenes*	Neurológiai tünetek
22	CSF	2024	*Escherichia coli*	Neurológiai tünetek
23	CSF	2024	Negatív	Neurológiai tünetek
24	CSF	2024	*Escherichia coli*	Neurológiai tünetek
25	CSF	2024	Negatív	Neurológiai tünetek
26	CSF	2024	*Streptococcus pneumoniae*	Neurológiai tünetek
27	CSF	2024	*Streptococcus pneumoniae*	Neurológiai tünetek
28	CSF	2024	Negatív	ANE-gyanú
29	CSF	2024	Negatív	ANE-gyanú
30	CSF	2024	*Escherichia coli*	Neurológiai tünetek

ID	Mintatípus	Beérkezés dátuma	Eredmény	Megjegyzés
31	CSF	2024	*Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus*	Neurológiai tünetek
32	CSF	2024	*Treponema phagedenis*	Neurosyphilis gyanújával beküldött minta
33	CSF	2024	Negatív	ANE-gyanú
34	CSF	2024	Negatív	ANE-gyanú
35	CSF	2024	Negatív	ANE-gyanú
36	CSF	2025	Negatív	ANE- gyanú
37	biopszia (agyszövet)	2025	*Spirometra erinaceieuropaei*	Szeméttelepen dolgozó, agytályoggal kezelt beteg
38	vékonybél biopszia	2025	*Tropheryma whipplei*	Krónikus megbetegedés, PAS festés vetette fel a gyanút
39	sebváladék	2025	Molluscum contagiosum vírus	Immunszupprimált beteg nem múló bőrtünetek
40	CSF	2025	*Balamuthia mandrillaris*	Fatális kimenetelű megbetegedés, egy beteg két különböző mintája
41	boncanyag (agyszövet)	2025	*Balamuthia mandrillaris*	

ID	Mintatípus	Beérkezés dátuma	Eredmény	Megjegyzés
42	szaruhártya-kaparék	2025	Negatív	Újszülött gyermeknél tapasztalt látásromlás
43	sebváladék	2025	*Bacillus anthracis*	Marhavágást követően bőranthrax tünetek, antibiotikum terápia megkezdezése után beérkezett minta
44	fülváladék	2026	*Mycoplasma hominis*	A beteg CSF mintájában *Burkholderia multivorans* volt kimutatható. A beteg fülváladékából *Mycoplasma hominis* volt azonosítható
45	CSF	2026	*Burkholderia multivorans*	

9-es számú függelék. A vizsgálatba bevont nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* izolátumok genomikai jellemzői

Izolátum azonosítója	Genomméret (Mb)	Az összeállított genom átlagos lefedettsége (×)
VC-84	3.9	94
VC-83	4.1	138
VC-82	4.0	179
VC-81	4.1	130
VC-80	4.0	73
VC-79	4.2	100
VC-78	3.9	93
VC-75	3.8	190
VC-71	4.0	132
VC-70	3.9	75
VC-69	4.0	65
VC-67	4.1	69
VC-66	4.1	116
VC-65	4.1	51
VC-64	4.1	69
VC-63	4.1	55
VC-62	4.1	85
VC-61	4.1	110
VC-60	4.1	91
VC-51	4.0	149
VC-47	4.0	179
VC-39	4.0	178
VC-33	4.0	125
VC-06	3.8	136
VC-05	3.9	142