Genomikai módszerek alkalmazása ismeretlen etiológiájú és emerging fertőző betegségek diagnosztikájában

Doktori értekezés tézisei

Henczkó Judit

Semmelweis Egyetem Doktori Iskola

Egészségtudományi Tagozat

Témavezető: Dr. Kis Zoltán, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Kádár Béla, Ph.D.

Dr. Jakab Szilvia, Ph.D.

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

1. Bevezetés

1.1 A klinikai metagenomika diagnosztikai jelentősége

A klinikai metagenomikai újgenerációs szekvenálás (mNGS) elsősorban ismeretlen etiológiájú, súlyos vagy atípusos fertőzésekben jelenthet diagnosztikai többletértéket, amikor a hagyományos mikrobiológiai és célzott molekuláris vizsgálatok nem vezetnek eredményre, illetve a lehetséges kórokozók köre előzetesen nem határozható meg. Klinikai alkalmazhatóságát nagyszámú beteganyagon végzett kohorszvizsgálatok is alátámasztották. Wilson és munkatársai prospektív, multicentrikus vizsgálatában az mNGS 13 esetben elsőként azonosította a központi idegrendszeri fertőzés kórokozóját, míg Benoit és munkatársai 4828 CSF-minta elemzésével 697 fertőzést igazoltak, köztük olyan ritka ágenseket, mint a coloradoi kullancsláz vírusa, a *Yersinia pestis* és a *Balamuthia mandrillaris*. Közösségben szerzett pneumonia (CAP) esetén a konvencionális módszerek az esetek mindössze mintegy 33–50%-ában képesek tisztázni az etiológiát, míg egy 240 beteg bevonásával végzett vizsgálatban az mNGS 89%-os pozitivitási arányt ért el a konvencionális eljárások 25,73%-os eredményével szemben. Az mNGS előzetesen megkezdett antibiotikum-kezelés mellett, valamint nehezen tenyészthető vagy intracelluláris kórokozók esetében is eredményes lehet. A negatív mNGS-eredmény ugyanakkor nem zárja ki a fertőzést, különösen alacsony kórokozó-terhelés, nem megfelelő mintatípus, illetve immunmediált vagy posztinfekciós kórfolyamat esetén. Mivel a célzott diagnosztikai rendszerek csak előre ismert ágenseket képesek felismerni, egy új, zoonotikus eredetű, rekombináns vagy jelentősen megváltozott kórokozó megjelenésekor a diagnózis késhet vagy elmaradhat, míg az mNGS lehetőséget biztosít a váratlan mikrobiális szekvenciák felismerésére és az ismeretlen genomok jellemzésére. Az emerging fenyegetések nem kizárólag virális eredetűek: a zoonotikus és környezeti baktériumok, valamint a ritka, magas biológiai kockázatú ágensek, például a *Bacillus anthracis*, a *Yersinia pestis*, a *Francisella tularensis*, a *Burkholderia pseudomallei*, továbbá a *Brucella* és *Rickettsia* fajok, illetve a nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* nem specifikus klinikai tüneteket okozhatnak, és alacsony prevalenciájuk miatt felismerésük késhet. Az mNGS tenyésztéstől függetlenül jelezheti jelenlétüket, ezáltal elősegítheti a célzott megerősítő vizsgálatok, a biológiai biztonsági intézkedések és a járványügyi kivizsgálás gyors megkezdését. Eredményei azonban csak megfelelő kontrollok alkalmazásával, valamint a klinikai és epidemiológiai adatokkal együtt értékelhetők. A klinikai metagenomika és a genomikai surveillance integrációja ezért az emerging kórokozók korai felismerésének, a Disease X-re való felkészülésnek, valamint a pandémiás és biológiai

veszélyhelyzetekre adott gyors közegészségügyi válasznak egyik stratégiai eszköze lehet.

1.2 *Burkholderia pseudomallei*

A *Burkholderia pseudomallei* a melioidosis kórokozója, a *B. pseudomallei* komplex tagja. A 3-as kockázati csoportba tartozó, nagy alkalmazkodóképességű környezeti baktérium elsősorban talajban, felszíni vizekben és nedves környezetben fordul elő, ahol hosszú ideig életképes maradhat. Fő endémiás területei Délkelet-Ázsia és Észak-Ausztrália, de jelenlétét egyre több földrajzi régióban igazolják. Európában a megbetegedések döntően utazással összefüggő, importált esetekként jelentkeznek. A melioidosis klinikai megjelenése rendkívül változatos, ezért a betegséget gyakran „nagy imitátornak" nevezik. A fertőzés a lokalizált bőr- és lágyrészfolyamattól a pneumonián és a különböző tályogokon keresztül a fulmináns szepszisig terjedhet. Leggyakrabban a tüdőt, a bőrt, a májat, a lépet és a prosztatát érinti. A neurológiai érintettség az egyik legritkábban előforduló forma. A megbetegedés legfontosabb hajlamosító tényezői a diabetes mellitus, a krónikus vesebetegség, a jelentős alkoholfogyasztás és az immunszuppresszió. A *B. pseudomallei* megközelítőleg 7,2 Mb méretű genomja két kromoszómából áll, és nagyfokú genetikai rekombináció, valamint változatos genomikai szigetek jelenléte jellemzi. A nagyobb kromoszóma elsősorban az alapvető sejtműködéshez szükséges géneket, míg a kisebb kromoszóma nagyobb arányban a környezeti alkalmazkodással és járulékos funkciókkal összefüggő géneket hordozza. A genomikai szigetek, profágok és integratív konjugatív elemek hozzájárulhatnak a baktérium genetikai változatosságához, környezeti adaptációjához, virulenciájához és antimikrobiális rezisztenciájához. A patogenezis meghatározó eleme a fakultatív intracelluláris életmód. A baktérium a gazdasejtbe jutást követően a 3-as típusú szekréciós rendszer (T3SS) segítségével kiszabadul a vakuólumból, majd a citoplazmában szaporodik. A Burkholderia intracelluláris mozgási fehérje A (BimA) által közvetített aktinpolimerizáció lehetővé teszi az intracelluláris mozgást és a sejtről sejtre történő terjedést, míg a 6-os típusú szekréciós rendszer (T6SS) a többmagvú óriássejtek kialakulásához és az intracelluláris perzisztenciához járul hozzá. A poliszacharid tok, a lipopoliszacharid, a T3SS és T6SS komponensei, az adhéziós faktorok, valamint további toxinok és effektorfehérjék együttesen segítik az immunválasz elkerülését, a szöveti terjedést és a hematogén disszeminációt. A *bim*A gén *B. mallei*-szerű, *bim*A_{Bm} variánsát a neurológiai melioidosis gyakoribb előfordulásával hozták összefüggésbe. Az LPS-, a belső transzkribált spacer régió (ITS)-, valamint Yersinia-szerű fimbria (YLF) és *Burkholderia thailandensis*-szerű flagellum és kemotaxis (BTFC)-típusok földrajzi megoszlása epidemiológiai információt is hordozhat, de a gyakori rekombináció és homoplázia miatt a törzsek rokonsági viszonyainak pontos meghatározásához teljesgenom-alapú elemzés szükséges. A genomikai eredmények az epidemiológiai adatokkal együtt támogatják az importált esetek elkülönítését, a

földrajzi eredet valószínűsítését és az esetleges terjedési kapcsolatok vizsgálatát. Magyarországon a melioidosis nem tartozik az egyedileg jelentendő fertőző betegségek közé, ugyanakkor a *B. pseudomallei* szerepel a 18/1998. (VI. 3.) NM rendelet 6. számú mellékletében. Ez szintén alátámasztja a megfelelő referencia-laboratóriumi és biológiai biztonsági kapacitás fenntartásának szükségességét.

1.3 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* infekciók azonosítása Magyarországon

A *Vibrio cholerae* természetes élőhelyét az édesvízi, brakkvízi, torkolati és part menti tengeri környezetek jelentik. Előfordulását alapvetően befolyásolja a víz hőmérséklete és sótartalma, ezért a felszíni vizek melegedése kedvezhet a *Vibrio* fajok felszaporodásának és földrajzi terjedésének. Európában az elmúlt években emelkedett a vibriózisok száma, és a tengervízzel vagy tengeri eredetű élelmiszerekkel összefüggő esetek mellett egyre több, édesvízi expozícióhoz kapcsolódó fertőzést is leírtak. A klímaváltozás, a globális élelmiszer-kereskedelem és az immunkárosodott populáció növekedése egyaránt hozzájárulhat e kórokozók növekvő közegészségügyi jelentőségéhez. A *V. cholerae*-nak több mint 200 szerocsoportja ismert. A pandémiás kolerát elsősorban a koleratoxint termelő O1 és O139 törzsek okozzák, míg a nem-O1, nem-O139 *V. cholerae* (NTVC) izolátumok többsége nem hordozza a klasszikus kolera kialakulásához szükséges *ctx*AB géneket. A koleratoxin hiánya azonban nem jelenti azt, hogy ezek a törzsek apatogének. Az NTVC-k gastrointestinalis fertőzések mellett seb- és lágyrészfertőzést, otitist, húgyúti infekciót, bakteriémiát, szepszist, valamint ritka extraintestinalis megbetegedéseket, például aspirációs pneumoniát is okozhatnak. A *V. cholerae* két cirkuláris kromoszómából álló, nagy plaszticitású genommal rendelkezik, amelyet intenzív rekombináció és horizontális géntranszfer jellemez. Nyitott pángenomjában az alapvető sejtműködéshez szükséges konzervált gének mellett jelentős és törzsenként változó járulékos génkészlet található. Ez utóbbi számos környezeti adaptációs, virulencia- és antimikrobiális rezisztencia-determinánst hordozhat. Az NTVC-törzsek patogenitása összetett, és nem köthető egyetlen virulenciamarkerhez. A gyakrabban előforduló tényezők közé tartozik a *hly*A gén által kódolt hemolizin A, a multifunkcionális, önfeldolgozó, ismétlődő szekvenciákat tartalmazó (MARTX/RTX) toxinrendszer, a cholix toxin, a HapA hemagglutinin/proteáz, a 3-as és 6-os típusú szekréciós rendszer, valamint a különböző vasfelvételi mechanizmusok. A hemolizin és az RTX-rendszer közvetlen sejtkárosító hatást fejthet ki, míg a szekréciós rendszerek az immunválasz befolyásolásában, a kolonizációban és a baktérium túlélésében játszhatnak szerepet. A *feo*ABC operon által kódolt ferrovasfelvételi rendszer különösen fontos lehet a gazdaszervezet vasban szegény környezetében, és hozzájárulhat az invazív fertőzések kialakulásához. Magyarországon a 18/1998. (VI. 3.) NM rendelet alapján a *V. cholerae* klinikai izolátumait fajazonosítás és toxintermelő képesség vizsgálata céljából a mindenkori referencia laboratóriumba kell továbbítani. A teljesgenom-

szekvenálás részletes jellemzést tesz lehetővé, mivel alkalmas a klinikai és környezeti izolátumok rokonsági kapcsolatainak megállapítására, a fertőzési források vizsgálatára, valamint a virulencia- és rezisztenciadeterminánsok egyidejű elemzésére. Különösen fontos szerepe lehet a toxintermelő és nem toxintermelő vonalak elkülönítésében, az emerging klónok korai felismerésében és a környezeti, klinikai és epidemiológiai adatok integrált értékelésében. Az NTVC növekvő közegészségügyi jelentősége indokolja a humán és környezeti izolátumokra egyaránt kiterjedő genomikai surveillance fejlesztését.

2. Célkitűzések

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

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 multilókusz szekvencia tipizálást (MLST), core genom MLST (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 *V.cholerae* törzsek virulencia- és rezisztenciaprofiljára, valamint genetikai rokonsági viszonyaira.

3. Módszerek

3.1 Klinikai metagenomikai vizsgálatok

3.1.1 Légúti metagenomikai vizsgálatok

A pilotvizsgálatba a 2018 és 2025 közötti időszakban, a hazai súlyos akut légúti fertőzések surveillance-rendszerének keretében az NNGYK Légúti Vírusok Nemzeti Referencia Laboratóriumába beérkezett 46 klinikai minta került bevonásra. A minták kiválasztása előre meghatározott klinikai és epidemiológiai szempontok alapján történt. A beválasztás során figyelembevételre került a megbetegedés súlyossága és kimenetele, az elhúzódó vagy krónikussá váló fertőzés lehetősége, az utazási anamnézis, a zoonotikus eredet gyanúja, valamint a folyamatban lévő járványügyi vizsgálatok. A minták között 43 nasopharyngealis törlet, továbbá egy-egy trachea aspirátum, bronchoalveoláris lavage és légúti boncanyag szerepelt. A metagenomikai eredmények összehasonlítása a surveillance-rendszer keretében korábban elvégzett multiplex légútivírus-PCR-vizsgálatok eredményeivel történt.

3.1.2 Egyéb, nem légúti metagenomikai vizsgálatok

A nem légúti vizsgálati csoportba 45, potenciálisan súlyos, ismeretlen etiológiájú megbetegedésből származó, sürgős metagenomikai vizsgálatra beküldött klinikai minta került beválasztásra. Ezek közül 25 CSF, 8 sebváladék, 3 biopszia- köztük egy vékonybél-biopszia-, 2 nyirokcsomó-punktátum, 2 boncanyag, továbbá egy-egy EDTA-val alvadásgátolt teljes vér, hemokultúra, hólyagbennék, corneakaparék és fülváladék volt.

3.1.3 A légúti minták metagenomikai újgenerációs szekvenálása

A légúti minták centrifugálása 1200 × *g*-n, 10 percen keresztül történt, majd a sejtes frakció a humán sejtek lízise céljából 4%-os végkoncentrációjú szaponinnal került kezelésre. A felszabaduló gazdaeredetű nukleinsav eltávolítása HL-SAN nukleáz alkalmazásával, 37 °C-on végzett inkubáció során történt. Ezt követően a minták PBS-sel kerültek mosásra, majd a pelletből a nukleinsav-izolálás Chemagic 360 automatizált rendszerrel és Chemagic Viral DNA/RNA kittel történt. Az RNS-genommal rendelkező kórokozók kimutatásához random SISPA AB primerek jelenlétében LunaScript reverz transzkripció került alkalmazásra. Az RNS–DNS hibridek bontása RNáz H enzimmel, a második DNS-szál szintézise pedig Sequenase 2.0 DNS-polimerázzal történt. A SISPA-A termék nem szelektív amplifikációjára AccuTaq DNS-polimerázzal, SISPA-B primer jelenlétében végzett PCR alkalmazásával került sor. Az amplifikációs termékek tisztítása 1:1 arányban AMPure XP mágneses gyöngyökkel történt. A szekvenálás Illumina MiSeq platformon, 2 × 150 bp-os paired-end elrendezésben, MiSeq V2 kémiával történt, mintánként legalább egymillió szekvenciaolvasat előállításával.

3.1.4 Az egyéb klinikai minták metagenomikai újgenerációs szekvenálása

A nem légúti minták párhuzamos DNS- és RNS-metagenomikai feldolgozása történt. A DNS-metagenom előállításához, a gazdaeredetű nukleinsav mennyiségének csökkentésére és a mikrobiális DNS izolálására MolYsis Ultra-Deep Microbiome kit került alkalmazásra. A kivont DNS dúsítása REPLI-g Midi kit és φ29 DNS-polimeráz segítségével, 30 °C-on, 16 órán keresztül végzett többszörös szálkiszorításos amplifikációval történt. Az amplifikált DNS tisztítására AMPure XP mágneses gyöngyökkel, elágazásmentesítésére T7 endonukleázzal került sor, majd ismételt koncentrálás és tisztítás történt. Az RNS-metagenom előállításához a nukleinsav izolálása QIAamp Viral RNA kittel, a DNS eltávolítása pedig TURBO DNase enzimmel történt. A humán riboszomális RNS mennyiségének csökkentésére RiboCop kit került alkalmazásra, ezt követően pedig a reverz transzkripció és a nem szelektív amplifikáció a légúti mintáknál ismertetett SISPA AB eljárással történt. A könyvtárkészítés előtt a kettős szálú DNS koncentrációja Qubit HS módszerrel került meghatározásra. A szekvenálás Oxford Nanopore GridION vagy MinION Mk1C platformon történt. 200 ng alatti nukleinsavmennyiség esetén Rapid Barcoding, 200 ng feletti kiindulási nukleinsavmennyiség esetén pedig Native Barcoding könyvtárkészítő kit került alkalmazásra. A futási idő 72 óra volt, a minimális minőségi küszöbérték pedig Q9-ben került meghatározásra. A bázishívás nagy pontosságú beállítással, 2024-ig Guppy, 2025-től pedig Dorado szoftverrel történt.

3.1.5 A szekvenciaadatok bioinformatikai elemzése

Az Illumina-szekvenciák adaptereltávolítása és minőségszűrése Trimmomatic v0.39 programmal történt. Az alacsony minőségű bázisok eltávolításához LEADING:3, TRAILING:3 és SLIDINGWINDOW:4:20 paraméterek kerültek alkalmazásra, az 50 bázisnál rövidebb olvasatok pedig kizárásra kerültek. A Nanopore-adatok minőségellenőrzése Nanoq v0.10.0 programmal történt. A taxonómiai besoroláshoz Kraken2 algoritmus került alkalmazásra. Az Illumina-platformon vizsgált légúti minták esetében a core-nt, a Nanopore-platformon szekvenált nem légúti minták esetében pedig az nf-core referencia-adatbázis került alkalmazásra. A Kraken2 által meghatározott taxonok megerősítése és a fajszintű besorolás specificitásának növelése CCMetagen-elemzéssel történt. A további értékelés során kizárólag a megfelelő minőségű, egyértelműen hozzárendelhető és a CCMetagen-elemzéssel is megerősített találatok kerültek figyelembevételre. A minták eltérő szekvenálási mélységének kiegyenlítése érdekében a taxonspecifikus olvasatszámok egymillió minőségszűrt olvasatra kerültek normalizálásra: RPM = (taxonspecifikus olvasatok száma / összes minőségszűrt olvasat száma) × 10^6. Minden szekvenálási sorozatban negatív folyamatkontroll került alkalmazásra. A reagens- és környezeti háttér figyelembevételéhez háttérkorrigált RPM-érték került kiszámításra: AdjRPM = max(0, RPM_minta − RPM_negatív kontroll). A légúti minták pozitív értékelésének feltétele legalább

10 taxonspecifikus olvasat, CCMetagen-megerősítés és a negatív kontrollhoz viszonyított dúsulás volt. A negatív kontrollban is jelen lévő taxonok esetében az RPM-r érték is meghatározásra került; a legalább tízszeres dúsulás, vagyis az RPM-r ≥ 10 érték erős bioinformatikai jelnek minősült. Mivel a bioinformatikai jel önmagában nem jelentett klinikai pozitivitást, a végleges értékelés során a mintatípus, a kórokozó ismert patogenitása és a klinikai adatok is figyelembevételre kerültek.

3.1.6 Illesztés, konszenzusszekvencia-készítés és variánsanalízis

A potenciálisan pozitív találatok referencia-genomhoz történő illesztése CLC Genomics Workbench v12 szoftverrel történt, majd megfelelő minőségű adatok esetén konszenzusszekvencia került előállításra. Az influenza A- és B-vírusok, az RSV, a SARS-CoV-2 és a humán metapneumovírus kládjának és leszármazási vonalának meghatározása Nextclade v3.21.0 programmal történt. A lehetséges antivirális rezisztenciával vagy virulenciával összefüggő mutációk elemzéséhez influenza esetében FluSurver, RSV esetében RSVsurver, SARS-CoV-2 esetében pedig CoVsurver került alkalmazásra, majd a találatok összevetése vírus-specifikus rezisztencia-adatbázisokkal történt.

3.1.7 A metagenomikai eredmények klinikai interpretációja

Az értékelés során figyelembevételre került a taxonómiai azonosítás megbízhatósága, a mikroorganizmus ismert patogenitása és az adott mintatípusban betöltött jelentősége, a referencia-genom lefedettségének mértéke és mélysége, a negatív kontroll eredménye, valamint a rendelkezésre álló tenyésztési, célzott PCR- és szerológiai vizsgálatok eredménye. Az alapvetően steril mintákban, például CSF-ben, vérben vagy más steril testfolyadékban az ismert patogének alacsonyabb olvasatszám, vagy AdjRPM mellett is potenciálisan relevánsnak minősültek, amennyiben a negatív kontrollban nem voltak kimutathatók, és jelenlétük összhangban állt a klinikai képpel. Nem steril mintákban a fiziológiás mikrobiota és a kolonizáció lehetősége miatt kizárólag a legalább 10 taxonspecifikus olvasattal rendelkező, taxonómiailag megerősített találatok kerültek további értékelésre. A végleges diagnosztikai interpretáció minden esetben a bioinformatikai eredmények, a beteg klinikai állapota, immunstátusza és a hagyományos mikrobiológiai eredmények integrált, mikrobiológus és kezelőorvos közötti konszenzusos értékelésén alapult.

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

3.2.1 *Burkholderia pseudomallei*

A referencia-laboratóriumba 2008 és 2024 között három, melioidosis gyanújával összefüggő bakteriális izolátum érkezett kórházi mikrobiológiai laboratóriumokból megerősítő vizsgálatra. Ezek közül kettő *B. pseudomallei*-nak, egy pedig *Pseudomonas aeruginosa*-nak bizonyult. A további molekuláris és

genomikai vizsgálatokba a két megerősített *B. pseudomallei* izolátum került bevonásra. Az élő tenyészetekkel végzett munka az NNGYK Nemzeti Biztonsági Laboratórium BSL-3 laboratóriumában történt. A szelektív tenyésztéshez Ashdown-agar, a teljesgenom-szekvenálás előtti tenyésztéshez Luria–Bertani-agar került alkalmazásra. A lemezek 37 °C-on, 5% szén-dioxidot tartalmazó légkörben 48 órán keresztül inkubálódtak. A tiszta tenyészetek a további vizsgálatokig –80 °C-on kerültek tárolásra.

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

A vizsgálatba a referencia-laboratóriumba 2018 és 2025 között érkezett 25 klinikai *V. cholerae* izolátum került bevonásra. A mintagyűjtemény feltételezett hazai eredetű, valamint utazással összefüggő fertőzésekből származó izolátumokat egyaránt tartalmazott. A klinikai törzsek mellett három, természetes fürdővízből származó környezeti NTVC-izolátum vizsgálatára is sor került. Ezek egy fulladásközeli eseményt követően kialakult aspirációs pneumonia feltételezett expozíciós helyéről származtak. A környezeti vízmintavételt akkreditált laboratórium végezte 2023 augusztusában, egy héttel az expozíciót követően. A minta levétele steril palackba, mintavevő rúd alkalmazásával, 30 cm-es vízmélységből történt. A helyszínen meghatározásra került a víz hőmérséklete, elektromos vezetőképessége, pH-ja és oldottoxigén-tartalma. A vízmintából 1–100 mL közötti térfogatok kerültek átszűrésre 0,45 µm pórusméretű membránokon. A membránok TCBS- és Vibrio ChromoSelect agar felületére kerültek, majd inkubálásuk 37 °C-on, aerob körülmények között, 24 órán keresztül történt. A jellegzetes telepek megszámlálását követően az eredmények CFU/100 mL formában kerültek megadásra, a kiválasztott izolátumokból pedig további vizsgálatok céljára tiszta tenyészetek készültek. A klinikai és környezeti izolátumok teljesgenom-szekvenálást megelőző tenyésztése Luria–Bertani agaron, 37 °C-on, aerob körülmények között, 24 órán keresztül történt.

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

Az izolátumok tisztaságának ellenőrzése és előzetes fajazonosítása Bruker MALDI-TOF MS rendszerrel, az aktuálisan elérhető standard referencia-adatbázis alkalmazásával történt. A biológiai biztonsági kockázat csökkentése érdekében a *B. pseudomallei* izolátumok trifluorecetsavas inaktiválására a BSL-3 szintű laboratóriumban került sor, amelyet a tömegspektrometriás azonosítás követett. A *V. cholerae* izolátumok esetében közvetlen átviteli MALDI-TOF MS módszer került alkalmazásra. A fajazonosítás eredménye mindkét kórokozó esetében molekuláris vizsgálattal került megerősítésre.

3.4 Molekuláris megerősítő vizsgálatok

3.4.1 A *Burkholderia pseudomallei* molekuláris vizsgálata

Az izolátumokból történő DNS-kivonás QIAamp DNA Mini kittel történt. A *B. pseudomallei* fajspecifikus megerősítéséhez a 3-as típusú szekréciós rendszerhez kapcsolódó *orf2* gén kimutatására irányuló TaqMan valós idejű PCR-vizsgálat került alkalmazásra. A minták vizsgálata két párhuzamos reakcióban, LightCycler 2.0 készüléken történt. A 95 °C-on végzett, 10 perces kezdeti denaturációt 50 ciklus követte, ciklusonként 95 °C-on 25 másodperces denaturációval, majd 63 °C-on egyperces kapcsolódási és amplifikációs lépéssel. A qPCR-vizsgálat mindkét izolátum esetében elvégzésre került a tenyésztéses és MALDI-TOF MS-alapú azonosítás megerősítése céljából.

3.4.2 A nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* molekuláris vizsgálata

A *V. cholerae* izolátumokból történő DNS-kivonás szintén QIAamp DNA Mini kittel történt. A fajszintű azonosításhoz az *ompW* gén kimutatására tervezett kereskedelmi valós idejű PCR-vizsgálat került alkalmazásra LightCycler 2.0 vagy LightCycler 480 készüléken. A 95 °C-on végzett, 10 perces kezdeti denaturációt 50 ciklus követte, ciklusonként 95 °C-on 10 másodperces denaturációval, majd 60 °C-on egyperces kapcsolódási és amplifikációs lépéssel. Az *omp*W marker alkalmas a *V. cholerae* fajszintű megerősítésére, azonban a szerocsoport és a toxintermelő képesség meghatározására önmagában nem használható. A klasszikus koleratoxint termelő izolátumok azonosítása, illetve kizárása céljából a koleratoxin A alegységét kódoló *ctx*A gén kimutatására irányuló, saját fejlesztésű TaqMan qPCR-vizsgálat került alkalmazásra. A 94 °C-on végzett, kétperces kezdeti denaturációt 50 ciklus követte, ciklusonként 94 °C-on 10 másodperces denaturációval, majd 63 °C-on egyperces kapcsolódási és amplifikációs lépéssel. Az *omp*W-pozitív, de *ctx*A-negatív izolátumok a szerológiai és teljesgenom-szekvenálási eredmények együttes figyelembevételével NTVC-törzsekként kerültek értékelésre.

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

A teljesgenom-szekvenáláshoz az izolátumok DNS-ének tisztítása QIAamp DNA Mini kittel történt, a nukleinsav-koncentráció meghatározására pedig Qubit Flex készülék és dsDNA High Sensitivity módszer került alkalmazásra. A genomi könyvtárak Illumina DNA Prep kittel készültek, majd Illumina MiSeq vagy NextSeq 550 platformon, 2 × 150 bp-os paired-end elrendezésben kerültek szekvenálásra. A nyers szekvenciaadatok minőségének ellenőrzése FastQC v0.12.0 programmal történt. A 20 alatti Phred-minőségű olvasatok eltávolításra kerültek; a minőségalapú trimmelés Trimmomatic v0.39, a *de novo* genomszerelés pedig SPAdes v3.15.3 szoftverrel, a *careful* opció alkalmazásával történt. A szerelt genomok strukturális és funkcionális annotációjához Bakta v1.11.3 program és RAST szerver került alkalmazásra, míg a CRISPR–Cas rendszerek vizsgálata

CRISPRCasFinder v2.0.3 segítségével történt. A virulenciagének meghatározásához a Ridom SeqSphere+ v8.0 és a MyDBFinder 2.0 program, valamint a Virulence Factor Database referenciaszekvenciái kerültek alkalmazásra. Pozitív találatként a 90%-nál nagyobb nukleotidszekvencia-azonosságot és 100%-os génlefedettséget mutató gének kerültek elfogadásra. Az antimikrobiálisrezisztencia-gének azonosításához a CARD és a ResFinder adatbázisok kerültek alkalmazásra; az értékelés során a legalább 80%-os lefedettséggel és 75%-nál nagyobb szekvenciaazonossággal rendelkező találatok kerültek figyelembevételre. A két *B. pseudomallei* izolátum genomikai tipizálása MLST- és cgMLST-alapú módszerekkel történt. Az *in silico* MLST során az *ace* (acetil-koenzim-A-acetiltranszferáz), *glt*B (a glutamát-szintáz nagy alegysége), *gmhD* (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 került meghatározásra. A cgMLST-elemzéshez a korábban publikált *B. pseudomallei* séma került alkalmazásra, amelynek során a két magyar izolátum összehasonlítása az Egyesült Államok Nemzeti Biotechnológiai Információs Központjának (NCBI) adatbázisából letöltött 410 genommal történt. Referenciaként a K96243 törzs genomja került felhasználásra. A szélesebb populációgenetikai összefüggések értékelésébe a PubMLST adatbázisban elérhető 7510 izolátum adatai is bevonásra kerültek. A rokonsági kapcsolatok minimális feszítőfával kerültek szemléltetésre, a hiányzó allélok pedig a távolságszámítás során figyelmen kívül maradtak. Az elemzés Ridom SeqSphere+, az ábrázolás pedig iTOL és GrapeTree programmal történt. A *V. cholerae* izolátumok közötti genetikai kapcsolatok vizsgálatához a saját laboratóriumban létrehozott, 2415 definiált lókuszból álló cgMLST-séma került alkalmazásra. A szekvenciatípusok meghatározása a PubMLST adatbázis alapján, a teljes genomok összehasonlítása pedig a Genome Comparator modul alkalmazásával történt. Az allélprofilok alapján MSTree V2 algoritmussal minimális feszítőfa készült. Az aspirációs pneumonia klinikai és környezeti izolátumainak szélesebb körű összehasonlító elemzésébe az NCBI adatbázisából kiválasztott 101 NTVC-genom került bevonásra, különös tekintettel a Magyarországgal szomszédos országokból származó törzsekre. Az elemzés lehetővé tette a klinikai és környezeti izolátumok közötti kapcsolat, valamint a vizsgált törzsek tágabb nemzetközi genomikai környezetének meghatározását.

3.6 Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzések GraphPad Prism szoftverrel (10.5.0 verzió; GraphPad Software, San Diego, USA) készültek. Az adatok feldolgozása során elsősorban leíró statisztikai módszerek kerültek alkalmazásra. A kategorikus változók jellemzése abszolút esetszámmal és százalékos aránnyal, míg a folytonos változóké - azok eloszlásától függően-átlag ± szórás, illetve medián és tartomány formájában történt. A klinikai metagenomikai vizsgálatok eredményeinek értékelése során meghatározásra kerültek a pozitivitási arányok, a kimutatott

mikroorganizmusok taxonómiai megoszlása, valamint az egyes mintatípusokban azonosított, klinikailag releváns kórokozók gyakorisága. A célzott multiplex PCR- és az mNGS-eredmények összehasonlítása kizárólag a PCR-panelben szereplő légúti vírusokra terjedt ki. A két módszer közötti pozitív egyezés kórokozónként, a PCR-pozitív minták közül az mNGS-sel is pozitívnak bizonyult minták arányaként került meghatározásra. 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 próba került alkalmazásra. A statisztikai szignifikancia határértéke $p < 0,05$ volt.

4. Eredmények

4.1 Klinikai metagenomikai vizsgálatok eredményei

4.1.1 Légúti minták metagenomikai vizsgálata

Az mNGS 36 mintában (78,3%) azonosított legalább egy potenciálisan klinikailag releváns kórokozót, míg 10 minta (21,7%) negatív eredményt adott. 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 rhinovírusok (n = 4), a hMPV (n = 2), valamint egy-egy RSV-B, hAdV-B, hPIV-2 és hCoV-HKU1. A vizsgálat során hét esetben merült fel koinfekció lehetősége, 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. A célzott PCR-panel és az mNGS esetében az összehasonlítás kizárólag a PCR-panelben szereplő légúti vírusokra terjedt ki. 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 kórokozók nem tekinthetők diszkordáns eredménynek a két módszer összehasonlítása során. 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 kórokozók kerültek azonosításra, köztük *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, *Moraxella catarrhalis*, hAdV-B, hPIV-2, rhinovírusok és hCoV-HKU1. 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), BQ.1.1 (n = 4) és BQ.1.1.23 (n = 2) leszármazási vonalak voltak azonosíthatók, amelyek megfeleltek a mintavételi időszakban Magyarországon és Európában domináló omikronvariánsoknak. 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. Az akut nekrotizáló encephalopathia (ANE) iránydiagnózisával vizsgált hat betegtől összesen hat légúti és hat CSF-minta került metagenomikai vizsgálatra. Mind a hat légúti mintában kimutatható volt az influenza A(H1N1)pdm09 vírus; a vírusok a 6B.1A.5a.2a kládba tartoztak. Antivirális rezisztenciára jellemző mutáció nem volt azonosítható. Ezzel szemben a párhuzamosan vizsgált CSF-minták metagenomikai vizsgálata valamennyi esetben negatív eredménnyel zárult.

4.1.2 Nem légúti minták metagenomikai vizsgálata

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 jelenléte volt kimutatható. 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, többek között *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 központi idegrendszeri fertőzést, valamint egy *Tropheryma whipplei* fertőzést, ez utóbbit 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 ($p = 0,054$).

4.2 A Magyarországon azonosított *Burkholderia pseudomallei* izolátumok genomikai vizsgálatának eredményei

A két *B. pseudomallei* izolátum eltérő klinikai megjelenésű megbetegedésből származott. Az első esetet (584_2008_OEK) 2008-ban, indiai utazást követően ismerték fel. A fertőzés súlyos, központi idegrendszeri érintettséggel járó megbetegedés formájában jelentkezett. A klinikai képet meningoencephalitis, szepszis, láz, gyengeség, fejfájás és facialis neuralgia jellemezte. A beteg intenzív ellátásban részesült, és célzott antimikrobiális kezelés mellett túlélte a fertőzést, ugyanakkor tartós neurológiai maradványtünetek alakultak ki. A második esetet (831_2019_NNK) 2019-ben, thaiföldi utazást követően diagnosztizálták; a megbetegedés nyaki tályog formájában jelentkezett. Sebészi beavatkozást és antibiotikum-terápiát követően a beteg tünetmentessé vált. A draftgenomok mérete 7,13, illetve 7,20 Mb, GC-tartalmuk pedig a *B. pseudomallei* fajra jellemző, megközelítőleg 68% volt. Mindkét genomban mintegy 7400 gén és 5870 kódoló szekvencia (CDS) volt azonosítható. A tRNS- és rRNS-gének számában különbség mutatkozott, míg a nem kódoló RNS-régiók és az egyéb genomikai elemek száma hasonló volt. CRISPR–Cas rendszer egyik izolátumban sem volt kimutatható. A genomikai paraméterek megfeleltek a *B. pseudomallei* fajra jellemző, két kromoszómából álló nagy genom sajátosságainak. Az *in silico* MLST-elemzés két különböző szekvenciatípust azonosított. Az 584_2008_OEK izolátum az ST1643 szekvenciatípusba tartozott, és olyan egyedi *ndh*-allélt hordozott, amely korábban nem szerepelt a PubMLST adatbázisban. A 831_2019_NNK izolátum az ST1051 szekvenciatípusba tartozott, amelyet korábban vietnámi és indiai klinikai izolátumokban, valamint ausztrál környezeti mintából származó izolátumban írtak le. A magyar izolátum a nyolcadik, adatbázisban rögzített ST1051 szekvenciatípusba tartozó törzs volt. A core-genome MLST-elemzés során 4221 core gén allélprofilja lett összehasonlítva 410 globális referencia-izolátuméval. A két magyar izolátum genetikailag markánsan elkülönülő kládba sorolódott. Mindkét törzs az ázsiai leszármazási vonalba illeszkedett, összhangban az utazási anamnézissel. A két izolátum közötti jelentős alléldiverzitás epidemiológiai kapcsolat hiányára és egymástól független behurcolásra utalt. A virulenciaprofil vizsgálata során mindkét izolátumban

azonosítható volt a teljes *wcb* operon, a YLF-génklaszter, a filamentózus hemagglutinint kódoló *fha*B3 gén, valamint a 622 bp hosszúságú ITS C-variánshoz társuló *tox*A gén, míg BTFC-klaszter egyik izolátumban sem volt kimutatható. Az 584_2008_OEK törzs az LPS A, a 831_2019_NNK törzs pedig az LPS B szerotípusba volt sorolható. Az intracelluláris terjedésben és a sejten belüli mozgásban kiemelt jelentőségű *bimA* gén mindkét izolátumban jelen volt, azonban eltérő variáns formájában: az 584_2008_OEK törzsben a *bim*A_{Bm}, míg a 831_2019_NNK izolátumban a *bim*A_{Bp} variáns került azonosításra. Az antimikrobiálisrezisztencia-gének tekintetében szintén különbség mutatkozott a két izolátum között. Az 584_2008_OEK törzsben a *bla*OXA-57 és a *bla*PenI β-laktamázgének mellett az *amr*AB effluxpumpát kódoló operon, valamint az Omp38 külső membránfehérjét kódoló gén is jelen volt. Ezzel szemben a 831_2019_NNK izolátumban kizárólag a *bla*OXA-59 gén volt kimutatható.

4.3 Nem-O1, nem-O139 *Vibrio cholerae* izolátumok genetikai jellemzése

A vizsgálatba a Magyarországon 2018 és 2025 között azonosított 25 klinikai eredetű NTVC izolátum került bevonásra. 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 koinfekció négy esetben (16%) volt azonosítható. 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 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 a tünetek megjelenése előtt. Egy esetben a beteg piócaterápián vett részt, majd gyógyfürdőben is járt közvetlenül a megbetegedése előtt. 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. A teljesgenom-szekvenálás alapján valamennyi izolátum NTVC-nek bizonyult, és egyik sem hordozta a klasszikus kolera kialakulásáért felelős géneket. A cgMLST-vizsgálat jelentős genetikai diverzitást tárt fel, ugyanis a megbetegedések nem kapcsolódtak egyetlen domináns genetikai vonalhoz. Az alternatív virulenciafaktorok nagy gyakorisággal fordultak elő: a *hly*A gén az

izolátumok 84%-ában, az RTX-rendszer génjei 64%-ában, a *fur* és *feo*ABC gének 76%-ában, a T6SS komponensei 44%-ában voltak kimutathatók. A 25 klinikai izolátum 64%-a hordozott legalább egy antimikrobiális rezisztenciagént. Az *alm*E, *alm*F és *alm*G gének 24,0%, 24,0% és 20,0%-ban, β-laktamáz gének 20,0%-ban - köztük *bla*CARB-7 12,0%-ban-, míg *qnr*VC-családba tartozó kinolonrezisztencia-gének 20,0%-ban fordultak elő. Egy primer NTVC-pneumonia eset vizsgálata során a klinikai izolátum és a feltételezett édesvízi expozíciós helyről származó három környezeti izolátum között nem volt kimutatható allélikus eltérés. Valamennyi izolátum az újonnan azonosított ST1605 szekvenciatípusba tartozott. A klinikai és környezeti izolátumok teljes genetikai egyezése alátámasztotta a fertőzés és a feltételezett édesvízi expozíció közötti közvetlen epidemiológiai kapcsolatot. Az eredmények Európában elsőként szolgáltattak közvetlen genomikai bizonyítékot édesvízi expozícióhoz kapcsolódó, NTVC okozta primer pneumonia kialakulására.

5. Következtetések

Jelen doktori értekezés célja az ismeretlen etiológiájú, ritka vagy újonnan megjelenő fertőző betegségek diagnosztikájának fejlesztése volt korszerű genomikai módszerek alkalmazásával. Az elvégzett vizsgálatok eredményei igazolták, hogy a klinikai metagenomikai újgenerációs szekvenálás (mNGS) és a teljesgenom-szekvenálás (WGS) eltérő, de egymást kiegészítő módon járul hozzá a fertőző betegségek felismeréséhez és epidemiológiai értékeléséhez. Míg az mNGS elsősorban a kórokozó közvetlen klinikai mintából történő, hipotézismentes azonosítását támogatja, addig a WGS a már izolált kórokozók nagy felbontású genetikai jellemzésére, rokonsági viszonyaik meghatározására, valamint virulencia- és rezisztenciadeterminánsaik feltárására alkalmas. A két megközelítés közös értéke abban rejlik, hogy a hagyományos mikrobiológiai és epidemiológiai adatoknál részletesebb információt szolgáltatnak, ugyanakkor azok klinikai értelmezését nem helyettesítik.

1. Hazai körülmények között bevezetésre és alkalmazásra került egy klinikai metagenomikai újgenerációs szekvenálási munkafolyamat légúti és egyéb klinikai minták vizsgálatára. A légúti pilotvizsgálatban az mNGS a 46 mintából 36-ban (78,3%) azonosított potenciálisan releváns kórokozót, és kilenc, célzott vírus-PCR-rel negatív mintában további bakteriális vagy virális ágenseket mutatott ki. A 45 nem légúti minta 68,9%-ában sikerült potenciálisan releváns kórokozót azonosítani. A *Balamuthia mandrillaris*, *Spirometra erinaceieuropaei*, *Tropheryma whipplei*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia typhi*, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* és *Bacillus anthracis* kimutatása igazolta az mNGS jelentős diagnosztikai többletértékét ritka, atípusos és hagyományos módszerekkel nehezen felismerhető fertőzésekben. Az eredmények alapján az mNGS nem helyettesíti a célzott molekuláris vizsgálatokat, hanem elsősorban ismeretlen

etiológiájú, PCR-negatív vagy komplex differenciáldiagnosztikát igénylő esetekben egészíti ki azokat.

2. A Magyarországon azonosított két humán melioidosis esetből származó *B. pseudomallei* izolátum teljesgenom-szekvenálása és cgMLST-alapú összehasonlítása két, egymástól független, utazással összefüggő behurcolást igazolt. A 2008-ban, indiai utazást követően kialakult neuromelioidosis izolátuma az új ST1643, míg a 2019-ben, thaiföldi expozícióhoz kapcsolódó nyaki tályogból származó törzs az ST1051 szekvenciatípusba tartozott. A két izolátum eltérő filogenetikai helyzete, valamint különböző virulencia- és rezisztenciaprofilja alátámasztotta az esetek független eredetét. A neuromelioidosis izolátumában azonosított *bim*A_{Bm} variáns összhangban állt a központi idegrendszeri érintettséggel. Az eredmények igazolták a WGS értékét az importált melioidosis esetek molekuláris epidemiológiai értékelésében és valószínű földrajzi eredetük meghatározásában.

3. Elsőként történt meg a Magyarországon 2018 és 2025 között azonosított 25 klinikai NTVC izolátum átfogó genomikai epidemiológiai vizsgálata. A cgMLST-elemzés jelentős genetikai diverzitást mutatott, és igazolta, hogy az invazív fertőzések nem egyetlen domináns klónhoz kapcsolódtak. Egyik izolátum sem hordozta a klasszikus kolera kialakulásához szükséges *ctx*AB, *ace*, *zot* és *tcp* determinánsokat, ugyanakkor gyakori volt a *hly*A gén, az RTX toxinrendszer, a T6SS és a vasfelvételi rendszerek jelenléte. Antimikrobiális rezisztenciával összefüggő genetikai determinánst az izolátumok 64%-ában azonosítottak. Az eredmények igazolták, hogy a klasszikus koleratoxin hiánya nem zárja ki a súlyos, invazív vagy akár fatális NTVC-fertőzések kialakulását.

4. Teljesgenom-szekvenálással közvetlen genetikai kapcsolat volt igazolható egy édesvízi aspirációt követően kialakult primer NTVC-pneumonia klinikai izolátuma és az expozíciós helyről származó három környezeti izolátum között. A négy izolátum azonos ST1605 szekvenciatípusba tartozott, megegyező virulencia- és rezisztenciagén-profilt mutatott, a cgMLST-elemzés pedig zéró allélikus eltérést igazolt közöttük. Az eredmény Európában elsőként szolgált teljesgenom-alapú molekuláris bizonyítékkal egy primer pulmonalis NTVC-fertőzés édesvízi környezeti forrására. A vizsgálat közvetlenül igazolta a WGS járványügyi és forráskutatási értékét, valamint a klinikai, környezeti és genomikai surveillance integrációjának jelentőségét.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

1. **Henczkó J**, Vargha M, Kállai A, Kristóf K, Tóth Á, Tóth S, Pályi B, Khayer B, Róka E, Novák B, Mag T, Mezei E, Molnár Z, Kis Z. Genomic characterization of non-O1, non-O139 Vibrio cholerae causing rare clinical manifestation BMC INFECTIOUS DISEASES 26: 1 Paper: 58, 9 p. (2026) SJR: Q1. IF: 3,2.

2. **Henczkó J**. Veszélyes bakteriális kórokozók In: Kappelmayer János (szerk.) Az orvosdiagnosztikai szakmák fejlődése Magyarországon Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetemi Kiadó (2026) 333 p. p. 217-218.

3. **Henczkó J**, Tóth Á, Knausz M, Gartner B, Reményi Á, Bíró E, Létay E, Rókusz L, Tóth S, Pályi B, Mag T, Erdősi T, Deézsi-Magyar N, Molnár Z, Kis Z. 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) SJR: Q1. IF: 3,8.

Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – eredeti közlemények

1. **Henczkó J**, Kienle Z, Kádár J, Kádár-Hürkecz E, Tárnoki-Boross K, Sütő P, Pályi B, Tóth Á, Kamotsay K, Molnár Z, Kis Z. Laboratory-Acquired Brucella abortus Infection Mimicking Autoimmune Disease: A Case Report with Genomic Confirmation PATHOGENS 15: 5 Paper: 460, 9 p. (2026) SJR: Q1. IF: 3,8.

2. Deézsi-Magyar N, Dénes B, Novák B, Zsidei G, Déri D, **Henczkó J**, Pályi B, Kis Z. First Broad-Range Serological Survey of Crimean–Congo Hemorrhagic Fever among Hungarian Livestock VIRUSES 16: 6 Paper: 875, 10 p. (2024) SJR: Q1. IF: 3,5.

3. Nagy A, Horváth A, Mezei E, **Henczkó J**, Magyar N, Nagy O, Koroknai A, Csonka N, Takács M. 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) SJR: Q3. IF: 1,3.

4. Takács M, **Henczkó J**, Déri D, Barcsay E, Pályi B, Kis Z. Majomhimlő: Régi kórokozó új köntösben ORVOSOK LAPJA 19: 4 pp. 18-20. (2022)

5. Pándics T, Róka E, **Henczkó J**, Khayer B, Kis Z, Málnási T, Pályi B, Schuler E, Vargha M. A hazai szennyvízalapú COVID-19 előrejelző rendszer – másfél év tanulságai NÉPEGÉSZSÉGÜGY 99: 1 pp. 154-161. (2022)

6. Vaughan AM, Cenciarelli O, Colombe S, Alves de Sousa L, Fischer N, Gossner CM, Pires J, Scardina G, Aspelund G, Avercenko M, Bengtsson S, Blomquist P, Caraglia A, Chazelle E, Cohen O, Diaz A, Dillon C, Dontsenko I, Kotkavaara K, Fafangel M, Ferraro F, Firth R, Fonager J, Frank C, Carrasco MG, Gkolfinopoulou K, Grenersen MP, Guzmán Herrador BR, **Henczkó J**, Hoornenborg E, Igoe D, Ilić M, Jansen K, Janță DG, Johansen TB, Kasradze A, Koch A, Kyncl J, Martins JV, McAuley A, Mellou K, Molnár Z, Mor Z, Mossong J, Novacek A, Orlikova H, Pem Novosel I, Rossi MK, Sadkowska-Todys M, Sawyer C, Schmid D, Sîrbu A, Sondén K, Tarantola A, Tavares M, Thordardottir M, Učakar V, Van Ewijk C, Varjas J, Vergison A, Vivancos R, Zakrzewska K, Pebody R, Haussig JM. 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) SJR: D1. IF: 19,0.

7. Tscherne A, Mantel E, Boskani T, Budniak S, Elschner M, Fasanella A, Feruglio SL, Galante D, Giske CG, Grunow R, **Henczkó J**, Hinz C, Iwaniak W, Jacob D, Kedrak-Jablonska A, Jensen VK, Johansen TB, Kahlmeter G, Manzulli V, Matuschek E, Melzer F, Nuncio MS, Papaparaskevas J, Pelerito A, Solheim M, Thomann S, Tsakris A, Wahab T, Weiner M, Zoeller L, Zange S. 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) SJR: Q2. IF: 4,5.

8. Magyar N, Kis Z, Barabás É, Nagy A, **Henczkó J**, Damjanova I, Takács M, Pályi B. 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) SJR: D1. IF: 3,817.

9. Horváti K, Fodor K, Pályi B, **Henczkó J**, Balka G, Gyulai G, Kiss É, Biri-Kovács B, Senoner Z, Bősze S. 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) SJR: Q1. IF: 8,787.

10. Ricci M, Horváti K, Juhász T, Szigyártó I, Török G, Sebák F, Bodor A, Homolya L, **Henczkó J**, Pályi B, Mlinkó T, Mihály J, Bilal N, Yang Z, Lin F, Lu X, Románszki L, Bóta A, Varga Z, Bősze S, Zsila F, Beke-Somfai T. 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) SJR: D1. IF: 5,318.

11. Quemé-Peña M, Juhász T, Mihály J, Szigyártó IC, Horváti K, Bősze S, **Henczkó J**, Pályi B, Németh C, Varga Z, Zsila F, Beke-Somfai T. 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) SJR: Q1. IF: 2,576.

12. Horváti K, Pályi B, **Henczkó J**, Balka G, Szabó E, Farkas V, Biri-Kovács B, Szeder B, Fodor K. A Convenient Synthetic Method to Improve Immunogenicity of Mycobacterium tuberculosis Related T-Cell Epitope Peptides VACCINES (BASEL) 7: 3 Paper: 101, 15 p. (2019) SJR: D1. 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) SJR: D1. IF: 6,212.

14. Balla E, Petrovay F, Erdősi T, Balázs A, **Henczkó J**, Urbán E, Donders GGG. Distribution of Chlamydia trachomatis genotypes in neonatal conjunctivitis in Hungary JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY 66: 7 pp. 915-918. (2017) SJR: Q1. IF: 2,112.