

A gonorrhoea fertőzés: *Neisseria gonorrhoeae* törzsek antibiotikum-rezisztencia vizsgálata és molekuláris tipizálása

Doktori tézisek

dr. Brunner Alexandra

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Ostorházi Eszter, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Sziller István, PhD, osztályvezető főorvos
Dr. Beke Artúr, PhD, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Cseh Károly, DSc, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szalai Zsuzsanna, PhD, osztályvezető főorvos
Dr. Melczer Zsolt, PhD, egyetemi docens

Budapest
2017

Bevezetés

A gonorrhoea (tripper, kankó) a második leggyakoribb baktérium okozta nemi úton terjedő betegség (STD) a világon. Jelentős népegészségügyi problémát képvisel, befolyásolva az életminőséget, a fertilitást, a HIV transzmissziót, maga után vonva mindezek gazdasági hatásait. Tekintettel a fertőzés gyakoriságának emelkedésére, a rezisztens baktériumok terjedésére, illetve az újabb antibiotikum-terápia hiányára, a probléma a jövőben fokozódni fog.

Az ezredforduló után a fertőzés incidenciája növekedésnek indult. Kezelése kizárólag antibiotikum terápiával oldható meg, de az utóbbi évtizedekben egyre emelkedik az antibiotikum-rezisztens törzsek száma. Megjelentek a multirezisztens és kiterjedt rezisztenciával bíró (MDR, XDR) törzsek is, melyek az aktuális terápiais ajánlásban szereplő antibiotikumokra, a 3. generációs cephalosporinokra, az azithromycinre is rezisztensek. 2016-ban közölték az első terápiais kudarcot az elsővonalbeli kezelésként javasolt ceftriaxon és azithromycin kombináció adása után, az Egyesült Királyságban. A WHO 2012-es kiadványa szerint elképzelhető, hogy a jövőben nem lesz rendelkezésre álló hatékony terápia az egyre terjedő rezisztens törzsek miatt, ezért is hangsúlyozza az antibiotikum-érzékenység folyamatos monitorozásának fontosságát. Mindez rávilágít arra a tényre, hogy milyen fontos és sürgető új terápiais tervek, új antibiotikumok bevezetése a gonorrhoea kezelésében. A megfelelő terápiais terv létrehozásához az antibiotikum-rezisztencia viszonyok ismeretén túl, a DNS szekvencia-tipizáláson alapuló, NG-MAST (*Neisseria gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing) módszer használható fel, mely módszerrel összefüggés mutatható ki az NG-MAST szekvencia típusok (ST-k) és a megfelelő rezisztencia fenotípusok között, és követhetővé válik a rezisztens törzsek terjedése. A *N. gonorrhoeae* izolátumok csoportosítására jelenleg ez a legelterjedtebb módszer világszerte, mely a törzsek között magas diszkriminációs lehetőséget kínál, jól reprodukálható, és az eredményei összevethetők a nemzetközi kutatások esetén is. Az adott régióban leírt ST-k génjein végzett filogenetikai vizsgálatokkal az ST-k közötti rokonsági kapcsolat, az evolúciós tendenciák írhatóak le.

Ennek megfelelően vizsgálatainkban nagy hangsúlyt fektettünk a magyarországi rezisztencia-viszonyok mérésére és alakulására az elmúlt évek alatt, különös tekintettel a terápiais ajánlásban szereplő antibiotikumokra, a cephalosporinokra és az

azithromycinre. NG-MAST módszerrel vizsgáltuk a törzsek szekvencia típusait. Ismereteink szerint ez volt az első magyarországi felmérés, mely a szekvencia típusok és a hozzájuk tartozó rezisztencia-adatok közötti összefüggést vizsgálta, megfelelő empirikus terápia létrehozása céljából.

Célkitűzések

A) 1.) Célul tűztem ki a tenyésztéssel igazolt gonorrhoea fertőzés incidenciájának, a betegpopuláció kor és nem szerinti vizsgálatát 2010 és 2014 között, a Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán, a SE *Neisseria gonorrhoeae* Referencia Laboratóriumában.

2.) További céloom volt a tenyésztés által igazolt fertőzés anatómiai lokalizáció szerinti megoszlását vizsgálni, kiemelten a pharynx infekciójára, amely legtöbb esetben aszimptómás és fontos szerepet játszik a rezisztens törzsek kialakulásában, a kommenzális és patogén Neisseriak közötti géntranszformációnak köszönhetően.

3.) Mivel a gonococcusok az elmúlt évtizedekben az újabb és újabb bevezetésre kerülő antibiotikumokra rezisztensek lettek, ezért fontosnak tartom az antibiotikum-érzékenység követését évről évre, ahogy az a GASP programok során megvalósul világszerte, és ahogy a WHO 2012-es kiadványa is hangsúlyozza az antibiotikum-rezisztencia terjedésének folyamatos monitorozását. Céloom volt továbbá kiemelten vizsgálni a jelenlegi terápiás ajánlásban szereplő antibiotikumok rezisztenciáját, azaz a 3. generációs cephalosporinok és az azithromycin hatékonyságát.

4.) Az érvényes európai terápiás ajánlás a jelenlegi terápia (a ceftriaxon és azithromycin kombináció) létjogosultságát az antibiotikumok szinergista hatása mellett azzal is alátámasztja, hogy az azithromycin a chlamydia koinfekciót is eradikálja, ami gyakorinak tekinthető 30 év alatti STD betegek között. Céloom volt ezt az állítást összevetni a Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikán észlelt viszonyokkal. Az STD ambulanciáról beérkező, multiplex RT-PCR-rel vizsgált minták eredményét kiértékelve, elemzésre került a *C.trachomatis* fertőzés és a gonorrhoea koinfekció gyakorisága.

B.) Molekuláris vizsgálatok felhasználása

1.) További célul tűztem ki NG-MAST (*N.gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing) molekuláris tipizáló eljárás alkalmazásával 52 törzs szekvencia típusának meghatározását a 2013-as évből, mellyel a magyarországi NG-MAST típusok előfordulási gyakoriságáról szerettem volna képet adni, és eredményeinket az ismert európai NG-MAST típusok előfordulási gyakoriságával összehasonlítani. Vizsgálatunk

az első olyan magyarországi reprezentatív vizsgálat, ami kellő mennyiségű törzs tipizálásával az évek óta fennálló adathiány pótlására is képes, és kiegészítheti az Euro-GASP felmérés adatait.

2.) Emellett további tervem között szerepelt 50 db, 2014-ben izolált, azithromycin-rezisztens törzs szekvencia típusát megállapítani, az eredményeket összevetni külföldi felmérések adataival.

3.) Újabb célkitűzésként pedig a 2014-es, azithromycin-rezisztens szekvencia típusok molekuláris evolúciós vizsgálatát terveztük, filogenetikai fa készítésével, az eredményekből következtetések levonásával a sikeresen terjedő szekvencia típusokról.

Módszerek

A *N. gonorrhoeae* baktériumok tenyésztése

Az STD ambulancián a tünetes gonorrhoea-szuszept betegektől és partnereiktől vett minta várakozás és szállítás nélkül közvetlenül táptalajra lett kioltva. A mintákat urethrából, cervixből, rectumból és pharynxból vették. A váladék előmelegített VCA3, ill. PVX csokoládé agarra (Biomérieux, Budapest) lett oltva. Az előírásoknak megfelelően 37° C-on, 5%-os szén-dioxid atmoszférán, 1-3 napig tenyésztették a táptalajokat.

A rezisztencia vizsgálata Epsilometer-tesztel

PVX agaron (Biomérieux, Budapest) MIC Test Strip (Liofilchem® s.r.l., Roseto degli Abruzzi, Italy) alkalmazásával mértük az antibiotikumok minimális inhibitor koncentrációit. A MIC meghatározást 7 antibiotikum esetén végeztük el (azithromycin, cefixim, ceftriaxon, ciprofloxacín, penicillin, spectinomycin és tetracyclin). A mérés során a forgalmazó utasításai szerint jártunk el: 0.5 McFarland sejtsűrűségű szuszpenziót készítettünk, ami körülbelül 4-5 telep feloldását jelenti 2 ml fiziológiás sóoldatban. Mindezt vattapálcával PVX agarra szélesztettük. A táptalajokat 37°C-on, 5%-os szén-dioxid atmoszférán helyeztük el egy napig. Majd egy nap után a gátlási zónának megfelelő koncentrációkat leolvastuk a MIC Test Stripről. A MIC alapján meghatározott antibiotikum-rezisztencia tartományokat az EUCAST ajánlásban szereplő határértékek szerint adtuk meg.

Multiplex PCR vizsgálat koinfekciók kimutatására

Közvetlenül a betegekből érkező vizsgálati anyagból végeztünk DNS izolálást Ribospin™ vRD izoláló kittel (GeneAll®) a gyártó leírása szerint, majd Multiplex Real Time PCR vizsgálathoz az Anyplex™ II STI-7 Detection STD kitet (Chemium, Hungary) használtuk a gyártó (Seegene) leírása szerint.

Az NG-MAST módszer lépései

A 2013-as év *N. gonorrhoeae* törzseiből kiválasztottunk szekvenálásra 52 törzset, melyek a kontaktus csoportokból 1 index törzset képviseltek. A 2014-es év

törzseiből szintén kiválasztottunk 50 azithromycinre mérsékelt rezisztens és rezisztens tartományba tartozó törzset. A kiválasztott törzseken az alább ismertetett vizsgálati sort végeztük.

***Neisseria gonorrhoeae* törzsek tenyésztése fagyasztást követően**

A kiválasztott, kriobankban lefagyasztott törzseket kiolvasztottuk, előmelegített, szelektív VCA táptalajra kioltottuk és tenyésztettük a fent részletezett körülményeknek megfelelően.

DNS izolálása

A *N. gonorrhoeae* DNS-ének izolálásához 95°C-on történő hőkezelés is elegendő, ugyanakkor számos izoláló kitet gyártanak erre a célra. 2013-ban izolálásra Ribospin™ vRD izoláló kitet (GeneAll®) használtunk. 2014-ben újabb kitet választottunk a feladatra: DNA-sorb-AM DNS izoláló kitet (AmpliSens.®, Bratislava) használtunk.

***PorB* és *tbpB* szakaszok felsokszorozása PCR módszerrel**

A *N. gonorrhoeae*-genom specifikus génjeinek azonosításához a keresett szakaszokat amplifikálni kell. A PCR (=polimeráz láncreakció) során templát DNS-ként az előző lépésben kivont DNS-t használtuk fel. Primerként a nemzetközi kutatások során bevált primereket (Csertex kft. Budapest) vettük igénybe. A vizsgálatot nemzetközi kutatásoknak megfelelően végeztük (Martin IM, 2004). Az amplifikált szakaszok jelenlétét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

Tisztítás exonukleázzal és alkalikus foszfáttal

PCR termék tisztítását ExoSAP-IT reagenssel (Biomedica Hungária Kft., Budapest) végeztük. A mintát 37°C-on 45 percig, 80°C-on 15 percig melegítettük, majd 4°C-on inkubáltuk.

Big dye, azaz szekvenáló PCR

A szekvenálás következő lépése a dinukleotidok jelölése. A fluoreszcensen jelölt dideoxinukleotidokat BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®) tartalmazta. A vizsgálatot a nemzetközi kutatások alapján végeztük (Martin IM, 2004).

Oszlopos tisztítás nucleoseq kittel

A big dye elvégzése után NucleoSeq kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) segítségével, gélfiltrációs technikával mentesítettük a terméket, majd formamidhoz

adtuk, és 95°C-on 5 percre PCR gépbe helyeztük. A kapott terméket küldtük tovább a pontos szekvenciák analizéséhez a Biomi Kft-nek (Gödöllő).

Szekvencia-analízis ChromasLite programmal

A megküldött szekvenciákat a ChromasLite 2.1. programmal elemeztük, a www.ng-mast.net weboldalon keresztül ST szerint csoportosítottuk, az új törzseket pedig a weboldalra feltöltöttük.

Filogenetikai fa készítése

A filogenetikai vizsgálatok célja az evolúciós kapcsolatokra következtetni. A szekvenciák összehasonlításához szükséges, hogy a homológ nukleotid helyeket egymás alá rendezzük, ami az illesztés (alignment) folyamata. A filogenetikai rekonstrukció újabb lépése a filogenetikai fa készítő algoritmus kijelölése.

A 2014-es, azithromycin-rezisztens szekvencia típusok analizéséhez MEGA6 programot alkalmaztunk. A filogenetikai analízist neighbour-joining statisztikai módszerrel (szomszéd-összevonó módszer), maximum composite likelihood modellel (legnagyobb valószínűségi érték modell) végeztük. A szekvenciák hasonlósági fokát Megablast (highly similar sequence) BLASTN programmal határoztuk meg az NCBI weboldal segítségével.

Eredmények

Epidemiológiai adatok 2010 és 2014 között

A *N. gonorrhoeae* pozitív tenyésztések aránya

Az STD ambulanciáról érkező, *N. gonorrhoeae* pozitív tenyésztések száma és aránya 2010 és 2014 között folyamatosan emelkedett. 2011-re 11%-kal, 2012-re 28%-kal, míg 2013-ra 18%-kal, 2014-re pedig 4%-kal emelkedett a tenyésztéssel igazolt fertőzött betegek megjelenése. A gonorrhoea pozitív minták aránya a bakteriológiai tenyésztések számához képest is növekedett évről évre, ami alátámasztja a gonorrhoea fertőzés terjedését.

A tenyésztéssel igazolt gonorrhoeás nők és férfiak kor szerinti eloszlása

5 év adatai alapján a tenyésztéssel igazolt fertőzöttek 85,4%-a férfi, 14,6%-a nő volt. Ennek egyik oka lehet, hogy nő a homoszexuális férfiak csoportja. A másik feltételezhető ok, hogy az akut fertőzés a férfiak kb. 90%-ában kifejezett tünetekkel jár, míg nők esetén több mint 70%-ban tünete szegény. A férfiak kb. 74%-a 20 és 40 év közötti, míg a nők esetén ez kb. 67%.

Pozitív tenyésztések eloszlása anatómiai lokalizáció és nem szerint

2010 és 2013 között, a beérkező pozitív tenyésztések esetén vizsgáltuk az anatómiai lokalizáció szerinti eloszlást. Férfiak esetében a minták 80%-a az urethrából származott, 4%-a a pharynxból, 16%-ban pedig a rectumból. Nők esetén a minták nagyobb része a cervixből (62%), kisebb része az urethrából (20%), ill. az anusból és a pharynxból volt kimutatható (8-8%). A mintavétel nők esetében gyakrabban multiplex lokalizációjú fertőzést mutatott, általában cervicitis és urethritis együttesen fordult elő, de akár ezek mellett az anorectum vagy pharynx fertőzése is fennállhatott. Speciális esetben conjunctiva fertőzését is megfigyeltük, ami a genitális váladék autoinokulációjával alakulhat ki.

2014-ben a férfiak esetén az urethrából vett bakteriológiai minták 77%-a volt pozitív. Férfiaknál 20%-ban az anorectum, 18%-ban pedig a pharynx fertőzése igazolódott. Nőkben leggyakoribb a cervicitis (65,5%) és az urethritis (68,9%) megjelenése. Az anorectum fertőzöttsége is gyakori, 44,8%. A pharynx fertőzés megjelenése pedig 25%-os volt.

Rezisztencia terjedésének szempontjából a pharynx és a rectum fertőzése a legfontosabb, mivel a fertőzés aszimptomatikusan zajlik és a jelenlévő apatogén

Neisseriák mint a rezisztencia-gének rezervoárjai, átadhatják a géneket a *N. gonorrhoeae* törzseknek. Ugyanakkor az egyes antibiotikumok, így a cefixim, spectinomycin nem érnek el kellő koncentrációt a pharynxban, s az aszimptomatikusan zajló fertőzés miatt, az egyén tünetmentes hordozóvá válhat („néma járvány”).

Antibiotikum-rezisztencia alakulása az elmúlt 5 évben

A penicillin-és tetracyclin-rezisztencia 70-80% között alakult a vizsgált időszakban. A ciprofloxacín-rezisztencia 60 és 70% között volt megfigyelhető 2010 és 2013 között, 2014-re 40%-ra csökkent. A rezisztencia-adatokból következik, hogy penicillin, ciprofloxacín, tetracyclin empirikus terápiában nem alkalmazható. A cefixim-rezisztencia 1 év alatt 1,5%-ra emelkedett. Spectinomycin- és ceftriaxon-rezisztens törzs nem volt. Azonban a spectinomycin használatát korlátozza a spectinomycin-rezisztencia gyors kifejlődési lehetősége, ill. csökkent hatékonysága a pharynx fertőzésben.

A 2014-ben megjelenő azithromycin-rezisztens törzsek elemzése

2013-ban az azithromycin-rezisztencia 15,9%-os volt, 2014-ben pedig már 30%-os. Egy év alatt az azithromycinre rezisztens törzsek száma szignifikánsan emelkedett ($\chi^2 = 11,4437$; $P = 0,000717$; $P < 0,001$).

A nő és férfi arány ebben az esetben 1:7,3, ami kismértékben eltér az egész betegpopulációtól, mivel ez esetben 1 aránylik az 5,6-hez. A medián életkor 33,6 év. 1 mg/l feletti MIC értékkel rendelkező törzsek az összes gonococcus 7%-át adták.

Az emelkedő azithromycin-rezisztencia hátterében a gyakori azithromycin-használatot feltételezzük. Az Európai Antibiotikum-felhasználási Felügyelet (ESAC) 2015-ös, magyarországi adatai szerint a makrolidok a második leggyakrabban használt antibiotikumok a járóbeteg ellátásban. Így elképzelhető, hogy a betegeket azithromycinnel kezelték a gonorrhoea betegséget megelőzően. Ilyenkor a pharynxban és anusban az apatogén, kommenzális *Neisseriák* rezisztencia-mechanizmusokat akvirálhatnak, és rezisztencia gének rezervoárjaivá válhatnak. Tekintettel a WHO által kiadott ajánlásra, mely szerint egy antibiotikumot nem javasolhatunk, ha a *N. gonorrhoeae* törzsek több mint 5%-a rezisztens, az azithromycin használata a továbbiakban megfontolandó. Emellett szól, hogy szinergista hatást több vizsgálatban nem sikerült bizonyítani. Ölési görbe vizsgálatokban a kombináció kevésbé volt baktericid hatású, mint a ceftriaxon önmagában.

A *Chlamydia trachomatis* infekció megjelenése

2014-es évben az STD ambulanciáról multiplex RT-PCR vizsgálatok alapján azt találtuk, hogy a vizsgálati anyagok 6,7%-a volt *C. trachomatis* fertőzött, míg 12,2%-a volt gonorrhoeás. A *N. gonorrhoea* fertőzött esetek 14,7%-a volt *C. trachomatis* fertőzött.

Az NG-MAST módszerrel vizsgált törzsek eredményei

2013-ban izolált, 52 NG-MAST módszerrel vizsgált törzs eredménye

Összesen 22 különböző ST-t sikerült azonosítani. 8 új szekvencia-típust azonosítottunk (ST 10081-10088). A leggyakoribb szekvencia típusú törzsek az ST 2992, ST 1407, ST 4995 és ST 225 voltak, 19,2%, 17,3%, 17,3% és 7,7%-os gyakorisággal. Emellett izoláltunk még ST 359-es és ST 8517-es típusba tartozó törzseket is 3,8-3,8 %-ban.

A vizsgálati anyagunkban legnagyobb számban (19,2%-ban) előforduló ST 2992 a Euro-GASP 2010-es évi adatai alapján Európában a második leggyakoribb törzs volt (Chisholm SA, 2013). 90%-ban rezisztens tetracyclinre és 40%-ban rezisztens azithromycinre, míg ciprofloxacinra érzékeny. Cefiximre, ceftriaxonra nézve alacsony MIC értékekkel bír.

Az Európában legelterjedtebb, a Euro-GASP adatai alapján 2010-ben 16%-ban fellelhető, multirezisztens ST 1407 vizsgálatainkban is magas arányt ért el, szám szerint 17,3%-ot. A 2010-es Euro-GASP felmérésben leírták, hogy ez az a törzs, amelyikhez a legtöbb terápiás kudarc köthető, mivel rezisztens ciprofloxacinra, csökkent érzékenységgel bír cefiximre, és emelkedett MIC értékkel bír azithromycinnel és ceftriaxonnal szemben. Az általunk megvizsgált 9db ST 1407-es törzs 56%-ban már rezisztens azithromycinre, és 22%-ban pedig mérsékelten érzékeny rá, míg tetracyclinre és ciprofloxacinra 100%-os rezisztenciát mutat. Cefiximre a rezisztens tartományban 1 törzset izoláltunk. Az ST 1407 67%-a mutat csökkent érzékenységet cefiximre ($MIC \geq 0,025 \text{mg/l}$), míg 89%-a pedig ceftriaxonra ($MIC \geq 0,012 \text{mg/l}$).

A vizsgálataink alapján a harmadik leggyakoribb szekvencia típus az ST 4995. Rezisztenciát mutatott ciprofloxacinra, tetracyclinre, és 22%-ban emelkedett MIC értéket mértünk azithromycinre. Míg emelkedett cefixim és ceftriaxon MIC értéket ez esetben nem mértünk. Kiemelném, hogy ugyanezt a törzset leírták már (szerepelt az ng-

mast adatbázisban), azonban ilyen gyakori előfordulásban még nem talákoztunk vele. Ráadásul a 2010-es Euro-GASP sem említi meg cikkében, annak ellenére, hogy egy nagy területet felölelő vizsgálat volt. Így felmerül a kérdés, hogy vajon ez a szekvencia típus egy újabban terjedő törzset takar, vagy esetleg ilyen nagy eltérések lehetnek Nyugat- és Közép-Európa között, amire esetleg eddig nem derült fény, mivel kevés az adat Közép-és Kelet-Európára nézve.

A negyedik leggyakoribb, 7,3%-ban előforduló szekvencia típus az ST 225 volt. Ez Európában hasonló százalékos arányok mellett (5%) a harmadik leggyakoribb ST a Euro-GASP 2010-es adatok alapján, ahol azt is leírják róla, hogy ciprofloxacinnal rezisztens törzset takar. A méréseink szerint ezen túlmenően 100%-ig tetracyclin-rezisztensek, és már 50%-ban azithromycin-rezisztensek. Emellett a cefixim és ceftriaxon MIC értékeik is emelkedettek.

Emelkedett cefixim MIC értékek ($> 0,025\text{mg/l}$) ST 1407, ST 225 és ST 2212 típusokhoz tartoznak. Míg a magasabb ceftriaxon MIC értékek ($\geq 0,012\text{mg/l}$) ST 1407-hez, ST 225-höz, ST 2569-hez, ST 2212-höz és ST 210-hez tartoznak. Ciprofloxacinnál magasfokúnak tekintjük a rezisztenciát 32mg/l feletti MIC esetén. Ilyen értékek jellemzőek ST 225-re és ST 1407-re. Tetracyclin esetén a magasfokú rezisztencia határát 16mg/l -es MIC-nél határozták meg [126]. Ez alapján magas rezisztenciát mértünk ST 4995-nél 89%-ban (8/9 törzs).

A 2012-es európai ajánlás szerint elsőként választandó kezelés $1 \times 500\text{ mg}$ ceftriaxon im. 2 g per os azithromycinnel kiegészítve. Azonban felmerül, hogy ez hosszú távon, Magyarországon nem megbízható kezelési mód, mivel a négy leggyakoribb szekvencia típusba tartozó törzs 60%-a rezisztens azithromycinre.

2014-ben izolált, 50 azithromycin-rezisztens törzs NG-MAST vizsgálat eredménye

Összesen 34 különböző szekvencia típust azonosítottunk. 10 új szekvencia típust írtunk le (ST 11699 és 11708), melyek feltöltésre kerültek az NG-MAST weboldalra. A kísérlet során a leggyakrabban előforduló azithromycin-rezisztens törzsek az ST 1407, ST 4995, ST 11064 voltak, melyek egyforma gyakorisággal, 10-10%-kal jelentek meg. Az ST 1407-es, mely Európában 16%-os megjelenéssel az első helyen áll, és 2013-as kísérleteink szerint is a 2. leggyakoribb Magyarországon. Magas cefixim és

ciprofloxacin MIC értékekkel rendelkezik, tetracyclinre rezisztens. A legmagasabb azithromycin MIC értékeket is ezeknél az ST-knél mértük. Az ST 4995-ös szintén első helyen áll, magas tetracyclin és ciprofloxacin rezisztenciával, tehát továbbra is megőrizte vezető szerepét a magyarországi törzsek között. Az ST 4995-ös ismételt gyakori előfordulása arra utal, hogy ezek a szekvencia típusok sikeres törzsek, melyek a jövőben terápiás kudarcot is okozhatnak. Az ST 11064-es törzset eddigi kutatások nem említik. Egy újonnan elterjedő törzs, melyet a megelőző évben végzett vizsgálatban sem azonosítottunk. Cefiximre, ciprofloxacinra is érzékeny. Az ST 1407 és 11064 esetén a tetracyclin MIC értékek alacsonyak. Ez utal arra, hogy kromoszómáisan öröklődő mutációról van szó.

Filogenetiki vizsgálatok

2014-ben izolált ST-k esetén

Az azithromycin-rezisztens és mérsékelten-rezisztens törzsek 3 nagy csoportra oszthatóak, a közeli rokonság szerint. A leggyakoribb ST-k közül az ST 4417 az első csoportba, az ST 1407-es a második csoportba, míg az ST 4995 és az ST 11064-et a harmadik csoport tartalmazza. Ha figyelembe vesszük a genocsoport definícióját, azaz egy közös allél mellett a másik allél 99%-os hasonlóságot mutat, akkor az ST 21, ST 11064 és az ST 11703 egy genocsoportba tartoznak. A leggyakoribb ST alapján a genocsoport 11064 nevet kapja.

Az ST 1407, ST 8826 és az ST 3378 szintén egy genocsoportot alkot, mely nevét az 1407-es típusról kapta. Tekintettel arra, hogy ezekre a törzsekre jellemző az azithromycin-rezisztencia, feltételezhetjük, hogy a *por* 908-as allél sikeres allélnak tekinthető azithromycin-rezisztencia terjedése szempontjából.

2013-ban és 2014-ben Magyarországon és külföldön izolált ST-k esetén

Tekintettel a *porB* allélok diverzitására, összevetettük az azithromycin-rezisztens, külföldön, Japánban, Kanadában, Olaszországban, valamint az általunk izolált 2013-as, 2014-es törzsek *porB* alléljait. A filogenetikai fa alapján a *por* 908 és a hozzá közelálló allélok a világ többi részén is sikeresen megjelentek (Japán, Kanada, Magyarország), és az azithromycin-rezisztencia terjedéséhez járulhatnak hozzá.

Következtetések

A tenyésztéssel azonosított *N. gonorrhoeae* törzsek vizsgálata lehetővé tette, hogy hazánkból származó új adatokkal egészítsük ki a nemzetközi eredményeket, hozzájárulva a *N. gonorrhoeae* nemzetközi kutatásához. Eredményeink részben egyeznek a nyugat-európai adatokkal, de új adatokat is szolgáltatnak:

1. Vizsgálatainkkal sikerült képet kapni a *N. gonorrhoeae* pozitív tenyésztések arányáról (mikrobiológiai laboratóriumunk vizsgálati anyagában), fertőzés anatómiai megjelenéséről, nem és kor szerinti eloszlásáról, rezisztencia-adatokról.
2. Az elsőként választandó antibiotikumok rezisztenciájának emelkedésével felhívtuk a figyelmet az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatok szükségességére a diagnosztikában.
3. Sikerült molekuláris vizsgálatokat (NG-MAST) bevezetni *N. gonorrhoeae* esetében a laboratóriumunkba, mellyel a hazánkban előforduló szekvencia típusok leírhatóak.
4. Elvégeztük az első olyan vizsgálatot hazánkban, mely a szekvencia típusok és a hozzájuk tartozó rezisztencia adatokat írta le.
5. 18 új szekvencia típust azonosítottunk, és töltöttünk fel az ng-mast adatbázisba.
6. A különböző szekvencia típusok megjelenése alapján, megállapítható volt, hogy a gyakori szekvencia típusok egy része megegyezik a nyugat-európai ST-vel (ST 1407, ST 225, ST 2992), kissé eltérő százalékban. Ugyanakkor hazánkban vannak eltérő, domináló szekvencia típusok is (ST 4995, ST 11064), melyeket a nemzetközi szakirodalom nem említ.
Filogenetikai vizsgálatokkal felhívtuk a figyelmet a sikeres azithromycin-rezisztens genocsoportokra.
7. A sikeres szekvencia típusok és a rezisztencia-adataik ismerete alapot nyújthat megfelelő, regionális empirikus terápiás ajánlások kidolgozásához. 2013-ban a 4 leggyakoribb ST-hez tartozó törzs 60%-a volt rezisztens azithromycinre. Felmerül, hogy a ceftriaxon és azithromycin kombinációja Magyarországon nem feltétlenül megbízható terápiás javaslat. A további azithromycin rezisztencia kialakulásának megelőzésére, az azithromycin alkalmazását azokra az esetekre

érdemes korlátozni, ahol ez elengedhetetlen, pl.: cephalosporinallergia, ill. igazolt *C.trachomatis* koinfekció.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. Brunner A, Nemes-Nikodem E, Mihalik N, Marschalko M, Karpati S and Ostorhazi E. (2014) Incidence and antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from patients attending the national *Neisseria gonorrhoeae* reference laboratory of Hungary. *BMC Infect Dis*, 14:433.

IF: 2,613

2. Nemes-Nikodém E, Brunner A, Pintér D, Mihalik N, Lengyel Gy, Marschalkó M, Kárpáti S, Szabó D, Ostorházi E. (2014) Antimicrobial Susceptibility And Genotyping Analysis Of Hungarian *Neisseria Gonorrhoeae* Strains In 2013. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 61 (4): 435–445.

IF: 0,778

3. Brunner A, Nemes-Nikodem E, Jeney Cs, Szabo D, Marschalko M, Karpati S, Ostorhazi E. (2016) Emerging azithromycin-resistance among the *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Hungary. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 15 (1):3.

IF: 2,376

4. Nemes-Nikodém E, Brunner A, Tóth B., Tóth V., Bánvölgyi A., Ostorházi E. (2015) *Neisseria gonorrhoeae* törzsek rezisztencia adatai Magyarországon, *Orv. Hetil.*, 156 (1): 25–28.

IF: 0,291