Ikt.sz. : DT.58.084/19 /05
Szakreferens : dr. Rózsa Andrea

Hivatalos bírálói nyilatkozat

URBÁN EDIT
Klinikailag fontos humán patogén anaerob baktériumok diagnosztikája és antibiotikum rezisztencia vizsgálata

című doktori munkájáról.

A doktori munka tudományos eredményeit elegendőnek tartom az MTA doktora cím megszerzéséhez, a nyilvános védés kitűzését javasolom:

igen nem

Dátum: 2021. 03. 31

.....
SZABÓ DÓRA

Oktatás, kutatás, gyógyítás: 250 éve az egészség szolgálatában

SEMMELWEIS EGYETEM

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Mikrobiológiai Intézet

Igazgató:Dr. Szabó Dóra, egyetemi tanár

Bírálat Dr. Urbán Edit „Klinikailag fontos humán patogén anaerob baktériumok diagnosztikája és antibiotikum rezisztencia vizsgálata" című MTA értkezéséről

Dr. Urbán Edit „Klinikailag fontos humán patogén anaerob baktériumok diagnosztikája és antibiotikum rezisztencia vizsgálata" című 161 oldalas dolgozattal pályázik az MTA doktori címre. A dolgozat kiváló minősége és a dolgozat alapjául szolgáló közlemények mutatják, hogy Dr. Urbán Edit egész tudományos munkásságát az anaerob baktériumok identifikálási lehetőségeinek fejlesztésére, illetve az anaerob baktériumok antibiotikum érzékenységének, rezisztenciájuk meghatározására, illetve a rezisztencia hátterében álló különböző mechanizmusok tisztázására és a komoly klinikai relevanciával járó *Clostridiodes difficile* törzsek molekuláris epidemiológiai vizsgálatának szentelte.

Dr Urbán Edit a dolgozatában a humánpathogén anaerob baktériumok közül három baktérium fajt/nemzetségt vizsgált mélyrehatóan a *Clostridiodes difficile* baktériumot, a *Bacteroide/Parabacteroides* nemzetséget, illetve a *Cutibacterium acne*-t. A disszertáció igényes összeállított és megszerkesztett munka, melynek logikus felépítése, könnyű követhetősége segíti az olvasót a megértésben.

A 161 oldalas disszertáció formailag a hagyományos szerkezetet követi. A Bevezetés rész áttekintést nyújt az anaereob baktériumok szerepéről a humán mikrobiomban, illetve a különböző megbetegedésekben játszott szerepét ismerteti. A két legjelentősebb anaerob baktérium a *Clostridiodes difficile* és *Bacteroides/Parabacteroides* nemzetségek tagjait jellemezte tulajdonságai, előfordulásuk, pathogenitásuk, toxin termelőképességük és fontosabb antibiotikum rezisztenciájuk alapján. A bevezetésben a MALDI-TOF-MS rendszer klinikai mikrobiológia laboratóriumi alkalmazási lehetőségeiről, indikációiról ír. Az Anyag és módszer részben a jelölt részletesen ismerteti a baktérium törzsek gyűjtését, eredetét, tenyésztését, antibiotikum érzékenységi vizsgálatát, a toxin kimutatás során alkalmazott szövettenyésztéses, kereskedelmi forgalomban használatos diagnosztikus tesztes és molekuláris technikákat. Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatokat követő molekuláris vizsgálatokról és a molekulárisepidemiológiai vizsgálatokról – ribotipizálás PCR technikával, multi-locus szekvencia tipizálás, 16sRNS gén szekvenálás – is részletes tájékoztatást ad. Végezetül pedig ismerteti a MALDI-TOF mérés kivitelezését és a klinikai izolátumok species-szintű meghatározását. A disszertáció 39 jól szerkesztett táblázatot és 9 színes ábrát tartalmaz, mely a jól megszerkesztett dolgozatot szépen kiegészíti.

Cím: 1085 Budapest, Üllői út. 26.
Postacím: 1085 Budapest, Üllői út. 26.; 1428 Budapest, Pf. 2.
Tel.: (06-1) 266-0454
E-mail: titkarsag.gfi@semmelweis-univ.hu

A disszertáció eredmények része tartalmilag három részre tagolódik. Az első részben a jelölt klinikai mintákból izolált *C. difficile* törzseket jellemez. Dr Urbán Edit Magyarországon elsőként jellemzett nagyszámú *C. difficile* törzset molekuláris módszerekkel, toxin-termelés kimutatására home-made PCR vizsgálatot validálva, hozzájárulva ezzel a *C. difficile* diagnosztika alapjainak a bevezetéséhez és meghonosításához Magyarországon. Felmérte mind időben, mind térben a toxin-termelő *C. difficile* Magyaroszágon előforduló ribotípusait, és megállapította, hogy míg 1998-ban a 087-es ribotípus volt a domináns, ezzel szemben, ennek helyét a 2000-es években a 014-es ribotípus vette át. Elsőként írta le a 027-es ribotípus magyarországi megjelenését, mely 2010-re a domináns ribotípussá vált és amely mellett számos, további 24 különböző ribotípus is megjelent, amelyek idővel a 027 ribotípus dominanciájának a csökkenéséhez vezettek.

A jelölt és munkacsoportja Magyarországon elsőként végzett *C. difficile* törzsek esetében antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat és megállapították, hogy mind az erythromycinnel, mind a clindamycinnel és moxifloxacinnel szemben megfigyelt rezisztencia arány magas, illetve a két vizsgált periodus alatt – 2002-2003 és 2006-2007 - nem változott a rezisztencia aránya szemben a nemzetközi megfigyelt növekvő tendenciával. Vizsgálataik során vancomycin és metronindazol rezisztens *C. diffcile* törzseket nem detektáltak. A vizsgált *C. difficile* törzsek fidaxomicinnel szembeni érzékenysége a vad törzsekre volt jellemző. Dr. Urbán Edit megvizsgálta az extraintestinális *C. difficile* fertőzések előfordulási arányát vizsgálati anyagukban és a hazai adatok korrelálva a nemzetközi adatokkal az összes *C. difficile* eset 0,57%-ban okoztak fertőzéseket. Ezekben az esetekben is az O27 törzs dominanciája volt a jellemző. A jelölt vizsgálatai megerősítették Magyarországon a *C. difficile* 027-es ribotípus gyakori előfordulását, mely igazolja a fokozott járványügyi teendők szükségességét és felhívja a figyelmet az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok elvégzésének szükségességére *C. difficile* fertőzések esetében is.

A disszertáció második részében *a Bacteroides/Parabacteroides* nemzetség vizsgálata során több európai országból gyűjtött minták antibiotikum érzékenységi vizsgálata ampicillinnel szemben magas, közel 100%-os rezisztenciát figyeltek meg, ezzel szemben az amoxicillin/klavulánsavval szemben a vizsgált izolátumoknak csupán 10,5 %-a volt rezisztens. A cefoxitin, tetracyclin és moxifloxacin rezisztencia jelenléte vizsgálataik alapján fajfüggő volt. A meropenem rezisztens törzsek aránya a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek között 7% és a *cfiA* gén hordozása pedig 8,5%-os volt. Clindamycinnel szemben 36,5%-os rezisztenciát detektáltak. A különböző antibiotikumokkal szemben megfigyelt rezisztenciák hátterében álló rezisztencia mechanizmusokat, rezisztencia gének jelenlétét vizsgálta a jelölt, többek között a fluorokinolon rezisztenciáért felelős *bexA* gén jelenlétét. Megállapította, hogy a nem fragilis *Bacteroides* izolátumok között mind a moxifloxacin rezisztens törzsek aránya, mind a *bexA* gén prevalenciája emelkedett volt. Hat multi-drug rezisztens *Bacteroides* törzset azonosítottak több mint 400 vizsgált *Bacteroides* törzs között. Az izolátumok 13%-a hordozta az enterotoxin termelésért felelős *bft* gént. Az izolátumok többsége a *bft* 1 gént hordozta, kisebb részük a *bft* 2-t és egy izolátum sem hordozta a *bft* 3 gént. A *bft* pozitív törzsek közül 23 hordozta parallel a *fpn* gént is, amely igazolja a fragipain kulcsszerepét az enterotoxin aktiválásban *B. fragilis* esetében. A jelölt azonosított továbbá egy *B. fragilis* törzset, mely mind a *cfiA* gént, mind a *bft* gént hordozta. A jelölt nemzetközi, európiai vizsgálatai alapján a *Bacteroides* törzseket eredetük és antibiotikum érzékenységük alapján négy csoportba: skandináv, nyugati,

mediterrán és keleti csoportba sorolta. A regionális különbségek a clindamycin és moxifloxacin esetében volt a legkifejezettebb. A clindamycin rezisztencia a mediterrán régióban, a moxifloxacin rezisztencia skandináv régióban volt a legkifejezetebb. A jelölt vizsgálatai megerősítik, hogy a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek esetében is elengedhetetlen az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok rutinszerű vizsgálata a széleskörben jelenlévő rezisztencia mechanizmusok miatt a sikeres antibiotikum kezelése érdekében.

A disszertáció harmadik részében a jelölt részletesen ismerteti eredményeit a MALDI-TOF MS alkalmazásának lehetőségeit az anaerob baktériumok diagnosztikájában. A jelölt és munkacsoportja alkalmazta először Magyarországon a MALDI-TOF MS rendszert anaerob a baktériumok species szintű identifikálására. Bizonyította, hogy a MALDI-TOF MS alkalmas a *B. fragilis* csoport tagjainak nagy pontosságú faj szintű identifikálására. A jelölt vizsgálatai alapján a *B. fragilis* izolátumok filogenetikailag *cfiA* pozitv és *cfiA* negatív Devizió I és Devizió II. csoportba sorolta jellegzetes törzs spektrum jellemzők alapján.

A jelölt bizonyította továbbá, hogy a MS-alapú tipizálási módszer alkalmas a *Cutibacterium acne* esetében az multi-lókusz szekvencia tipizálás eredményével megegyező típusok (IA, IB, II, III) azonosítására is. Ez a módszer alkalmas a klinikai mintákból a valódi pathogének és kontamináns törzsek elkülönítésére. A jelölt vizsgálatai és eredményei megerősítették, hogy a MALDI-TOF MS rendszer használata, alkalmazása az anaerob diagnosztika esetében a mikrobiológiai diagnosztikai laboratóriumokban elengedhetetlen.

A jelölt új eredményei:

1. A *C. difficile* törzsek toxin termelésének kimutatására saját PCR módszert fejlesztett ki.
2. Molekuláris módszerekkel kimutatta és jellemezte az 027 ribotípusú *C. difficile* törzset, majd a későbbiekben nyomon követte a *C. difficile* törzsek epidemiológia változásait Magyarországon
3. Nagyszámú *C. difficile* törzsek antibiotikum érzékenységi vizsgálatait Magyarországon elsőként végezte el és publikálta.
4. Elsőként vizsgálta Magyarországon az extraintestinális *C. difficile* fertőzések előfordulási gyakoriságát, toxin termelését és ribotípusát.
5. Elsőként vizsgálta nagyszámú *Bacteroides/Parabacteroides* csoportba tartozó izolátumok antibiotikum érzékenységét és kimutatta a rezisztens törzsek között a *cfi*, a *bexA* rezisztencia gének jelenlétét és a *bfp*, *fpn* virulencia gének jelenlétét is.
6. Elsőként bizonyította, hogy a MALDI-TOF MS rendszer alkalmas az anaerob baktériumok faj szintű azonosításán túl *Bacteroides fragilis* és *Cutibacterium acne* esetében tipizálási vizsgálatok elvégzésére is

Kérdéseim a jelölthöz:

1. Milyen jelenség állhat annak a hátterében, hogy míg a 2000-es évek elején még egy-egy domináns ribotípust figyeltek meg a *C. difficile* törzsek által okozott fertőzések hátterében, addig a 2010-es években már nem egy domináns ribotípust, hanem az előforduló ribotípusok nagy varianciáját észlelték?

2. A *Bacteroides/Parabacteroides* nemzetségben az antibiotikum érzékenység tekintetében nagy regionális eltéréseket mutatott ki a jelölt európai szinten, mely a Skandináv országokban a rezisztens törzsek nagyobb előfordulásával jellemezhető. Ezzel szemben a kiterjedt-spektrumú béta-laktamáz (ESBL) termelő és a karbapenemáz termelő *Enterobacteriaceae* törzsek előfordulás a Skandináv országokban alacsony. Ezt a Skandináv országok alacsony antibiotikum fogyasztásával indokolják. Ezzel szemben a *Bacteroides* törzsek moxifloxacin rezisztenciája a skandináv régióban kiemelkedően magas volt, illetve a cefoxitin rezisztencia Finnországban volt a legmagasabb. Mi áll ennek a jelenségnek a hátterében? Mely antibiotikumok felhasználása jellemző a Skandináv országokra, mely Magyarországra a humán és az állatgyógyászati antibiotikumok tekintetében?
3. A jelölt eredményei alapján a magyarországi *Bacteroides* törzsek közel 100%-a ampicillin rezisztensnek bizonyult, és csupán 4,5% volt amoxicillin/klavulánsavra rezisztens. Milyen rezisztencia mechanizmus állhat a *Bacteroides* törzsek amoxicillin/klavulánsav rezisztenciájának hátterében?
4. A jelölt adatai alapján a magyarországi *B. ovatus* izolátumok 16,66%-a meropenem rezisztensnek, a *B. thetaiotaomicron* törzsek 55,7%-a clindamycin rezisztensnek bizonyult. Mi áll ennek a jelenségnek a hátterében?
5. A *Bacteroides* törzsek esetében magyarázható-e a moxifloxacin rezisztencia a *bexA* MATE multi-drug efflux pumpa jelenlétével, ha a nem fragilis *Bacteroides* moxifloxacin rezisztens törzsek 38,9%-a, míg a nem fragilis *Bacteroides* moxifloxacin érzékeny törzsek 42,4%-a hordozta ezt a gént? Tekintettel arra, hogy a PCR vizsgálatok csak a *bexA* gén jelenlétét vizsgálják, és nem adnak információt annak expressziójáról, van-e arra vonatkozó adata a jelöltnek, illetve van-e nemzetközi adat arra vonatkozóan, hogy ezen törzsek esetében, milyen arányú volt a *bexA* gén expressziója? Milyen adatok vannak arra vonatkozóan, hogy a MATE multi-drug efflux pumpa expressziója, aktivitása indukálható-e, és ha igen akkor mivel? Tekintettel arra, hogy az efflux pumpák nem specifikusak egy-egy antibiotikumra, a MATE multi-drug efflux pumpa, milyen egyéb antibitokum ellen okozhat rezisztenciát?
6. A magyarországi gyűjteményből származó multi-drug rezisztens *Bacteroides* törzsek vizsgálata során milyen kritériumok alapján tekintették az izolátumokat multi-drug rezisztensnek?
7. A jelölt vizsgálatai és eredményei alapján az összes multi-drug rezisztens *Bacteroides* törzs hordozta a *tetQ* gént. A tetQ gén az irodalmi adatok alapján nagyon elterjedt, tekintettel a tetracyclin származékok széleskörű használatára a humán és állatgyógyászatban. Vizsgálták-e a nem MDR *Bacteroides* törzsek között a *tetQ* és *tetX* gének előfordulási gyakoriságát?
8. A jelölt vizsgálatai alapján a *B. ovatus* D92 törzs metronindazollal szemben rezisztenciát mutatott MIC értéke >=32 ug/ml volt, azonban a törzs a *nim* gént nem hordozta. Mi a jelölt véleménye, milyen rezisztencia mechanizmus állhatott a metronindazol rezisztencia hátterében?

9. A multi-drug rezisztens *Bacteroides* törzsek közül négy bizonyult moxifloxacin rezisztensnek, ezek közül egy *B. ovatus* törzs *bexA* gént hordozott. A *B. fragilis* SZ38 GyrA alegységében Ser82-Phe szubsztituciót igazoltak. A GyrA mutáció egymagában nem feltétlenül okoz magas szintű kinolon rezisztenciát. Történtek a vizsgálatok a QRDR régió más részeinek a vizsgálatára, vagy más rezisztencia mechnaizmusok feltárására?
10. A jelölt vizsgálta a *B. fragilis* törzsek jelentős patogenitási faktorainak az enterotoxin felszabadulásért és a cisztein proteáz termelésért felelős géneknek, a *fpn* és *cfi* géneknek a vizsgálatát. A két gén előfordulás között negatív korrelációt figyelt meg. Milyen jelenség állhat ennek a hátterében?
11. Kérem a jelöltet, hogy ismertesse milyen antibiotikum rezisztencia mechanizmusokat képes a MALDI-TOF MS rendszer detektálni és ismertesse a véleményét arról, hogy alkalmasnak tartaná-e a jövőben a MALDI-TOF MS rendszert, hogy antibiotikum rezisztencia vizsgálatokat végezzenek vele a rutin mikrobiológiai laboratóriumban?
12. Mi a jelölt véleménye arról, hogy a *Cutibacterium acne* példájára a jövőben a MALDI alkalmas lehet-e nozokomális fertőzések epidemiológiai nyomon követésére a kórházakban, továbbá mi a jelölt véleménye arról, hogy alkalmas-e a MALDI-TOF a *C. difficile* különböző ribotípusainak felismerésére?

Dr Urbán Edit az anaerob baktériumok diagnosztikájában, identifikálásában, a toxin kimutatásban és a különböző antibiotikum rezisztencia vizsgálatok és epidemiológiai vizsgálatok fejlesztésében, értékelésében és ezeknek a vizsgálatoknak a rutin laboratóriumi vizsgálatok között történő magyarországi meghonosításában jelentős, kiemelkedő szerepet játszott. A dolgozat dr Urbán Edit kimagasló tudományos életművét mutatja be. Kérdéseim a jelölthöz nem kritikai kérdések, hanem apró részletekre vonatkoznak és a mikrobiológiai diagnosztika jövőbeni lehetőségeit mérik fel, tekintettel az úttörő téma aktualitására.

Dr. Urbán Edit MTA doktori munkájának nyilvános vitára bocsátását, annak elfogadását és az MTA doktori cím odaítélését messzemenően támogatom.

Budapest, 2021. március 31.

Dr. Szabó Dóra
egyetemi tanár, az MTA doktora