Válaszok: Prof. Dr. Emri Tamásnak

Hálásan köszönöm Professzor Úr részletes, mindenre kiterjedő, alapos bírálatát. Köszönöm, hogy a bírálatában lényegre törően, tömören és teljes pontossággal foglalta össze a dolgozat megírásának fő céljait és mondanivalóját. Köszönetem kell kifejezni a hasznos kritikus megjegyzésekért és megállapításokért, amelyek azonban a dolgozatommal egyező, támogató véleményt fogalmaznak meg, a célkitűzéseimmel, mondanivalómmal és az értekezés tartalmával egyetértést mutatnak. Professzor Úr hiányolt egy olyan részt a Bevezetés elejéről, ahol a kutatás témáját fogalmazom meg és hogy miért ezt a kutatást választottam: ezt valóban a Célkitűzés fejezetben ismertettem. A tervezett vizsgálatok előzményére, jellemzőire és távlati céljaira részben a Bevezetés fejezetben tértem ki. Az Anyagok és Módszerek fejezet túlságosan hosszú, köszönöm ezt az észrevételt, azonban nagyon nehéz volt egy, az életművet összefoglaló dolgozatban valóban betartani a helyes arányokat.

A bírálatban megfogalmazott rendkívül építő jellegű kritikáival, formai észrevételeivel teljességgel egyetértek, azokat köszönettel elfogadom. Külön köszönöm a statisztikai hiányosságaimra felhívott figyelmet, a további kutatásaimban, publikációimban ezekre jóval nagyobb hangsúlyt helyezel.

Az alábbiakban egyenként válaszolom meg Professzor Úr kérdéseit.

1. Milyen okokra vezethető vissza a *C. difficile* egy-egy ribotípusa prevalenciájának gyors növekedése, vagy éppen visszaesése?

- Ezt a kérdést gyakorlatilag mindhárom opponens feltette, így a válaszom mindegyik opponens felé a következő:

- 2002-től a korábban ritka előfordulású, de virulensebb törzs megjelenése, az úgynevezett *Clostridioides difficile* NAP1/RT027 (észak-amerikai, pulzáltatott mezejű gélelektoforézis 1-es típusú: NAP1, vagy 027 ribotípus: RT027) alapjaiban változtatta meg a *C. difficile* fertőzések (CDI) epidemiológiáját. Ahhoz, hogy a ribotípus váltás lehetséges okait megérthessük, először is meg kellett ismerni az epidémiás ribotípusok elterjedésének lehetséges okait. Az RT027 törzsek elterjedésének számos oka lehet; az egyik lehetséges ok az, hogy ezek a törzsek nagyobb rezisztenciát mutatnak a fluorokinolonokkal szemben, mint más törzsek, a tetracyclinnel és az erythromycinnel szembeni rezisztencia mellett. Egy másik tényező, amely valószínűleg hozzájárult a terjedéshez, nem más, mint a trehalóz mint élelmiszer-adalékanyag bevezetése, amely nem sokkal a virulens törzsek, például az RT078 és az RT027 elterjedése előtt került piacra. Az RT027 törzsek egyetlen pont mutációt mutatnak a trehalóz represszorban, ami a trehalóz iránti érzékenység több mint 500-szoros növekedéséhez vezet. A trehalóz jelentősen növelte az RT027 törzsek virulenciáját a *C. difficile* infekciók (CDI) egérmodelljeiben is. Az Eyre és munkatársai által 2019-ben közölt vizsgálatok azonban nem találtak egyértelmű összefüggést a trehalóz-metabolizmus variánsai és a betegség súlyos manifesztációi között. Felvetődött, hogy az antibiotikum-kezelést követően a bél egészséges mikrobiotával történő újbóli kolonizációját gátolja a *C. difficile* által termelt fenol-származék, a p-krezol. A RT027 törzsek fokozott sporulációja, gyorsabb spóraképző képessége is hozzájárul az RT027 és más *C. difficile* törzsek között, a virulenciában megfigyelhető különbséghez.

- A hipervirulens RT027 *C. difficile* törzsek megjelenése a kórházi-fekvőbeteg ellátó környezetben, majd járványos elterjedése jelentős kórházi járványokhoz vezetett világszerte, amelyek megnövekedett morbiditással és számottevő mortalitással jártak együtt. Különösen a kórházban fekvő betegeknél és a tartós gondozási intézményekben élő egyéneknél nagyobb a kockázata a CDI kialakulásának, ahol a *C. difficile* fokozott expozíciója a felületek, az orvostechnikai eszközök és az egészségügyi személyzet, szobatársak magas *C. difficile* kolonizáltsága miatt alakulhat ki. Ezen kívül az antibiotikumok, protonpumpa-gátlók (PPI-k), daganatellenes kemoterápiás szerek alkalmazása, társbetegségek, például a rosszindulatú daganat vagy a gyulladásos bélbetegség szorosan összefüggenek a nozokómiális CDI kialakulásával. A nozokómiális CDI gazdasági hatása is óriási, ami az Egyesült Államokban évente egymilliárd dollár feletti, az Európai Unióban pedig évi hárommilliárd euró egészségügyi többletköltségeket eredményezett. Saját, 2013-ban publikált vizsgálataink során két kórház 151 CDI betegének dokumentációját tekintettük át CDI fertőzések kórházi költségeinek elemzése céljából. Egy átlagos CDI epizód növekményi költsége – az osztály típusától függően – akkor 130-150 ezer Ft volt.

- A fertőzés terjedésének megfékezése számos országban jelentős kihívást jelentett, így a nozokómiális CDI esetek számának drámai növekedése, az esetek súlyossága, a fatális végkimenetel és nem utolsósorban a fentebb ismertetett gazdasági okok miatt globálisan és országonként is igen jelentős állami támogatással bíró ún. nemzeti/országos *C. difficile* munkacsoportok alakultak. Nemzetközi (WHO, CDC, ECDC)/nemzeti irányelvek készültek a CDI pontos esetdefiníció meghatározására, a jelentési kötelezettségre, a diagnosztikai algoritmusokra, a kórházhigiénés előírások betartására, a megelőzésre vonatkozóan. Külön figyelmet kaptak a megelőzésre, a szűrésre, az antibiotikum surveillance-ra és a kórházhigiénés szabályok fokozott betartására és betartatására irányuló törekvések. A megfelelő és időben hozott infekciókontroll intézkedések és az antibiotikumok racionális alkalmazása együttesen voltak szükségesek ahhoz, hogy az epidémiás *C. difficile* terjedése megelőzhető, lassítható legyen.

- A CDI változó epidemiológiájára reflektálva, valamint a súlyos betegségekkel és rossz kimenetelekkel járó nagy járványok körüli aggodalom miatt 2007-től pld. Angliában minden Nemzeti Egészségügyi Szolgálat (NHS) kórház esetében kötelezővé tették, hogy jelentse az összes CDI-esetet. Államilag jóváhagyott célkitűzéseket határoztak meg a CDI-k kötelező csökkentése érdekében, a jelentett CDI-k számadatait hónapról hónapra nyilvánosan hozzáférhetővé tették akár a kórházi, akár a közösségi környezet esetében. Ez a felügyeleti rendszer magában foglalta azt, hogy minden angliai kórháznak be kell jelentenie a laboratórium által diagnosztizált összes CDI esetet. A CDI eseteit egy NHS diagnosztikai algoritmus határozta meg, amelynek tartalmaznia kellett egy toxinvizsgálati módszert. 2007 óta minden évben az egyes kórházakban meghatározták a CDI-k megengedett maximális célszámát, esetleges bírságokkal sújtva azokat az intézményeket, amelyek ezeket nem teljesítik. A drasztikus intézkedés hatására a CDI előfordulása az elmúlt évtizedben feltűnően csökkent Angliában (és az Egyesült Királyság egész területén). Hasonlóképpen, a jelentős morbiditással és mortalitással járó, gyakran a *C. difficile* 027-es ribotípus miatt bekövetkező CDI-járványok előfordulási gyakorisága jelentősen csökkent. Az angliai CDI-k 30%-os csökkentésének kezdeti célkitűzése messze túllépte; valójában a CDI-k ~75%-os csökkenését sikerült elérni.

- Hasonló intézkedések történtek hazánkban is, ahol az első szakmai konszenzuson alapuló Módszertani Irányelv 2011-ben, ennek átdolgozott változata 2016-ban jelent meg. Ezek az ajánlások nem csak a diagnosztikai és a terápiás ajánlásokat érintették, de szerepelt benne a kórházi *C. difficile* fertőzések kötelező bejelentésének surveillance modulja az Országos Szakmai Információs Rendszerben (OSZIR). Magyarországon 2012 óta jogszabály írja elő az egészségügyi ellátással összefüggő *C. difficile* fertőzések kötelező bejelentését a Nemzeti Nosocomialis Surveillance Rendszerbe (NNSR). A kórházak mind a saját intézményben szerzett, mind a más egészségügyi intézményből behurcolt CDI eseteket jelentik. Az irányelv részletezte a megelőzésre vonatkozó megfelelő infekciókontroll óvintézkedéseket is: kézhigiéné fertőtlenítő hatású (egyfázisú) folyékony szappannal, egyéni védőeszközök alkalmazása, a beteg elkülönítése, a környezet fertőtlenítése sporocid hatástartamú felületfertőtlenítő szerrel. Emellett hangsúlyt helyezett a megfelelő antibiotikum politika szükségességére, pl. fluorokinolonok, széles-spektrumú béta-laktámok és linkozamidok alkalmazásának kerülésére is. A kórházakban és a tartós gondozási intézményekben a *C. difficile* átvitelének és fertőzésének csökkentése érdekében az új betegek szűrése lehetőséget kínált a toxin-termelő törzs hordozók azonosítására és a többi páciens elkülönítésére, mely jelentősen csökkenteni tudta a kórházban szerzett CDI előfordulását.

- Ezen összetett intézkedések hatására világszerte jelentősen visszaszorult a kórházban szerzett CDI-k száma, így, a nagy járványok elmúltával a járványtörzs előfordulási aránya csökkent, ezzel egyidőben azonban a sporadikus, nem járványos, ún. közösségben szerzett (CA: Community Acquired) esetek száma/részaránya emelkedett. A CDI előfordulása egyre gyakoribbá vált a korábban alacsony rizikójú populációban, a fiatalabb életkorú, ambuláns betegeknél. Saját (SZTE KMDI beteganyaga) nem publikált adataink alapján a CA CDI esetek aránya 2000-ról 2014-re 2,5%-ról 33%-ra emelkedett.

-Mivel a fekvőbeteg intézményekben a járványok száma csökkent, a járványt okozó cirkuláló ribotípusok dominanciája is megváltozott, egyes ribotípusok az idővel mutálódtak is, így a hipervirulens RT027 ribotípus elveszítette kiemelt szerepét. A sporadikus esetek száma emelkedett, így a diverzebb, változatosabb eloszlású ribotípusok jelentek meg a populációban.

2. Mivel magyarázható, hogy viszonylag kis földrajzi távolságok (pld. Budapest-Szeged, Magyarország-Ausztria) esetén is jelentős eltérések lehetnek egyes ribotípusok gyakoriságában?

- A fertőző betegségek, járványok kialakulásához három alapvető tényező – *a fertőző forrás, a terjedési mód és a fogékony szervezet* – egyidejű megléte szükséges, melyeket a járványfolyamat elsődleges mozgatóerőinek neveznek. Azok a tényezők pedig, amelyek nem játszanak ilyen meghatározó szerepet a betegségek kialakulásában, de befolyásolják annak lezajlását, a másodlagos mozgatóerők. Nem meghatározóak a járvány kialakulása szempontjából, de befolyásolják annak gyakoriságát, súlyosságát, kiterjedését, időtartamát. A járványfolyamat másodlagos mozgatóerői természeti, környezeti (pl. klíma) és társadalmi tényezők (pl. lakásviszonyok) lehetnek, amelyek elősegíthetik vagy gátolhatják a járvány kialakulását, befolyásolják a kórokozó túlélését, változékonyságát, a fertőzési utakat és hatnak a hordozók viselkedésére. Ilyen környezeti tényezők lehetnek: pl. a hideg (légúti) és meleg

(enterális) környezet, társadalmi-emberi tényezők: települési és lakásviszonyok, személyi higiéné, állattartás, étkezési szokások, egészségügyi ellátó rendszer fejlettsége, a megelőző rendszer megléte, pszichoszociális tényezők (munka, stressz, stb.), munkahelyi tényezők, fertőzött munkahely (kórház, mikrobiológiai laboratórium, stb.). Igen jelentős tényező az utazás, a turizmus és a migráció is. Míg a kórokozó néhány törzse (illetve ezek közeli rokonai) úgynevezett klónokként széles körben elterjedtek és számos országban előfordulnak, mások csupán kisebb földrajzi területen találhatók meg. Az egyes klónok elterjedése sem állandó: képesek egymást adott területről kiszorítani, az adott időszakban széles körben elterjedt sikeres klónok jelenléte pedig egyes országokban az esethalmozódásokhoz, járványokhoz vezet.

A korábbi vizsgálatok is alátámasztják azt a tényt, hogy **viszonylag kis földrajzi távolságok (pld. régiók, városok között, ill. azonos városban lévő kórházak között) esetén is jelentős eltérések lehetnek egyes ribotípusok gyakoriságában:** az ECDIS (Európai Clostridium Difficile Study Group) Ed Kujper vezetésével 2008 novemberben 34 európai ország 106 laboratóriuma részvételével egy multicentrikus *C. difficile* vizsgálat során megállapították, hogy a *C. difficile* fertőzés előfordulása és a PCR ribotípusok megoszlása nagyban különbözött az európai kórházak között. Vizsgálatukban a RT027 epidémiás ribotípus kevésbé volt elterjedt, ezzel szemben a RT078 és RT018 típusok prevalenciája nőtt, a RT018-as kiemelkedő előfordulását három olasz kórházban előforduló magas aránya okozza. Ettől a vizsgálattól Barbut és munkatársai 2007-ben közölt adatai feltűnően különböztek: 14 európai ország 38 kórházából származó izolátumai között a RT001 és RT014 típusok voltak a legelterjedtebbek, majd ezt az RT027 és RT020 ribotípusok követték. Barbut és munkatársai arról számoltak be, hogy ebben az időszakban az RT078-as típus csak Görögországban volt domináns, míg Kujper tanulmányában már ez volt a harmadik leggyakoribb PCR-ribotípus Európában. A RT078-as típus ezen növekedése a humán populációban összhangban van hollandiai vizsgálatokkal melyek az RT078 jelenlétét mutatták ki hollandiai és Spanyol farmokon a hasmenésben szenvedő malacokban. Érdekes, hogy a RT078 emberi és állati izolátumai genetikailag nagyfokú rokonságban állnak egymással, ami alátámasztja azt a hipotézist, mely szerint nincsenek fajok közötti gátak a *C. difficile*-fertőzés számára.

- Herbert és mtsai 2019-ben megjelent közleményükben 5 nagy, nyugat-londoni kórház betegeiből származó *C. difficile* izolátumok ribotipizálását végezték el. A vizsgált periódusban (2011-2013) 86 különböző ribotípust azonosítottak: az RT002 és az RT015 volt a legelterjedtebb (22,5%) csak öt izolátum (0,7%) volt hipervirulens RT027. Eltéréseket találtak a különböző kórházak ribotípus megoszlásai között, még egy városrészen belül is. Megvizsgálták annak lehetőségét, hogy a fokozott mortalitással járó RT220 izolátumok esetleg valamilyen járványhoz társulnak; ezt a ribotípust azonban a teljes vizsgálati időszakban, több helyszínről és különböző kórházi osztályokról izolálták illetve több esetben járóbetegekből, közösségben szerzett infekciókból mutatták ki. Az RT220 izolátumok genom-szekvenálása nem mutatott összefüggést az izolátumok között, megerősítve, hogy ezek a törzsek nem járványos elterjedésűek voltak. Az RT002 és RT015 dominanciája a klinikai betegekben szembetűnő volt, azonban az okokat nem egészen tudták értelmezni. Az RT002 túlsúlyáról az Egyesült Királyságban, Európában és Ázsiában számoltak be és ezt az RT002 magasabb sporulációs gyakoriságával magyarázzák, hasonlóan az RT027 járványtörzsekhez.

Feltételezhető, hogy az RT027 mint fő járvány-asszociált ribotípus regressziója releváns lehet az új ribotípus vonalak bővülésében.

- A 2012-13-ban zajló EUCLID study vizsgálta a kapcsolatot az európai ribotípusok sokfélesége és a 027 ribotípus prevalenciája között és azt tapasztalták, hogy a ribotípusok diverzitása csökkent, amennyiben a RT027 prevalenciája nőtt. Ugyanazt az elemzést 14 ország 001/072 ribotípusánál is elvégezték, de nem figyeltek meg nyilvánvaló lineáris kapcsolatot az egyes országok ribotípus sokfélesége és a RT001/072 prevalenciája között. Összességében ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy azokban az országokban, ahol a 027-es ribotípus törzsek nagy gyakorisággal fordulnak elő, a ribotípus-változatosság alacsonyabb, mint azokban az országokban, ahol a 027-es ribotípus előfordulása alacsony. Nem figyeltek meg egyértelmű különbséget a ribotípus eloszlásában, amikor a *C. difficile* szabad toxinra pozitív eredményt mutató székletmintákat összehasonlították a toxint nem termelő *C. difficile* törzseket hordozók mintáival. Ez arra utal, hogy nincs észlelhető különbség azokban a ribotípusokban, amelyek a CDI-t okozzák és a kolonizáló törzsek ribotípusai között.

- Érdekes lenne a különböző *C. difficile* ribotípusok által okozott infekciók adatait részletesebben vizsgálni: a CDI-eseteknél megfigyelt ribotípus-megoszlás eltérései a betegek korcsoportjai között arra is utalnak, hogy egyes ribotípusok nagyobb valószínűséggel okoznak infekciót bizonyos korosztályokban. Figyelemre méltó a RT027 prevalenciájának szignifikáns csökkenése a beteg életkorának növekedésével, ami talán ellentmond az idős betegeknél az ezen típushoz kapcsolódó rosszabb klinikai kimenetelnek. Lehetséges, hogy az adatok a *C. difficile* szelekciós nyomásának életkor szerinti különbségeit tükrözik; például magas CDI-kockázatú antibiotikumok ritkább alkalmazása idős betegeknél. Úgy tűnt, hogy az általános ribotípus diverzitás az életkor előrehaladtával növekszik, ami összefüggésben lehet a ribotípus sokféleség és a RT027 prevalencia közötti megfigyelt inverz korrelációval.

3. A szegedi minták tulajdonságai több vizsgálatban is jelentős eltérést mutattak a többi régióétól. Ennek pusztán technikai okai voltak (Szeged esetében gyűlt össze olyan számú minta, hogy a régiók közötti különbségek kimutathatóvá váltak), vagy a szegedi izolátumok valóban jobban eltérnek a többi régiótól, mint azon régiók egymástól? Ha ez utóbbi esetről van/lehet szó, mi állhat a háttérben?

- A hazai *Bacteroides* rezisztencia vizsgálat során azt kértük a résztvevő laboratóriumoktól, hogy egy adott időponttól kezdve gyűjtsenek össze a rutin diagnosztikából 100, egymást követő nem duplikátum (egy betegtől csak az elsőként izolált törzs) valódi patogén klinikai izolátumot. Nyilván az a laboratórium, amelynek nagyobb az anaerob mintaszáma, rövidebb időn belül gyűjtötte össze az adott 100 törzset, míg esetleg a másik laboratórium számára ez több időt vett igénybe. Az ilyen jellegű epidemiológiai vizsgálatok mindig az adott területre, az adott időszakra és betegpopulációra jellemzőek. A geográfiai eltérésnek egyrész oka lehet a kis esetszám - mindössze 4x100 törzset vizsgáltunk 4 régióból -, az eltérő antibiotikum felhasználás, illetve az eltérő betegpopuláció. Szegedi gyógyszerész munkacsoport (Benkő Ria és mtsai) vizsgálta a hazai kórházi antibiotikum-alkalmazást az elmúlt két évtizedben. A fekvőbetegszektor antibiotikum-felhasználása az elmúlt 20 évben mennyiségileg kiegyenlített volt, mintázata azonban folyamatos változáson ment keresztül. Megfigyelték a parenterális

készítmények alkalmazásának emelkedését és jelentős regionális különbségeket tapasztaltak az alkalmazott antibiotikumok között. A szegedi régió esetében a SZTE Klinikai Központ beteganyagából származó minták kerültek be a vizsgálatba, ahol meglehetősen nagy a külföldi (szerb, horvát, román, ukrán) betegek száma, illetve azon műtétek aránya, amelyeket ezeken a betegeken végeznek. Például a Szegeden izolált 5 MDR törzs közül 4 származott sebészeti beavatkozásból, egy pedig nőgyógyászati esetből, ezen betegek átlagéletkora 68,6 év volt. A regionális eltérések okainak kérdése további vizsgálatokat igényelne, hazai szinten is meglehetősen kevés azoknak a kutatásoknak a száma, ahol azt vizsgálják, hogy az antibiotikum felhasználásnak, az infekciókontrollnak, vagy más expozíciónak a módosítása miként befolyásolhatja az egyes baktériumok antibiotikum rezisztenciáját.

4. Van-e irodalmi adat/elképzelés arról, hogy milyen evolúciós előnyt jelent az endotoxinok termelése egy, a humán mikrobiom részét képező (anaerob) baktérium számára?

- Irodalmi adatok szerint a Gram negatív baktériumokban (különösen a bél mikrobiota részét képező anaerob baktériumok esetében) az LPS speciális módosulásai finoman szabályozhatják a lokális gyulladásos immunválaszt és tolerogén környezetet hoznak létre a bélben, ezáltal elősegítik saját maguk és a mikrobiom közösség egyéb tagjainak túlélését.

- A humán bél mikrobiota nagy számban tartalmaz mikrobákat, ezek ártalmatlan kommenzálisok de akár patogén mikroorganizmusok is lehetnek, így kiemelt fontosságú, hogy az immunrendszer képes legyen arra, hogy minőségileg és mennyiségileg is eltérő válasz adjon a patogén mikrobákra. Az anti-mikrobiális immunválasz legfontosabb aktivátorai a mintázatfelismerő receptorokat (Pattern Recognition Receptor, PRR) aktiváló struktúrák: a MAMP (Microbe Associated Molecular Pattern) vagy PAMP-ok (Pathogen Associated Molecular Pattern). Ezeknek a MAMP-oknak egyik legjelentősebb képviselője az LPS, melyet az immun sejtek felszínén található Toll-like receptorok (TLR), főleg a TLR4/MD-2 (myeloid differentiation factor 2) komplex ismer fel. A TLR aktivációja a sejtben proinflammatorikus citokin felszabadulást (TNF alfa, IL-1), interferon alfa és béta termelést és fokozott kemokin expressziót vált ki és elősegíti a mikroba eliminációját. Mindemellett az LPS intracellulárian aktiválhatja a caspase útvonalat és a fertőzött sejt gyulladásos apoptozisát eredményezheti (pyroptosis). A normál bél mikrobiota szempontjából ennek a gyulladásos immunválasznak az aktivációja kedvezőtlen, hiszen az a bakteriális közösség eliminációjához vezetne, ezért a kommenzális baktériumok az evolúció során az LPS módosításának egész arzenálját fejlesztették ki, amely révén a lokális immunválaszt finoman szabályozni vagy gátolni képesek, így elősegítve saját maguk és a mikrobiális közösség tagjainak túlélését.

<u>- I. Az LPS módosulások szerepe a gazdaszervezet immunválaszának szabályozásában:</u>

1. Lipid-A módosulása: Mivel a TLR4/MD-2 komplex elsősorban a lipid-A-t ismeri fel, így ennek a struktúrának a módosulása markáns hatással bír az immunválasz aktivációja szempontjából. Ismert, hogy a lipid-A acilációja és foszforilációja nagy variabilitást mutat az egyes speciesek között, korábbi kutatások pedig kimutatták, hogy a hypo-acilált és hypo/mono-foszforilált lipid-A gyengén vagy egyáltalán nem képes az immunválaszt aktiválni. Kimutatták, hogy a bél mikrobiota részét képező *Bacteroides* speciesekben (pld. *B. thetaiotaomicron, B.*

fragilis, B. dorei és *B. vulgatus, B. ovatus, B. uniformis*..stb) a lipid-A tetra-, vagy penta-acylált és monofoszforilált (Hennezel 2017; DiLorenzo 2019; Lin 2020), ellentétben a *Proteobacteria* phylum hexa-, vagy hepta-acylált *Proteobacteria* és *Enterobacteriales* speciesekkel (pld. *Escherichia, Salmonella, Enterobacter, Shigella, Klebsiella, Proteus, Serratia).* Mindemellett Hennezel és munkatársai azt találták, hogy a teljes bél mikrobiom LPS (amelyet döntően a *Bacteriodetes* phylumba tartozó mikrobák LPS-e alkot) nemhogy nem aktiválja az immunválaszt de egyenesen képes gátolni a TLR4-indukálta gyulladásos citokin termelést (Hennezel et al 2017). Tekintve, hogy bél mikrobiota által expresszált LPS (ugyan kis mennyiségben), de a keringésbe is bekerülhet, elképzelhető, hogy ez a keringő LPS a szisztémás immunválasz szabályozásában is részt vesz (Moreira et al. 2012).

2. Core oligoszacharid (core OS) módosulása: A core OS esetében a kémiai módosulások sokkal kevésbé változatosak, mint a poliszacharid O-Ag esetében. Megfigyelések szerint core OS-ben a heptóz motívum megléte vagy hiánya és a heptóz foszforilációs és a glikozilációs mintázata eltérhet a pathogén és a kommenzális baktériumok között, ami befolyásolhatja a core régió töltését, a membrán rigiditását és permeabilitását a hipofób anyagokkal szemben, azonban a core OS módosulások valódi funkcionális szerepe a bél normál mikrobiota evolúciójának szempontjából a mai napig nem tisztázott kérdés. Tekintve, hogy a *Bacteroidetes* phylum *B. fragilis és B. vulgatus* és *P. denticola* specieseiben a core OS-ről hiányzik a heptóz, így valószínű, hogy ennek a módosulásnak van valamilyen kedvező biológiai szerepe ezen mikroorganizmusok számára.

3. Variabilis O-specifikus oldallánc módosulása: Az O-specifikus oldallánc (O-antigén) esetében korábbi kutatások a monoszaccharidok és nem-cukor szubsztituensek változatos jelenlétét igazolták a bél baktériumok esetében. Míg ezen módosulások egy része széles körűen elterjedt az élővilágban, mások ritkák, vagy csak egy-egy specifikus O-láncban jelennek meg. Ezek az O-antigén struktúrák a gazdaszervezet O-glikánjaihoz lehetnek hasonlóak, így szerepet játszhatnak a molekuláris mimikri kialakításában, ezáltal is elősegítve az adaptív immunválasz kikerülését és a mikrobákkal szembeni tolerancia kialakítását. Az elmúlt évek irodalmi adatai arra utalnak, hogy az O-antigén defektív vagy trunkált LPS (R-LPS vagy lipooligoszaccharid) gyulladásgátló tulajdonsággal rendelkezik és probiotikus tulajdonsággal ruházhat fel bizonyos *E. coli* törzseket (Arribas 2009, és Guttsches 2012), ugyanakkor Browning 2013-as eredményei szerint a defektív O-antigén struktúra helyreállítása a patogén tulajdonság megjelenését eredményezheti.

<u>- II. Az LPS módosulások szerepe a bél homeosztázisának fenntartásában:</u>

Az LPS-nek a lokális immuntolerancia kiváltásán kívül sokkal szélesebb körű, evolúciósan kedvező hatása lehet a gazdaszervezet számára. Az LPS ugyanis nemcsak a mikroba elleni immunválasz szabályozásában és a lokális tolerancia kialakításában játszik szerepet, de a bél homeosztázisának fenntartásában is részt vesz. Ismert, hogy a Crypta Specifikus Core Microbiota =CSCM (elsősorban az *Acinetobacter, Stenotrophomonas* és *Delftia* speciesek), olyan LPS-t expresszál, ami a bél-kriptákban található őssejtek proliferációjának és apoptózisának szabályozásával a bél regenerációjában vesz részt. A limfoid szövet rezidens mikrobiota (pl. *Alcaligenes* törzsek a Peyer plakkokban) pedig olyan LPS-t termel, ami elősegíti

a gazdasejtekkel való szimbiózist, fokozza az IgA és a lokális IL-6 és IL-23 termelést, ezáltal hozzájárul az immunológiai homeosztázis és az immun surveillance fenntartásához a bélben.

- III. Az LPS védő szerepe az immunválasz érésében és az autoimmunitás megelőzésében:

Mivel a *Bacteroidetes* phylum tagjai nem-immunstimuláns LPS-t expresszálnak, így nem rendelkeznek olyan kritikus immun-szignálokkal, melyek az immunrendszer érésének korai életszakaszában az autoreaktív T sejt klónok túlélését segítenék elő. Mindezek miatt a későbbi életkor során fontos szerepet játszanak az autoimmunitás megelőzésében és az immunológiai egyensúly fenntartásában. Szekvenálási módszerekkel azt is igazolták, hogy az alacsony endotoxicitással rendelkező LPS - amit az olyan filogenetikai csoportba tartozó mikrobák termelnek, mint pld. a *Firmucutes* vagy a *Verrucomicrobia* - szerepet játszanak a regulatorikus T sejtek érésének elősegítésében, a Th1/Th17 gyulladásos immunválasz gátlásában és bél immun-homeosztázisának fenntartásában (Hill et al. 2010).

5. Mivel magyarázza a szakirodalom, hogy a *Bacteroides/Parabacteroides* fajok az anaerob kórokozó baktériumok között kiemelkedően sokféle rezisztencia mechanizmussal rendelkeznek? (Ismert-e, hogy milyen biológiai/ökológiai okok állhatnak e jelenség hátterében?)

- Az emberi vastagbélben található a legnagyobb baktériumpopuláció a humán szervezeten belül (meghaladja az 10^{11} organizmust/grammonként), a bél-mikrobióta többsége (99%-a) obligát anaerob baktérium; ezeknek mintegy 25%-a *Bacteroides/Parabacteroides* fajok közé tartozik. A *Bacteroidetes* a baktériumok egyik fő phyluma, már az evolúciós folyamat legelején jött létre, így a törzsfejlődés során sokféle mechanizmust alakítottak ki a genetikai információk cseréjére. A mobilis genetikai elemek gyakori jelenléte a *Bacteroides*-ban létfontosságú az antibiotikum-rezisztencia gének elterjedése szempontjából. A modern genomikai és proteomikai fejlődés nagyban megkönnyítette a *Bacteroides* fajok egyedülállóan adaptív természetének megértését: a *B. thetaiotaomicron* 2003-as (Xu et al. 2003) és a *B. fragilis* 2004-től 2005-ig terjedő szekvenálási projektjeinek (Cerdeno-Tarraga 2004; Kuwahara 2005) befejezése és az azt követő proteomikai elemzések jelentősen hozzájárultak ahhoz, hogy jobban megismerjük ezeket az organizmusokat. Amellett, hogy ezen fajok törzsei velünk élnek és rendkívül jótékony hatással lehetnek az emberi egészségre, elengedhetetlenek az emésztőrendszer megfelelő működéséhez, az immunrendszer éréséhez, igen fontos rezisztencia gén rezervoárként is működnek. Az általuk hordozott rezisztencia géneket továbbadják más, sokkal virulensebb baktériumoknak, olyanoknak is, amelyek csak ideiglenesen tartózkodnak a bélrendszerben, pld. a belélegzett, lenyelt légúti patogén baktériumoknak. "Ilyen szempontból az emberi vastagbél az eBay bakteriális megfelelője" - írta Abigail Salyers, a *Bacteroides* rezisztencia és rezisztencia transzfer szakértője. „Ahelyett, hogy új gént hozna létre nehéz úton - mutációval és természetes szelekcióval -, egyszerűen megállhat, és megszerezhet egy olyan rezisztenciagént, amelyet más baktériumok hoztak létre”.

- A klinikai mikrobiológiai diagnosztikai laboratóriumok által a *Bacteroides/Parabacteroides* fajok a leggyakrabban izolált anaerob baktériumok. A *B. fragilis* az úgynevezett “típus-organizmusa” az anaerob baktériumoknak és egy a törzsfejlődés során korán elvált bakteriális törzsnek, a *Bacteroidetes* phylumnak (korábban *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides*–CFB-

phylum), így gyakori izolálása miatt a kutatók által a *B. fragilis* a leggyakrabban vizsgált és legtöbb potens virulencia faktorral rendelkező anaerob Gram-negatív pálca.

- Napjainkra már számos tanulmány mutatta ki, hogy a *Bacteroides/Parabacteroides* speciesek mutatják a legmagasabb antibiotikum-rezisztencia arányokat, illetve a legtöbb antibiotikum-rezisztencia mechanizmussal rendelkeznek a bél mikrobiota többi anaerob baktériumához képest. A *Bacteroides* fajok kromoszómán kódolt és plazmid által közvetített rezisztencia mechanizmusokkal rendelkeznek és mobilis, mobilizálható genetikai elemek (transzpozoonok, konjugatív transzpozonok, plazmidok, integronok) révén könnyen megszerzik és átadják a rezisztencia géneket. A rezisztenciagéneket tartalmazó elemek rendkívül stabilak, még antibiotikum szelekciós nyomás hiányában is. Stabilitásuk fenntartásának egyik mechanizmusa lehet a gének integronba szerveződése, ahol az antibiotikum-rezisztencia génjei ugyanabban az integronban helyezkednek el, mint például azok az enzim termeléséért felelős gének, amelyek előnyt jelentenek a baktérium számára (például a hatékony kolonizáció képessége). Ezen mobilis genetikai elemek átadásának képessége, például a tetracyclin azon képességével párosulva, hogy indukálja ezen elemek átadását, valószínűvé teszi, hogy az alacsony tetracyclin szintnek kitett baktériumok hajlamosak lesznek ezeket az elemeket más baktériumoknak átadni, amelyek korábban ezeket a géneket elveszíthették.

- Az irodalmi adatok alapján a **plazmidok** nagyon gyakoriak a *Bacteroides* fajokban, és a törzsek ~20-50%-ában találhatók meg (Smith et al. 1998). A *Bacteroides* plazmidjai számos különböző antibiotikum-rezisztenciát okozó gént hordoznak, úgymint az egyes *nim* rezisztencia géneket, amelyek a metronidazol rezisztenciában játszanak szerepet. A klinikai izolátumok 6,4 kb-os plazmidján pedig a karbapenemekkel szemben rezisztenciát okozó *cfi*A-gént is találtak. A *Bacteroides uniformis* klinikai izolátumaiban magas szintű rezisztenciát okozó, transzferálható plazmidhoz kapcsolt kloramfenikol-acetil-transzferázt figyeltek meg.

- A **konjugatív transzpozonok** gyakorlatilag mindenütt jelen vannak a bacteroidesek között: a *Bacteroides* törzsek több mint 80%-a hordoz legalább egy konjugatív transzpozont (Shoemacker *et al* 2001). A *Bacteroides* konjugatív transzpozonjai (CTn) a kutatások alapján legalább két családhoz tartoznak. Amellett, hogy képesek beilleszkedni a kromoszómába, a *Bacteroides* konjugatív transzpozonok integrálják magukat a plazmidba és mobilizálhatják őket cisz-ben (azaz a fizikailag szomszédos entitásokra tudnak hatni) azáltal, hogy megkönnyítik a plazmid transzferét. Mobilizálhatják a korezident plazmidokat „transzban" azáltal, hogy olyan tényezőket szolgáltatnak, amelyek a plazmid transzferének megkönnyítéséhez szükségesek, miközben fizikailag elkülönülnek a plazmidtól. Egy adott törzs egynél több konjugatív transzpozont képes felhalmozni, ez bizonyíték arra, hogy a konjugatív transzpozon egynél több példányának jelenléte a törzsben a transzpozíció (transzaktiváció) stimulálását eredményezi. Elméletileg ez azt sugallja, hogy mivel az antibiotikum-rezisztencia génekkel rendelkező konjugatív transzpozonok felhalmozódnak a környezetben, ezeknek a géneknek a transzfere más baktériumok felé is fokozódik és az antibiotikum-rezisztencia jelentősen megnő. A konjugatív transzpozonok felelősek a tetracyclin és az erithromycin rezisztencia terjedéséért a *Bacteroides* klinikai izolátumaiban.

- A **mobilizálható transzpozonok**, csakúgy, mint a mobilizálható plazmidok, nem képesek önmaguk átadására, de a fajok között a TcR segítő elem jelenlétében tudnak transzferálni. A

leggyakoribb *Bacteroides* transzpozonok közé tartoznak a Tn4399, Tn4555 és a nem replikálódó *Bacteroides* egységek. A Tn4555 mobilizálható transzpozont először a *Bacteroides vulgatus* klinikai izolátumában végzett transzmissziós cefoxitin-rezisztencia vizsgálata során fedezték fel. A *B. thetaiotaomicron*-nak többféle mobilis genetikai eleme van: 33 kb-os plazmid, 63 transzpozáz és az önátadó konjugatív CTnDOT transzpozon négy homológja. CTnDOT közvetíti a tetracyclin és az erythromycin rezisztencia terjedését a *Bacteroides* spp valamint a *B. thetaiotaomicron* és a normál bél mikrobiota többi tagja között. Bár a VPI-5482 típusú törzs nem tartalmaz antibiotikum-rezisztencia géneket, négy konjugatív transzpozonja (CTns) van és ezeknek a CTns-eknek a jelenléte azt sugallja, hogy ezek az elemek hozzájárulhatnak a DNS horizontális transzferéhez a *B. thetaiotaomicron* és a disztális bél más bakteriális alkotóelemei között, elősegítve ezzel mikro-evolúciójukat.

6. Milyen előnyei, hátrányai vannak a geometriai MIC használatának?

Mértani (geometriai) középérték MIC

- A klinikumba már bevezetett, terápiás alkalmazást nyert vagy kutatott vegyületek *in vitro* hatékonyságának összehasonlításakor egyes kutatók a MIC geometriai átlagát alkalmazzák. A MIC geometriai középértékének kiszámításához az egyes törzsek MIC értékeinek logaritmusát összegzik, elosztva a tesztelt törzsek számával, majd antiloggelik. A geometriai MIC értéknek sokkal nagyobb a differenciáló ereje és átfogóbb képet ad, mint a MIC százalékos eloszlása:

- A különböző csoportok (pl. populációk vagy antibiotikumok) összehasonlítása során pusztán a MIC50, MIC75, MIC90 és a MIC tartomány megadása nem rendelkezik kellő diszkriminációs képességgel, mert eltérő MIC értékeket tartalmazó adatsorok esetében is azonos értékeket kaphatunk (szemléltetésként ld. 1. táblázat). Ennek a magyarázata, hogy statisztikai értelemben a MIC50 az adatsor medián, a MIC75 a felső kvartilis és a MIC90 pedig a 90 percentilis értéknek felelnek meg. Mind a medián, a kvartilis és a percentilis értékek olyan tipikus számértékek, amik nem függenek az adatsor összes számértéktől, nagyságukat csupán az értékeknek a rangsorban való elhelyezkedése határozza meg, ezért helyzeti értékeknek is nevezik őket. A helyzeti középértékekkel (medián, módusz) ellentétben a számított középértékek (számtani, mértani, harmonikus és négyzetes átlag) algebrai kapcsolatban állnak az adatsorban szereplő valamennyi számértékkel, ezért pontosabban mutatják az adatsor közepes helyét. Tekintve, hogy a MIC értékeket a felező hígításnak megfelelően adjuk meg, így az adatsorban szereplő MIC értékek egymással szorzatszerű viszonyban állnak, ezért a MIC adatsor leírására a különféle középértékek közül a mértani középérték a legalkalmasabb. A mértani középértéket az extrém, kilógó értékek kevéssé befolyásolják, továbbá jól alkalmazhatók arányos növekedést mutató vagy normalizált adatsorok összehasonlítására is.

1. táblázat: MIC értékek megoszlása két tetszőleges (A és B) csoport esetében

MIC érték (µg/ml)	**A (n=40)**	**B (n=40)**
0,5	11	1
1	8	2
2	10	18
4	6	12
8	0	2
16	0	0
32	0	
64	3	2
128	2	3
MIC_{50} (µg/ml)	2	2
MIC_{75} (µg/ml)	4	4
MIC_{90} (µg/ml)	64	64
MIC tartomány (µg/ml)	0,5-128	0,5-128
mértani középérték MIC (µg/ml)	2,1	4

Végezetül, szeretném ismételten megköszönni Professzor Úrnak, hogy dolgozatom nagyon részletes bírálatát összeállította. Külön köszönöm azokat a megjegyzéseit, amik a vizsgálatainkban alkalmazott statisztikai módszerek fejlesztési lehetőségeire hívták fel a figyelmet. Hálás vagyok bírálói munkájáért, építő észrevételeiért és tisztelettel kérem válaszaim szíves elfogadását.

Zsoldiné dr. Urbán Edit

Pécs 2021. július 01.