

# Vélemény

Dr. Szabó Dóra

„Béta-laktám rezisztens Gram-negatív baktériumok vizsgálata”  
című doktori értekezéséről.

Dr. Szabó Dóra MTA doktori értekezésében összefoglalt tudományos eredmények egyenes folytatását képezik tudományos munkája kezdetén összegyűjtött megfigyeléseknek és kísérleteknek (sikeres PhD védés 2002-ben). A mikrobiológiai kutatások egy olyan fontos kérdését tárgyalja, mely komoly kihatással van a Gram-negatív baktériumok okozta súlyos infekciók, sokszor noszokómiális infekciók esetében a megfelelő antibiotikum terápia választására. A világszerte megfigyelhető, így hazánkat is érintő béta-laktám rezisztencia terjedés a Gram-negatív baktériumok körében, mely sokszor együtt jár más antibiotikumokkal szembeni rezisztencia terjedésével is. A kérdés komoly figyelmet érdemel különös tekintettel a törzsek terjedésének epidemiológiájára, a béta-laktamáz enzimek evolúciójára, a kapcsolt rezisztenciák megjelenésére és terjedésére, valamint a terápiás lehetőségek vizsgálatára vonatkozóan.

A disszertáció hagyományos formában készült, 172 oldalon, azaz nem a megjelent közlemények összefűzött és egy magyar nyelvű összefoglalással kiegészített változatát kapta kézhez a bíráló, hanem a disszertáció témájához tartozó kísérletek minden részlete, módszertani háttere, eredményei és az eredmények diszkussziója is részletesen kidolgozásra került. A 8 oldalas tartalomjegyzék már jelzi, hogy a jelölt egy nagyon tagolt, az egyes témákat nagyon kis fejezetekre bontó módon építette fel a mondanivalóját, így néhány alfejezet mindössze két-három rövid mondatból áll. A túlzott tagoltság különösen a módszerek és az eredmények fejezetben zavaró az olvasó számára.

A következő 3 oldalon részletes rövidítés jegyzéket találunk, ezt követi a táblázatok és ábrák jegyzéke 5 oldalon.

Az irodalmi áttekintés (bevezetés) 13 oldalon foglalja össze a béta-laktám antibiotikumokat és azok történetét, a velük szembeni rezisztencia mechanizmusokat, elsősorban a vizsgálatok szempontjából fontos béta-laktamáz enzimek rendszerét, tulajdonságait, szubsztrát spektrumuk alakulását befolyásoló tényezőket, valamint a

csökkent permeabilitáson, efflux pumpa mechanizmusokon alapuló rezisztenciát. A fejezet olvasmányos, jó összefoglalását ad a jelenlegi ismeretekről, amit igen gazdag irodalmi hivatkozással is alátámaszt a jelölt.

A célkitűzéseket 3 oldalon 6 pontban fogalmazza meg a jelölt, mely segít, majd az eredmények és a megbeszélés tárgyalása során is melyek ugyan ezen rendszer szerint épülnek fel.

Az anyagok és módszerek fejezet (15 oldal) részletesen ismerteti a széles tárházát azoknak az *in vitro* módszereknek (különböző hagyományos és molekuláris genetikai, biokémiai módszerek), melyeket a kísérletek során alkalmazott. A molekuláris genetikai módszerek széles tárházát alkalmazza a kísérletek során a gének detektálásától a törzsek tipizálásáig. A mikrobiológiai módszerek mellett epidemiológiai analízisre is sor került a járványt okozó ESBL termelő törzsekkel fertőzött egyéneknél, valamint állatkísérletekben *in vivo* követte az ESBL termelő törzsek okozta infekciók esetében választott antibiotikum terápia hatékonyságát. A választott módszerek modernnek és mind az *in vitro* mind az *in vivo* eljárások alkalmasak a feltett kérdések megválaszolására, a célkitűzések sikeres megvalósítására.

Az eredmények fejezet (70 oldal) felépítése hat részből áll a célkitűzéseknek megfelelően.

**1. Téma:** Epidemiológiai vizsgálatokkal követték az ESBL termelő Gram-negatív baktériumok előfordulását egy Perinatális Intenzív osztályon (Szolnok), ahol egy ESBL termelő *K. pneumoniae* törzs mint kolonizáló, illetve egyes betegek esetében mint kórokozó jelentkezett. Másrészt hosszú távú követéses vizsgálattal mérték fel az ESBL termelő *K. pneumoniae* törzsek mellett más ESBL termelő Gram-negatív törzsek (mint kolonizáló vagy kórokozó) előfordulását a Semmelweis Egyetem II. Perinatális Intenzív Centrumában. Igazolták az ESBL termelésért felelős plazmidon kódolt gén egyik speciesből másik speciesbe történő átjutásának lehetőségét, valamint azt, hogy egyes ESBL termelő klonok hosszabb távon nem maradnak meg stabilan egy-egy osztályon hanem újabb ESBL termelő speciesek vehetik át a helyet. Ilyen hosszú távú (5 éves) követéses vizsgálat, kiegészítve a rutin eljárások mellett az ESBL termelését felelős gének molekuláris vizsgálatával, a hordozó klonok molekuláris tipizálásával, nem készült előzőekben Magyarországon.

#### **Kérdésem:**

1. A 6. táblázatban (56. oldal) ESBL-termelő *K. oxytoca* és *K. pneumoniae* törzsek okozta fertőzések rizikó tényezőit hasonlította össze, a 7. táblázatban (57. oldal) az ESBL-t nem

*termelő törzsek okozta infekciók rizikótényezőivel. Mivel magyarázza, ismerve ezen törzsek antibiotikum érzékenységét, hogy nem talált szignifikáns különbséget a mortalitásban? Van-e különbség a *K. oxytoca* és a *K. pneumoniae* törzsek okozta infekciók mortalitásában?*

*2. A 8. táblázatban csak az ESBL-termelő Klebsiella törzsekre vonatkozóan ad meg érzékenységi adatokat. Összesen egy-egy alcsoportba hány törzs tartozott?*

*3. Milyen terápiás választás történt az ESBL-termelő és nem termelő törzsekkel fertőzött ápoltak esetében?*

*4. Nem mutat a jelölt a disszertációban ezen törzsek tipizálására vonatkozó PFGE képet. Jó lenne a védésen az egyes PFGE típusba tartozónak talált kolonizáló és kórokozó törzsek összehasonlító vizsgálatát látni.*

**2. Téma:** Az ESBL termelés detektálására szolgáló módszerek használhatóságának vizsgálata során elsősorban az *Enterobacter cloacae* törzsek esetében hívja fel a figyelmet és támasztja alá kísérletes eredményekkel azt a tényt, hogy a screening módszerek nem mindig alkalmazhatóak hasonlóan más speciesekhez az ESBL termelés detektálására.

#### **Kérdésem:**

*5. Mely antibiotikumra vonatkoztatott  $\geq 2$  µg/ml MIC értéket tartja a jelölt alkalmasnak az *E. cloacae* törzsek esetén az ESBL termelés detektálására? (több helyen ennek megadása hiányzik (67 oldal 9. ábra, tézis füzet 18. oldal) Szükségesnek tartja-e a rutin klinikai mikrobiológiai diagnosztika vonatkozásában (terápiás javaslat adása szempontjából) ezen törzsek okozta infekciók esetén a termelt béta-laktamázok részletes differenciálását?*

**3. Téma:** Új ESBL enzimek izolálása című részben a jelölt részben különböző földrészekben részben itthon klinikai anyagokból izolált *Enterobacteriaceae* törzsek ESBL enzimeinek vizsgálata során új, eddig még le nem írt mutációk következtében új enzimeket tudott vizsgálni leírni és részletesen jellemzni

#### **Kérdésem :**

*6. Látott-e ezen vizsgálatok során az új enzimek és a már ismert ESBL variánsok között a terápiás választást is befolyásoló hatékonyságbeli különbséget?*

*7. Mi indokolta a különböző SHV mutánsokat tartalmazó pBCSK plazmiddal rendelkező *E. coli* törzs esetében az antibiotikum rezisztencia (MIC érték) agardilutiós módszerrel és *E* teszttel történő párhuzamos meghatározását?*

**4. téma:** A legkülönbözőbb ESBL termelő Gram-negatív törzsek kinolon rezisztenciáját és annak genetikai hátterét vizsgálták. A plazmidon kódolt és ESBL termeléssel együtt jelentkező kinolon rezisztenciát hazai *K. pneumoniae* törzsek kis százalékában találták meg.

**Kérdésem:**

8. A 29. táblázatban miért hiányzik a *K. pneumoniae* M88 eredeti törzs konjugációt követő kinolon rezisztencia adatai?

9. Mi a jelölt véleménye arra vonatkozóan, hogy milyen gyakran kell számolnunk az ESBL termelésen alapuló rezisztencia mellett a kapcsoltan jelentkező kinolon rezisztenciával az *Enterobacteriaceae* csoportba tartozó törzsek esetében? Követi-e az erre vonatkozó adatokat a hazai és a nemzetközi irodalomban? Lehet-e különbség az egyes speciesek között ebben a vonatkozásban?

**5. téma** A karbapenem rezisztens Gram-negatív baktériumok vizsgálatával foglalkozó rész nem csak a világviszonylatban és hazánkban is terjedő VIM, PER, és egyéb metallo-béta-laktamáz enzimek által előidézett karbapenem rezisztenciával foglalkozik, hanem főleg az ertapenem csökkent érzékenységet mutató baktériumok esetében igazolja a jelölt a külsőmembrán permeabilitás változáson, illetve a fokozott effluxpumpa mechanizmuson alapuló rezisztenciát is. Érdekes egy karbapenem terápia során rezisztenssé váló *E. cloacae* törzsszel végzett kísérlet sorozat, amikor az OmpD és OmpF fehérjék expressziójában történt változást figyelték meg. Kár, hogy a 20. ábrán nem lehet tudni hogy melyik érték tartozik a karbapenem terápia elején és a későbbiekben izolált törzsből (hiányos jelölés az ábrán!).

**Kérdésem:**

10. Mivel magyarázza a jelölt a fent vázolt változásokat a karbapenem (ertapenem) rezisztenciában? Jelenthetett-e ez terápiás kudarcot a beteg esetében?

11. Hogy látja a vizsgálatait alapján az *Enterobacteriaceae* vagy egyéb Gram-negatív törzsek esetében a karbapenem rezisztencia főleg a terjedő karbapenemáz enzim termelésen alapuló rezisztencia jelentőségét, vagy nagyobb szerepet fog kapni (esetleg kettős szelekció révén) a permeabilitási viszonyok megváltozásán alapuló rezisztencia mechanizmus?

**6. téma** az ESBL termelő törzsek okozta infekciók terápiás lehetőségeit vizsgálja állatkísérletes modellben. A megállapítások szerint az ESBL termelő törzsek okozta

infekcióban az imipenem, amikacin és kinolon terápia szóba jön megfelelő érzékenységi adatok esetén, a sokat vitatott 4. generációs cephalosporin, a cefepim adása nem javasolt, még abban az esetben sem, ha az in vitro vizsgálatok alapján a törzs érzékenynek tekinthető. A vizsgálatok kiterjedtek egy antimikrobás peptid az A3-APO vizsgálatára is. Egy ESBL termelő *E. coli* törzssel végzett kísérletek eredménye alapján az A3-APO hatékony potenciális jelöltje lehet a pre-klinikai és klinikai kipróbálásoknak ESBL termelő (multirezisztens baktériumok) okozta infekciókban hagyományos antibiotikummal kombinációban

### **Kérdésem:**

*12. Hogyan látja a jelölt a további lehetőségeket az egyre nagyobb számban megjelenő rezisztens, multirezisztens baktériumok okozta infekciók jövőbeni terápiájában?*

A megbeszélés fejezet (22 oldal) az eddigiekben ismertetett bontásban tárgyalja és veti össze a saját eredményeit a nemzetközi irodalomban megtalálható eredményekkel, kihangsúlyozva azokat az új megfigyeléseket, melyeket a jelölt és munkacsoportja kapott az ESBL termelő Gram-negatív törzsek vizsgálata során. A széleskörű irodalmi hivatkozások legtöbbje az utóbbi évekből származik, így megállapítható hogy a jelölt teljes mértékben tisztában van az általa feldogozott rezisztencia kérdéssel annak esetleges következményeivel.

302 releváns irodalmat tartalmazó jegyzék mellett a jelölt által a feldolgozott témában közölt cikkek jegyzéke (19 *in extenso* közlemény és 10 idézhető abstract) zárja a disszertációt.

Néhány általános és specifikus kritikai megjegyzés a disszertáció kivitelezésére, hiányosságaira, magyartalan kifejezésekre, bennragadt angol szavakra vonatkozóan:

61. oldal: „izolátumok izoelektromos pontját a 10. táblázatban mutatjuk be” helyett az „Izolátumok által termelt béta-aktamáz enzimek ....”

64. oldal: 7.2.1.3. pontban a z *E. cloacae* törzsek azonosságának vizsgálatát írja le PFGE módszerrel : Jó lett volna egy képpel ezt alátámasztani vagy a közleményre hivatkozni melyben közölték

A disszertáció nyelvezetében sok helyen érződik az angol eredetiről való fordítás (pl. 34 oldal 14. sor, 21 sor, 82. oldal 4. sor) vagy a szövegben az eredeti angol szó is benn marad (pl. 4. ábra fejléce)

65. oldal utolsó mondat befejezetlen majd a 67. oldalon folytatódik de érthetetlen,

67. oldal 10-11 sor ugyan csak érthetetlen

65. és 67. oldal pongyola megfogalmazás: „3/15-öt mérsékelten érzékenynek és 2/15-öt cefepim rezisztensnek...” , ugyan így „ $\geq 3$  MIC csökkenés esetén”

65. oldal: 8. ábra a molekulasúly markerek alig láthatók

67. oldal: 9. ábra esetében kimaradt a címből az antibiotikum neve, melyre az adatok vonatkoznak

66. oldal: 13 és 14 táblázat lábjegyzet javításra szorul

68. oldal: 15. táblázat lábjegyzetében \*\*\*cefepim breakpoint-ja.... Javítani kell cefepim rezisztencia breakpoint-ja, alatta lévő sor érthetetlen

59. oldal: 7 ábra a baktérium nevek döntése hiányzik

75. oldal: 7.3.1.1. „A TEM-131 antibiotikum érzékenysége” helyett „A TEM-131 termelő törzs antibiotikum érzékenysége”

85. és 86. oldal: 15, 16, 17, ábra címében fel kell tüntetni, hogy hány törzs „kumulatív MIC” értékét tartalmazza.

87. oldal: a 28. táblázat címéből hiányzik hogy kinolonokra vonatkozó MIC értékekről lesz szó

86. oldal 15. sor hibás a táblázat száma

88. oldal: a 29 táblázatnál a szövegben tett említés mellett érdemes lett volna a táblázatban is feltüntetni az *E. coli* J53RIF<sup>R</sup> törzsre vonatkozó MIC értékeket a könnyebb összehasonlítás érdekében.

Mind ezek a hiányosságok, kritikai megjegyzések nem befolyásolják Dr. Szabó Dóra MTA doktori a disszertációjának tudományos értékét.

**Új és jelentős eredménynek értékelem:**

1. a hazai és nemzetközi kooperációban végzett kutatások során izolált ESBL termelő törzsek enzimjeinek fenotípusos és genotípusos detektálási módszereinek értékelését,
2. új ESBL enzimek (beleértve a carbapenem rezisztenciát okozó enzimeket is) izolálását és jellemzését, a megváltozott szubsztrátprofilért felelős mutációk kimutatását,
3. a plazmid mediálta kinolon rezisztencia előfordulásának detektálását és ezen rezisztencia ESBL termeléssel kapcsolt voltának hazai törzsekben való detektálását,
4. valamint az ESBL termelő törzsek okozta infekciók esetében alkalmazható terápia állat modellben történő vizsgálatát.

Ezek alapján az a véleményem, hogy Dr. Szabó Dóra „Béta-laktám rezisztens Gram-negatív baktériumok vizsgálata” című MTA doktori értekezése megfelel az MTA doktori követelményrendszerben foglaltaknak, hasznos új eredményeket hozott, így javaslom a nyilvános vitára bocsátását és sikeres védekezés esetén az MTA doktori cím oda ítéelését.

Szeged, 2012 február 26

Prof. Dr. Nagy Erzsébet  
az orvostudomány doktora