

## Válasz Prof. Dr Márialigeti Károly opponensi véleményére

Köszönöm Márialigeti Károly Professor Úrnak, hogy doktori értekezésemet részletesen áttanulmányozta, köszönöm méltató szavait és építő jellegű megjegyzéseit és észrevételeit.

Köszönöm, hogy az értekezés nyilvános vitára bocsátását és az MTA doktora cím odaítélését javasolta. Megjegyzéseire és kérdéseire válaszaim sorrendben a következők:

**1. Kérdésem a 28. lap egyik állítására vonatkozik. Ezt írja: "Annak ellenére, hogy mind az MBL, mind a KPC enzimek jól bontják a karbapenemeket, az Enterobacteriaceae törzseknél sokszor nem alakítanak ki rezisztens genotípust, ezért felismerésük problémát jelent a mindennapi gyakorlatban." Kérem, ismertesse, hogy mi lehet az érzékeny fenotípus fennmaradásának az oka, valamint, hogy vannak e technikáink a szabályozási rendszerek működésének vizsgálatára!**

A Professor Úr által feltett kérdésben valószínűleg elütés miatt hibásan szerepel a genotípus szó a fenotípus helyett. Válaszomat úgy adom meg, mintha a kérdésben a fenotípus szó szerepelne. A béta-laktám antibiotikumokkal szembeni érzékeny fenotípus fennmaradásának oka azokban a baktérium törzsekben, melyek béta-laktamáz enzimet termelnek, többféle lehet. Egyrészt a baktériumok a béta-laktamáz enzimeket különböző mértékben expresszálhatják, illetve a különböző béta-laktamáz enzimek szubsztrát specifitása különböző, így a különböző béta-laktám antibiotikumokat különböző mértékben hidrolizálják. Ezáltal bizonyos antibiotikumokkal szemben rezisztenciát okozhatnak, míg másokkal szemben csak mérsékelt érzékenységet vagy akár érzékenységet is, *in vitro* megfigyelt hidrolitikus aktivitás mellett.

Az általam végzett vizsgálatok idejében még a nemzetközi – európai EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) és az amerikai CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) – ajánlások különböző szűrővizsgálatokat ajánlottak a béta-laktamáz enzimek szűrésére. A kiterjedt-spektrumú béta-laktamáz enzimek (extended-spectrum beta-lactamase ESBL) esetében a harmadik generációs cephalosporinokkal szemben mért MIC (minimal inhibitory concentration) értékek és a harmadik generációs cephalosporinok + béta-laktamáz gátló (pl. klavulánsav) MIC értékét hasonlítottuk össze. Ha a MIC érték csökkenése gátlószer jelenlétében több, mint két hígítás volt, a törzset ESBL-termelőnek kellett tekinteni

és függetlenül a mért MIC értékektől az összes cephalosporinra rezisztensnek kellett interpretálni.

A karbapenemáz termelés fenotípusos szűrére a nemzetközi ajánlások az ún Hodge tesztet ajánlották. Ennek pozitívítása esetén további genotípusos vizsgálatok elvégzése volt ajánlott a karbapenemáz enzim típusának a meghatározására.

A rutin laboratóriumban nemcsak ezek a tesztek, hanem további tesztek – pl.:kettős-korong diffúziós teszt- is széles körben elterjedtek voltak a különböző béta-laktamáz enzimek termelésének felismerésére.

Fontosnak tartom továbbá megjegyezni, hogy az érzékeny és rezisztens fenotípus definiálása folyamatosan változik. 2011 óta több éves vitát és egyeztetést követően a legújabb ajánlások már eltekintenek a különböző szűrőtechnikák alkalmazásától. Jelenleg az antibiotikum érzékenység interpretálása az adott baktérium adott antibiotikummal szemben tapasztalt MIC értéke alapján történik, és az ajánlások minden évben felülvizsgálatra kerülnek.

## ***2. Lényeges ismeretnek tartanám pl. a szérum antibiotikum szint HPLC kimutatás protokollját is (legalább citáció szintjén).***

Elnézést kérek, hogy a HPLC protokolljára vonatkozó irodalmak kimaradtak a dolgozatból. A ciprofloxacin és levofloxacin szérumszintjének meghatározása HPLC segítségével a következő két referencia alapján történt, melyeket a publikációban is jelöltem (Curr Med Chem. 2002 Feb;9(4):437-42):

D. J. Lyon, S. W. Cheung, C. Y. Chan, and A. F. B. Cheng: Rapid HPLC assay of clinafloxacin, fleroxacin, levofloxacin, sparfloxacin and tosufloxacin. J. Antimicrob. Chemother. (1994) 34(3): 446-448.

Kraemer HJ, Gehrke R, Breithaupt A, Breithaupt H. Simultaneous quantification of cefotaxime, desacetylcefotaxime, ofloxacin and ciprofloxacin in ocular aqueous humor and in plasma by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 1997 Oct 24;700(1-2):147-53

***3. A szerző a baktériumtörzseket csak fenotípusos gyorstesztekkel identifikaálta. Nem gondolja-e, hogy különösen a kritikus törzsek esetében, esetleges új rezisztenciaturajdonságok leírásakor a molekuláris szintű identifikáció lényeges! Tisztában vagyok azzal, hogy eredményeit már publikációk minősítik. Ugyanakkor saját munkám alapján tudom, hogy a GenBank, EMBL stb. adatbázisok pontosan az identifikáció területén meglehetősen megbízhatatlanok.***

Az általunk használt identifikáló automaták/félautomaták – ATB-teszt, API20E és VITEK szerek a Gram-negatív baktériumok identifikálása során a használt identifikáló kártyáktól függően 20-41 biokémiai teszt segítségével identifikálnak. Ezek a tesztek a Gram-negatív baktériumok, elsősorban a bélbaktériumok identifikálására jól használhatók. Alkalmazásuk gyors, költségkímélő és könnyen kivitelezhető. Identifikálási nehézségek a Gram-pozitív baktériumok illetve a ritkábban előforduló ún. nem-fermentáló baktériumoknál esetében szoktak előfordulni.

Az általunk vizsgált baktériumok - *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Acinetobacter baumannii* – szerencsére nem tartoznak a nehezen identifikálható baktériumok közé, így a korábban felsorolt identifikációs teszteket használva azok 99,9%-os valószínűséggel kiadott „excellent identification” értékelésű eredményét minden esetben elfogadtuk. Miután nemzetközi publikációk is elfogadják a *Klebsiella* törzsek biokémia tesztekkel történő identifikálását (Hansen, D. S., H. M. Aucken, T. Abiola, and R. Podschun. 2004. Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3665-3669), így mi is elfogadtuk az eredményt, habár tisztában vagyunk vele, hogy az identifikálás „State of art”-ja a molekuláris szintű identifikálás.

A rRNS gének (16S, 23S és 5S) szekvenciájának –az ún. „highly conserved” szakaszainak a internal transcribed sequence (ITS)-nak - a meghatározása ideális a baktériumok identifikálására és evolúciós vizsgálatokra. (Gutell, R. R., N. Larsen, and C. R. Woese. 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol. Rev.* 58:10-26.; Barry, T., G. Collieran, M. Glennon, L. K. Dunican, and F. Gannon. 1991. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl.* 1:51-56.; Gürtler, V., and V. A. Stanisich. 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* 142:3-16.). PCR alapú ITS szekvenálást fejlesztettek ki *K. pneumoniae subsp. Pneumoniae* detektálására és identifikálására is, azonban a *Klebsiella* ITS régiójára vonatkozó információk 2007-ben még hiányosak voltak, hiszen a GenBankban mindössze 1 *K. oxytoca* ITS szekvenciája volt elérhető, és 9 *K. pneumoniae subsp. Pneumoniae* 21 IST szekvenciája állt rendelkezésre. Így egy elvégzett 16S-23 IST régió szekvenálás sem adott volna biztosabb eredményt, a hiányos adatbázisra való tekintettel. Jelenleg, 2012-ben 28 *K. pneumoniae subsp. Pneumoniae* 105 IST szekvenciája érhető el, és 6 *K. oxytoca* törzs 46 IST szekvenciája érhető el.

**4. A járványtani vizsgálatokat illetően megjegyzem, hogy a Szolnoki PIC törzsekkel végzett ERIC-PCR nem lehet AP-PCR, legfeljebb REP-PCR valamint, hogy az augusztusi incidencia visszaesés legalább egymondatos indoklást igényelne.**

Elnézést kérek, hogy az ERIC PCR-t AP-PCR-nek neveztem, hiszen mint az ERIC mozaikszó is mutatja- Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus - azaz intergénés palindrom szekvenciákra tervezett PCR vizsgálatról van szó, így a REP-PCR (repetitive extragenic palindromic) kifejezés lett volna helyes.

A szolnoki Hetényi Géza Kórház koraszülött intenzív osztályán az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek havi incidenciája a következőképpen alakult: júniusban 0,29, júliusban 1.07, augusztusban 0.84, szeptemberben 3.05, októberben 0.4 és novemberben 0.52. Két alkalommal volt megfigyelhető incidenciacsökkenés, egyrészt egy minimális csökkenés augusztusban, illetve egy jelentős csökkenés októberben. Ezek háttérben egyrészt az újabb fertőzések megelőzésére hozott intézkedések állhattak (június végén az osztályon felfüggesztették a ceftazidim empirikus használatát), másrészt pedig szeptemberben bevezették az ESBL pozitív betegek szigorú elkülönítését.

**5. Ami az SE ötéves elemzését illeti, pont itt kezdtem gondolkodni azon, hogy a „Klebsiella” fajok esetében egy genetikai fajmeghatározás vajon nem kelt volna-e el a PFGE mintázatok ilyen jeles átrendeződése kapcsán (szívesen láttam volna a gélképeket).**

Mivel ezekben az esetekben is a fenotípusos, biokémiai teszteken alapuló identifikálás teljesen egyértelmű volt, így a fentiekben elmondottak alapján nem tartottuk szükségesnek a genetikai fajmeghatározást.

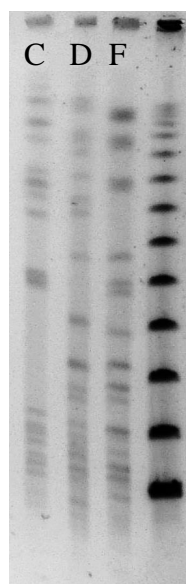
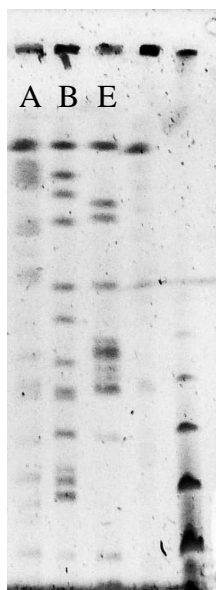
A Semmelweis Egyetem II. Újszülött Intenzív Osztályán az ötéves periódusa alatt izolált Klebsiella törzsek PFGE képét pedig az alábbiakban mellékelem:

*K. pneumoniae* törzsek

*K. oxytoca* törzsek

PFGE mintázata (A,B,E)

PFGE mintázata (C,D,F)



6. Az *ESBL* enzimek detektálását illetően azon morfondíroztam, hogy vajon az *ES 43-as* törzs plazmid mintázata miért *P2C* típusú, miért nem *P2B*.

Az *ES43-as* törzs plazmid mintázata valóban *P2B*, ahogy azt Professzor úr is látta. Elnézést kérek a táblázatban a plazmid mintázat jelölésének az elírásáért.

7. Vajon a „gének kópiaszáma” és a PCR-es detektálási valószínűség ilyen primeren függ-e össze, amint azt a szerző a 69. lapon leírja.

A gének kópiaszáma és a detektálási valószínűség közvetve összefügg. A gének eredeti kópia száma és a PCR termékben a végső kópiaszám közötti összefüggés a következő Rutledge és Cote publikációja alapján (Rutledge RG, Côté C.: *Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. Nucleic Acids Res. 2003 Aug 15;31(16):e93.*):

$$N=N_0(1+E)^n$$

Ahol „ $N_0$ ” a kezdő, „ $N$ ” a végső kópiaszám, „ $E$ ” pedig az amplifikációs hatékonyság jellemzője, mely 0 és 1 között változhat. Az „ $n$ ” pedig a ciklusok száma az amplifikációs reakcióban.

A végső kópiaszám elsősorban a kezdő kópiaszám és az amplifikációs hatékonyság függvénye. Az amplifikációs hatékonyságot azonban sok tényező befolyásolja: mint például a primerek affinitása a különböző allélekhez; a különböző DNS polimeráz enzimek affinitása a különböző allélekhez; az allélek kapcsolódási hőmérséklete és GC tartalma, a termék hossza stb. A ciklusok száma pedig a templát-termék arány megváltoztatásán keresztül befolyásolhatja az amplifikációt. Azonban az előbbieken felsorolt tényezőkön kívül még számos egyéb ismeretlen tényező is befolyásolhatja az amplifikációt. (Gonzalez JM, Portillo

MC, Belda-Ferre P, Mira A.: Amplification by PCR artificially reduces the proportion of the rare biosphere in microbial communities. *PLoS One*. 2012;7(1):e29973. Epub 2012 Jan 11.)

**8. Az új ESBL enzimek izolálását ismertető fejezet kapcsán az jutott eszembe, hogy vajon a klinikai laboratóriumi mikrobiológus mennyire vállal részt vizsgálataival a rezisztencia evolúciójának elősegítésében?**

A klinikai laboratóriumi mikrobiológusnak szerencsére nincs szerepe a rezisztencia evolúciójának elősegítésében, azonban annál nagyobb szerepe van a rezisztencia evolúciójának megfigyelésében, detektálásában és interpretálásban. Biztosítja a kialakuló, vagy terjedő rezisztencia időben történő detektálását a patogén és normálfóra tagjai között és jelzi a klinikusok és a higiénikusok felé.

**9. A kinolon rezisztencia adatait ismertető részben bizonytalanságot jelez, de nem értem a 15. és 16. ábrákat. Miért is kumulatív MIC értékeket láthatunk itt ábrázolva?**

A kumulatív MIC érték megmutatja, hogy egy vizsgált populációban az adott antibiotikum koncentráció a törzsek hány százalékának szaporodását gátolta. A grafikus ábrázolás szemléletesen mutatja az emelkedett MIC értékű baktériumok arányát akár az érzékenységi kategóriákon belül is. A farmakodinamikai/farmakokinetikai vizsgálatokhoz, különböző populációk összehasonlításához, különböző időintervallumok összehasonlításához javasolt módszer. A különböző kinolonok – ciprofloxacín, levofloxacín és moxifloxacín - kumulatív MIC értékeit ábrázolva a rezisztenciák mértéke, illetve az azok közötti különbség a leglátványosabban volt ábrázolható.

**10. Az egér modellel végzett kísérletek ismertetése során a 30. ábra mintha szöveges részeket takarna, amit a szöveg folytonossághiánya is jelez.**

Elnézést kérek a technikai problémáért, a 30. ábra valóban megtörte a szöveget. A szöveg helyesen így szól:

„Az első dózis imipenem a vér baktérium koncentrációját  $10^2$  CFU/ml-rel csökkentette, és a második dózis imipenem után a vér baktérium tartalma közelítette a  $10^3$  CFU/ml-es értéket, ami a detektálás alsó határa.”

**12. A PIC „Klebsiella” rezisztencia típusokat illetően a szerző megjegyzi, hogy a fertőzés lehetséges forrása az anya bélmikrobiótája. Elképzelhető-e értelmes módon ilyet szűrni?**

Igen, elvileg elképzelhető az anya bélflórájának a rutinszerű szűrése ESBL-termelő baktérium jelenlétére, azonban a rutinszerű szűrés bevezetése nem indokolt.

Irodalmi adatok alapján a rektális szűrés már csak egy megjelent ESBL járvány esetében javasolt a kolonizált betegek kiszűrése céljából (*Infect Control Hosp Epidemiol. 2004 Oct;25(10):838-41*).

**13. Az új ESBL enzimek kimutatása kapcsán a szerző diszkutálja a pontmutációk lehetséges molekul szerkezet módosító hatását. A bírálóban ugyanakkor nyitva maradt az a kérdés, hogy vajon az *Enterobacter cloacae* ES24 törzs esetében a 703-as pozíció két típusa vajon más-más plazmidon van jelen? Melyiken?**

Az *Enterobacter cloacae* ES24 törzs esetében az SHV gén 703-as pozícióján észlelt kétféle nukleotid –guanin és adenin –, kétféle SHV-típusú béta-laktamáz enzim termelést –az SHV-7 és SHV-30 béta-laktamáz enzim termelését jelentette.

Az SHV-30 enzim génje egy kb 9.4 kb méretű plazmidon helyezkedett el, mivel a transzformálás során kapott SHV-30 termelő *E. coli* DH10B törzs ezt a plazmidot tartalmazta. A transzformálás során nem sikerült SHV-7 termelő törzseket izolálnunk. Valószínű, hogy az SHV-7-t tartalmazó plazmid nem volt kompatibilis az általunk használt *E. coli* törzsszel. Mivel az SHV-30-as enzim egy új, addig le nem írt SHV enzim volt, így vizsgálataink során az új enzimre fókuszáltunk és további vizsgálatokat nem végeztünk arra vonatkozóan, hogy az eredeti ES24 törzs által párhuzamosan termelt SHV-7 enzim génje pontosan hol helyezkedett el. Feltételezzük, hogy az ES24 törzs által hordozott plazmidok valamelyikén.

**14. Nagyon érdekes kérdést vet fel az A3-APO peptid használata. Azt ugyanis, hogy egy „magic bullet” nem megfelelő időben és dózisban történő alkalmazása vajon nem okozhat-e emberben is letális „endotoxin sokkot”?**

Az A3-APO peptiddel általunk végzett állatkísérletek során azt feltételeztük, hogy az A3-APO esetleg endotoxin felszabadító hatással is bír, annak ellenére, hogy a hatásmechanizmusa alapján ez nem várható.

Endotoxin felszabadulást elsősorban a sejt felszintézist gátló antibiotikumok okoznak, és azok közül is a PBP3-hoz kötődő antibiotikumok (pl.: aztreonam, piperacillin, mezlocillin, továbbá cefuroxim, ceftazidim és cefotaxim alacsony koncentrációban) bírnak a legnagyobb mértékű endotoxin felszabadító hatással. Az ún „endotoxin shock”-ért az endotoxin által aktivált macrophágoknak a pro-inflammatorikus citokin: TNF $\alpha$ , IL-6 és IL-8 termelése a felelős. Az A3-APO peptid egyrészt a membrán dezintegritásán keresztül fejt ki sejtölő hatását, másrészt

intracellulárisan a fehérje funkciókat gátolja a DnaK hőszokk proteinek gátlása révén. Közismert más peptidről is, hogy csökkenti a pro-inflammatorikus citokinek szintjét (*Yu J, Mookherjee N, Wee K, et al. Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1 $\beta$ , augments immune responses by multiple pathways. J Immunol 2007; 179: 7684-7691.*). Az azóta megjelent, legfrissebb irodalmi adatok alapján, az A3-APO nem változtatja meg a macrophágok által termelt TNF $\alpha$  szintjét, de jelentősen megemeli az anti-inflammatorikus IL-10 és a sebgyógyulásban szerepet játszó IL-4 szintjét (*Ostorhazi E, Holub MC, Rozgonyi F, Harmos F, Cassone M, Wade JD, Otvos L Jr.: Broad-spectrum antimicrobial efficacy of peptide A3-APO in mouse models of multidrug-resistant wound and lung infections cannot be explained by in vitro activity against the pathogens involved. Int J Antimicrob Agents. 2011 May;37(5):480-4.*).

Végezetül a kérdésre a válaszom, hogy emberben is okozhat-e endotoxin sokkot, még nem bizonyított. Hiszen az alacsony vér baktérium csíraszám mellett megfigyelt magas halálozásban, az endotoxin szerepet játszhatott, de az endotoxin oki szerepét sem bizonyítani, sem cáfolni nem sikerült.

Végezetül ismét köszönöm Professzor Úr észrevételeit és pozitív véleményét a disszertációról.

Budapest, 2012-04-04

Tisztelettel:

Szabó Dóra