Válaszok Prof. Dr. Kónya József bírálatára és kérdéseire

Mindenekelőtt szeretném megköszönni Kónya József Professzor Úrnak a disszertációm gondos áttanulmányozását. Köszönöm az elismerő szavakat és az értékes kritikai észrevételeket.

Válaszaimat az alábbiakban fogalmazom meg:

1. Tekinthető-e *Clostridioides* (*Clostridium*) *difficile* az antibiotikum éra „emerging" azaz újonnan kialakuló betegségének, mióta okoz emberi megbetegedéseket?

- Igen, egyértelműen a *C. difficile* (CD) által okozott fertőzéseket az antibiotikum éra „emerging" infekciójának tartják, a CDC is az „emering infekciók" közé sorolja. A *Clostridioides difficile* fertőzés-felügyeleti programja aktív populációs és laboratóriumi megfigyelő rendszer, amelyet a CDC Emerging Infections Program (EIP) Healthcare-Associated Infections Community Interface (HAIC) rendszerén keresztül hajtanak végre.

- Természetesen a kórokozó, mely velünk él a humán bél mikrobiota tagjaként, már valószínűleg évezredek óta okoz megbetegedéseket. Magát a pseudomembranosus colitis-kórképet 1893-ban Finney írta le először egy nőbeteg műtét utáni hasmenése kapcsán post mortem, azonban a kórképért felelős kórokozót még nem ismerte. Először 1935-ben Hall és O'Toole izolálta és fedezte fel az akkor még *Bacillus difficile*-nek nevezett kórokozót. 1974-ben Tedesco írta le a clindamycin kezelést követően kialakuló hasmenést, vagyis az antibiotikum kezelés következtében kialakuló hasmenéses eseteket (Antibiotic-Associated Diarrhea: AAD), majd ugyanabban az évben Hafiz környezeti mintákból izolálta a *C. difficile*-t, megfigyelte majd PhD téziseiben részletesen leírta a baktérium legfontosabb biokémiai jellemzőit, köztük a specifikus glutamát dehidrogenáz (GDH), mint közös antigén jelenlétét mind a toxint termelő, mind a toxint nem termelő törzsekben. Bartlett igazolta a toxin-termelő *C. difficile* törzsek enterális patogén szerepét 1977-ben, majd 1980-tól egyre nagyobb figyelmet kapott a *C. difficile* nozokómiális környezetben való terjedése.

A *C. difficile* betegségek fő kockázati tényezője az intesztinális mikrobiota kolonizációs rezisztenciájának megszűnése. A különböző intesztinális mikrobiota típusok egyformán védenek-e a *C. difficile* betegséggel szemben?

- A humán bél mikrobiota egy összetett mikroorganizmus-közösség, amely egészséges emberben kulcsfontosságú szerepet játszik a bél védelmében azáltal, hogy ellenáll a patogén organizmusok kolonizációjának és a fertőzésnek. Normál körülmények között az emberi bél mikrobiota általános mechanizmusok révén akadályozhatja a kórokozók kolonizációját. Az ilyen interakciók kölcsönösek lehetnek; például az egyik baktérium által termelt metabolit hasznos lehet másoknak, vagy egy baktérium lebonthatja az antibiotikumokat, hogy mások is életben maradjanak. Ezzel szemben más kölcsönhatások versenyhez vezethetnek az erőforrások, például a tápanyagok, az adhéziós helyek és más hasznos metabolitok korlátozásáért, közvetlen gátlás jöhet létre a bakteriocinek, vagy más antimikrobiális vegyületek termelése révén. A mikrobiota pontos védekezési mechanizmusa a *C. difficile*

infekciók (CDI) ellen még nem egészen ismert, bár a vastagbél mikrobiota normális egyensúlyának megbomlása az antibiotikumok vagy más stresszorok következtében kiemelt jelentőségű a fertőzés patogenezisében. Kutatások közvetlen antagonizmust találtak *in vitro* a *Bacillus thuringensis* enterális törzse és a *C. difficile* törzsek bél mikrobiotában való jelenléte között, mivel az a *B. thuringiensis* által termelt bakteriocin célpontja (Britton és Young, 2012). Egy egér colitis modell alapú tanulmány azt sugallta, hogy egyes kórokozók, így a *C. difficile* általi kolonizáció során a bélgyulladás befolyásolja a mikrobiota egyensúlyát (Stecher és Hardt, 2011), hozzájárulva a bél mikrobiális sokféleség csökkenéséhez.

- A bél mikrobiota aktívan részt vesz a táplálék szénhidrátok fermentációjában, az aminosavak és a lipidek anyagcseréjében és a fehérje emésztésében. Theriot és mtsai. egerekben a CDI metabolikus modelljét alkalmazták és megállapították, hogy az antibiotikumok (AB-k) mindezen folyamatokat kedvezőtlenül befolyásolják, ami zavart mikrobiota funkcionális állapothoz vezet és kedvez a *C. difficile* spórák germinálódásának és szaporodásának. Ezenkívül a bél mikroorganizmusai részt vesznek az epesav átalakításában, amely szintén serkenti a *C. difficile* spórák germinálódását és szaporodását. Így az ezeket a szerepeket betöltő kulcs taxonok teljes elvesztése, illetve arányainak és csíraszámának csökkenése strukturális és funkcionális egyensúlyhiányt indíthat el, lehetővé téve ezzel az opportunista kórokozóval történő kolonizációt.

- A kutatások több feltételezett ún. **„védő”-jelölt taxont** találtak, jelezve, hogy egynél több baktériumcsoport vesz részt a kórokozók elleni ökológiai egyensúly fenntartásában:

- Pérez-Cobas és munkacsoportja 2014-ben elemezték a *C. difficile* fertőzött és a nem fertőzött egyének bél mikrobiotájának összetételét és funkcionális különbségeit. Különböző elemzéseket és összehasonlításokat végeztek a *C. difficile* hasmenésben szenvedő betegek és a *C. difficile* negatív egyének székletmintái között, felfedezve azokat a feltételezett taxonjelölteket és ezek funkcióit, amelyek védelmet nyújthatnak a *C. difficile* kolonizáció/infekció ellen. Ezen potenciálisan védő taxonok többsége a *Firmicutes* családhoz tartozott, főként a *Clostridiales* rendhez, míg az egyes védelmi funkciók az aromás aminosav bioszintézissel és a stressz-reakció mechanizmusaival voltak összefüggésben. Megállapították azt is, hogy a CD fertőzött tünetes betegek általában alacsonyabb faj változatosságot és gazdagságot mutattak, mint a nem fertőzöttek, valamint kimutatták a fertőzöttekben a *Bacteroidaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae* és a *Clostridium* XI és XIVa klaszter családok tagjainak felülreprezentált voltát. Az anyagcsere-funkciókat illetően az antibiotikus környezetre adott válaszként ezekben a mikroorganizmusokban nagyobb mennyiségű olyan funkcionális gént találtak, melyek szerepet játszanak a szénhidrátok, ionok és egyéb vegyületek transzportjában és megkötésében.

- Antharam *et al.*, 2013-ban hasonló eredményekre jutott: jelentős változásokat tapasztaltak az egyes taxonok jelenlétében (főként a *Firmicutes* phylumból), valamint a mikrobiális sokféleség és a fajgazdagság csökkenését találták a CDI-ben szenvedő egyéneknél. Megállapították, hogy a CD infekcióban szenvedő betegek bél mikrobiotája közös jellemzőkkel rendelkezik: a kommenzális nemzetségek, mint például a *Ruminococcus, Roseburia, Subdoligranulum, Blautia* vagy *Coprococcus* előfordulása csökken, de a *Lactobacillus, Enterococcus, Clostridium* XlVa és XI klaszterekben gazdagodik (ez utóbbi a filogenetikai klaszter, amely a *C. difficile* fajt tartalmazza). Bár a XI. klaszter relatív bősége a fertőzött minták között változó

volt, jelenléte magasabb a CD pozitívaknál, mint a CD negatív mintáknál, valószínűleg a *C. difficile* magas előfordulási aránya miatt. A *Clostridium* cluster XIVa nagyobb mennyisége a mikrobiota egyensúly hiányának a következménye lehet, mivel e csoport tagjait opportunistákként jellemezték. Ehhez hasonlít az enterococcusok - gyakori opportunista kórokozók - előfordulásának jelentős növekedése is, amely akkor válik dominánssá, amikor a normál bél mikrobiotát az AB-k megzavarják. A CDI pozitív mintákban a *Lactobacillus* nagyobb mennyisége szintén érdekes jelenség: pld. egy rágcsálómodell-alapú vizsgálat megállapította, hogy a CDI mintákban a *Lactobacillaceae* domináns, noha a lactobacillust bélprobiotikus nemzetségnek írták le, különböző vizsgálatok azt mutatják, hogy csak specifikus törzsek (pl. *L. delbrueckii*) gátolhatják a *C. difficile* szaporodását, azonban további kutatásokra lenne szükség a *Lactobacillus* törzsek pontos szerepének tisztázásához.

- A különböző vizsgálatok során számos olyan taxont fedeztek fel: *Anaerovorax, Escherichia, Gemmiger, Oscillibacter, Ruminococcus, Subdoligranulum, Clostridiales, Erysipelotrichaceae* és *Ruminococcaceae,* melyek közvetett módon részt vehetnek a kolonizációs rezisztenciában a *C. difficile*-vel való ökológiai interakció révén. Felvetődött, hogy a normál bél mikrobiota-tagok versengése a kórokozókkal az erőforrások vagy helyek korlátozásáért, az úgynevezett „niche exclusion" lehet a kolonizációs rezisztencia egyik mechanizmusa, így ez a „niche" hipotézis megmagyarázhatja a *Clostridiales*-hez tartozó rokon taxonoknak a CDI elleni védelemben betöltött szerepét. Egereken végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a *Clostridia* taxon bizonyos tagjai, mint például a *Lachnospiraceae, C. difficile* antagonisták és fertőzött egerek etetése esetén helyreállítják a normál bél mikrobiotát. Egy hörcsögökön végzett vizsgálat igazolta, hogy a toxint nem termelő *C. difficile* törzs a korlátozó tápanyagok hatékonyabb felhasználása révén képes volt megakadályozni a toxin-termelő törzsek elszaporodását.

- A *Clostridia* taxon további tagjairól mint például a *Roseburia* vagy a *Coprococcus,* az is kiderült, hogy a fő védőjelölt taxonokhoz kapcsolódnak és aktív rövid szénláncú zsírsav (SCFA) termelésére képesek. Ez a CDI elleni védelem második potenciális mechanizmusa lehet, mivel a SCFA gátolja a *C. difficile* szaporodását és csökkenti a toxin termelését *in vitro*. Feltételezik, hogy a mikrobiota anaerob tagjai elengedhetetlenek a bél ökoszisztéma stabilitása szempontjából egészséges egyénekben, ugyanis az általuk előállított butirátnak és más SCFA-knak gyulladáscsökkentő hatása van és stimulálják az immunrendszert. Reeves és mtsai által 2012-ben közölt, egereken végzett tanulmány azonban azt találta, hogy az SCFA-termelés nincs összefüggésben a *C. difficile* kolonizáció alacsonyabb szintjével.

- Pérez-Cobas 2013-as tanulmánya kimutatta, hogy az AB-hez kapcsolódó mikrobiota-változás **metabolikus profilja** az emberi bél mikrobiotájában kevésbé volt drámai, mint a változás a baktériumok összetételében. Ennek valószínűsíthető oka az emberi bél mikrobiota funkcionális redundanciája és az a tény, hogy nagyon általános funkciókkal rendelkezik. A cukrok, például mannóz, fruktóz, laktóz, szorbit vagy mannit szállítása, anyagcseréje és szabályozása túlreprezentált funkció volt a CDI pozitív mintákban. Ismert, hogy a bél mikrobiotában a fő cukorszállító rendszer a foszfotranszferáz rendszer (PTS). Megfigyelték, hogy AB használat során nő a PTS mennyisége a metagenomban, mivel úgy tűnik, hogy előnyben részesíti azokat a baktériumokat, amelyek stressz körülmények között hordozzák őket (Deutscher *et al.*, 2006;

Pérez-Cobas *et al.,* 2013). E funkciók magasabb jelenléte a CD pozitív mintákban a CD negatívokhoz képest figyelemre méltó -még akkor is, ha mindkettőt AB-al kezelték-, mert ez összefüggésben lehet a fertőzéssel, amint azt a CDI-ben szenvedő egerek metabolomikus vizsgálata is mutatja (Theriot *et al.,* 2014). Ugyanezek a szerzők azt találták, hogy az AB-kezelés után megnövekedett a szénhidrátok (mannóz, fruktóz, laktóz, szorbit vagy mannit) mennyisége a bélben és feltételezték, hogy ezek kedveznek a *C. difficile* germinációjának és szaporodásának. Ehhez a megállapításhoz kapcsolódóan egy transzkriptikus vizsgálat kimutatta, hogy a megváltozott mikrobiota által felszabadított cukrokat olyan enterális kórokozók hasznosítják, mint a *Salmonella enterica* és a *C. difficile* (Ng *et al.,* 2013), így a *C. difficile* és más opportunista baktériumok hatékonyan katabolizálhatják a megzavart mikrobiota által generált szénhidrátfelesleget és versenytársak hiányában növelhetik a kolonizációs arányokat.

- Zelante és munkatársai olyan egyéb metabolikus funkciókat is találtak, amelyek szerepet játszhatnak a *C. difficile* elleni kolonizációs rezisztenciában. Vizsgálataik során azt találták, hogy az aromás aminosavak bioszintézisével kapcsolatos funkciók nagyobb arányban fordultak elő CDI-ben szenvedő betegek széklet mikobiotájában. Ismert, hogy a tirozin, fenilalanin és triptofán bioszintézisében részt vevő korizmát mutáz az immunrendszer stimulálása révén szerepet játszik a kolonizációs rezisztencia kialakításában, mivel a triptofán metabolit részt vesz az immunrendszer egyensúlyának fenntartásában és a gyulladás szabályozásában. A jövőben kutatásokat kell folytatni annak a mechanizmusnak a felfedezésére, amely révén az aromás aminosav szintézis megvédheti a *C. difficile* által okozott kolonizációt. A folyamatban néhány olyan energia-anyagcsere út fontosnak tűnik, mint például a Szent-Györgyi–Krebs-ciklus (TCA-ciklus), az elektrontranszport vagy a zsírsav-bioszintézis. A mikrobiotában számos különféle transzporter család, szabályozó gén és az ozmotikus vagy savas stresszre adott válaszban részt vevő gének is kifejezésre kerülnek, amelyek esetleg szerepet játszhatnak a kolonizációs rezisztenciában.

- A CD kolonizációval szembeni másik lehetséges védőút a **peptid katabolizmus aktivációja** volt a triptofán metabolizmus útján. Theriot és mtsai megfigyelték, hogy a fehérje emésztési markerek csökkenése összefüggésben állt a CDI iránti érzékenységgel egerek belében (Theriot *et al.,* 2014). A gazdaszervezet immunválaszát illetően az aminosavak dekarboxilezésével végzett poliamin bioszintézist (putreszcin vagy kadaverin) találták egy másik lehetséges védelmi útnak. Egy korábbi tanulmány arról számolt be, hogy ezek a metabolitok kölcsönhatásba lépnek a bél mikrobiotájával, serkentik az immunrendszert és szerepet játszanak a bél érésében (Gómez-Gallego *et al*., 2012). Jung és mtsai. (2003) megállapították, hogy a poliaminokhoz kapcsolódó glutamát-dekarboxiláz (GAD)-aktivitás szintén védő determináns volt és szerepet játszott a savas stressz elleni védelemben. Az is lényeges, hogy ez az enzim a mikrobiota egyéb biológiai funkcióihoz is kapcsolódik, így például a fehérjék sorsához, a transzkripció szabályozásához vagy a transzport rendszerekhez, ezáltal megerősítve védő szerepét. Ezenkívül olyan védő géntermékek is ismertek, melyek szabályozzák az anyagcsere útjait és részt vesznek olyan sejtfiziológiai folyamatokban, mint például az ozmotikus stressz-rezisztencia és a környezeti változásokra adott válaszok.

- Bizonyos baktériumok által termelt fontos metabolit az indol egy erős antimikrobiális antioxidáns. Egyes kutatások szerint a *C. difficile* indoltermelést indukál az indoltermelő baktériumokban, és a triptofán indollá történő metabolizálásához szükséges *tna*A gén növekvő expresszióját indukálja *E. coli*-ban. Figyelemre méltó, hogy a *C. difficile* kiegészítő génszabályozó 1. (Agr1) kvórum szignál rendszer mutánsa, amely nem képes előállítani a kvórumjelet autoindukáló peptidet, nem indukálta az indol termelést. A mutáns azonban képes volt indol termelést indukálni, amikor az Agr1 kvórumjelet helyreállították, ami arra utal, hogy az Agr1 rendszer szerepet játszhat az indol termelésének *C. difficile* által közvetített indukciójában. Ezenkívül a CDI-betegek székletében magasabb volt az indolszint, mint a nem CDI-s hasmenéses székletben, ami azt mutatja, hogy ez a jelenség a fertőzés során jelentkezik. Feltételezhető, hogy a *C. difficile* indukálja a fertőzés során az indol termelést, ami gátolja a bélvédő és indol érzékeny mikrobiotát és ez elősegíti az indol-toleráns baktériumok szaporodását, ami a vastagbél mikrobiális sokféleségének csökkenéséhez és a CDI-t fenntartó dysbiosishoz vezet. Az indoltermelés aktiválása egy nem indolt termelő baktérium, például *C. difficile* által kvórum szignál mechanizmuson keresztül újszerű kölcsönhatást tárt fel a bél mikrobiotájának tagjai között.

- **Összefoglalva**: specifikus széklet mikrobiotát találtak CDI-ben szenvedő betegeknél, mivel az *Lactobacillus, Enterococcus, Clostridium* XIVa és XI klaszterekben bővelkedett, de csökkent arányt mutatott az SCFA-termelő baktériumok aránya tekintetében. Úgy tűnik, hogy a fehérjék, az aminosavak és a stresszre adott válaszok anyagcseréjével kapcsolatos metabolikus folyamatok egy csoportja kiemelt szerepet játszik a kórokozók inváziójának elkerülésében az emberi bél ökoszisztémájában. Ezeknek az útvonalaknak további kutatása segítséget nyújthat azoknak a mechanizmusoknak a feltárásában, amelynek révén ezek a mikroorganizmusok részt vesznek a *C. difficile* elleni kolonizációs rezisztenciában.

Milyen mechanizmusok játszanak szerepet az antibiotikus kezelés hiányában kialakuló *C. difficile* megbetegedésekben?

- A **protonpumpa gátló (PPI) kezelést** egyre erősödő rizikó faktorként kezeli a szakirodalom. A PPI-k használata és a CDI közötti összefüggés ésszerű: a bél homeosztázisát a gazdaszervezet védekező mechanizmusai tartják fenn, amelyekben a gyomorsav fontos szerepet játszik gátolva az endogén lenyelt, vagy táplálékkal bevitt baktériumok elszaporodását. A PPI-terápia gátolja a gyomorsavtermelést, ami a spórák germinálódásához, a *C. difficile* vegetatív formájává való átalakulásához vezet. Emellett a PPI-k a fagocitózis gátlásával és a fagolizoszóma savanyításával gátolják a leukociták működését.

-A **prolongált kórházi kezelés** során könnyebben akvirálható a fertőzés egy másik betegtől, ami a rizikót tovább növeli, mivel a kórokozó spórái akár 40 napig is képesek megmaradni a fertőzött beteg kórtermében a beteg hazabocsátása után. A rizikó átlagosan 20 napos kórházi tartózkodás után válik jelentőssé. Ugyanez vonatkozik az idősotthonokra, ápolási intézményekre. Egyes osztályok, főként az intenzív osztály sajátos helyzetéből adódóan komoly rizikótényező a CD fertőzésekre.

- Számos irodalmi adat utal arra, hogy súlyos **krónikus alapbetegség, immunszupprimált** állapot mellett gyakrabban fordul elő a fertőzés. Nagyon nehéz az antibiotikum kezelést

figyelmen kívül hagyni ebben a betegpopulációban, ugyanis a vizsgálatok szerint ezen betegek többsége (70–80%) magas kockázatú antibiotikumot kap. Az ezekben a vizsgálatokban azonosított egyéb kockázati tényező a kemoterápia magasabb dózisa, ≥2 fokozatú mucositis, a citomegalovírus és más Herpesviridae reaktivációja. A daganatos betegségben szenvedők kemoterápiás kezelésének rizikó szerepét részben a terápia neutropeniát okozó hatásával magyarázzák. Végstádiumú veseelégtelenségben szenvedő betegeknél emelkedett CD fertőzés incidencia észlelhető. Gastrointestinalis műtétek után, illetve a nasogastricus szondák alkalmazása mellett fokozottabb a rizikó CD fertőzésre: a gyomor-, vékony- és vastagbél-rezekción átesett betegeknél magasabb a CD fertőzés előfordulása, a kórházi ápolási idő megnövekszik, a letalitás a háromszorosára nő. A szolid szerv (tüdő, szív, vese és máj) transzplantáció gyakran jár együtt hypo-gammaglobulinaemiával, a csökkent immunválasz ezekben a betegekben a CD fertőzés incidenciáját mintegy ötszörösre emeli. A szolid szerv transzplantált (SOT) populációra jellemző kockázati tényezők közé tartozik az 55 év feletti életkor, az antithymocyta globulin használata, a retranszplatáció és az átültetett szerv típusa. A legnagyobb arányban a májbetegek esetén fordul elő CDI. Érdekes, hogy a tüdőtranszplantált betegeknél a fiatalabb életkor nagyobb kockázati tényező, mint az idősebb kor, a kétoldalú tüdőtranszplantáció és az alkalmazott antibiotikumok mellett. Brown 2013-ban publikált tanulmánya azt igazolta, hogy igen erős korreláció van a nozokomiális pneumonia és influenza miatt kezelt betegek és a CD fertőzés előfordulása között, melynek okaként felvetik az antivirális kezelés, az antibiotikumok és a bélflóra egymásra hatását. A pre-retrovirális terápia előtt megjelent tanulmányok arra utalnak, hogy a HIV fertőzött betegeknél fokozott a CD fertőzésre való hajlam, melyet immunszupresszív állapotuk, antibiotikum kezelésük és a gyakori és hosszas kórházi kezelések száma magyaráz. Ebben az esetben sem lehet kizárólag egy rizikófaktorról beszélni, ugyanis az antibiotikum fogyasztás, az előző évi kórházi kezelések száma, a CD4-szám ≤200 sejt/µl protonpumpa-gátló alkalmazással kombinálva, szignifikánsan összefüggésben van a CDI-vel.

- Az elmúlt években több tanulmány is foglalkozik a CDI zoonózis voltával, illetve étel-közvetítette eredetével. Élelmiszer-állatokban a *C. difficile*-t a béltraktusukban találták meg, ami azt jelenti, hogy a talaj, a víz, az élelmiszer-feldolgozó környezetek és az élelmiszer végtermékek a széklet-szennyeződése révén kontaminálódhatnak a *C. difficile* törzsekkel. A CD kiterjedt előfordulását írták le egészséges sertéseknél és hasmenésben szenvedő sertéseknél, a baktérium és a szabad toxin kimutatása normál ürülékkel rendelkező malacokban 1,4% és 96% között, hasmenéses malacokban 23% és 93% között volt. A *C. difficile* előfordulási gyakorisága szarvasmarhákban a földrajzi elhelyezkedéstől függően 0% és 60% között változott, kórokozó szerepe a borjak és a fejős tehenek hasmenésével függött össze. Korlátozott számú tanulmány foglalkozott a *C. difficile* hordozási arányaival baromfiakban: a rendelkezésre álló adatok azt mutatják, hogy a *C. difficile* előfordulása a haszonállatokban az életkor előrehaladtával csökken és a kolonizációt kimutatták, függetlenül attól, hogy az állatoknak vannak-e betegség jelei vagy sem (Rodriguez *et al*. 2016). A teljes genom-szekvenálást alkalmazva a *C. difficile* genetikájának és a CDI epidemiológiájának tanulmányozására, Knetch és mtsai (2014) arról számoltak be, hogy a tenyésztőket és a sertéseket azonos *C. difficile* klónok kolonizálták,ezzel a megfigyeléssel támogatva az állatok és emberek közötti átviteli hipotézist.

- A *C. difficile* endospórák jelenléte a végső élelmiszer termékekben a nyersanyagok és/vagy összetevők kezdeti szennyeződésével, az élelmiszer-feldolgozó üzemekben történő keresztszennyeződéssel magyarázható. A *C. difficile* spórákat különböző típusú élelmiszerekben fedezték fel, beleértve a tenger gyümölcseit, a zöldségeket és a húsokat, amelyek prevalenciája 2,9% és 66,7% között változott (Rodriguez *et al.*, 2016). Ezek a prevalencia-adatok hangsúlyozzák a CDI potenciális kockázatát a nyers és feldolgozott élelmiszerek fogyasztásával kapcsolatban és erős bizonyítékot szolgáltat a *C. difficile* mint élelmiszer eredetű betegség kórokozójának valószínűségére.

2. A jelölt százalékos adatai az O27 járványtörzs elterjedését mutatják. A legfrissebb adataiban jelentkező visszaesést mi okozza, a vizsgálat varianciája vagy tendencia változás áll a háttérben? Az értekezés alapján elsősorban a hatékonyabb toxin termelő képesség fokozza a járványos elterjedést, minek köszönhető mégis, hogy az utóbbi években nőtt biodiverzitás. Ha van egy sikeres klón, akkor nem azt várnánk egyre dominánsabbnak? Állhat-e a biodiverzitás növekedése mögött a járványos terjedés hatékony visszaszorítása és szórványos esetek arányának emelkedése?

- 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 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 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, a gyorsabb spóraképző képesség 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 nozokomiális CDI kialakulásával. A nozokomiális CDI gazdasági hatása óriási, ami az Egyesült Államokban évente egymilliárd dollár felett, 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 nozokomiális 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 törekvése. A megfelelő és időben hozott infekciókontroll intézkedések és az antibiotikumok racionális alkalmazása együttesen voltak szükségesek ahhoz, hogy a *C. difficile* terjedése megelőzhető, lassítható legyen, az infekciókontrollt minden egészségügyi dolgozónak be kell tartania az egészségügyi és szociális intézményekben.

- 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. Ennek 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 előfordulása 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 sikeresen 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.

3. A jelölt adatai alapján a *C. difficile* rezisztenciaviszonyai a várakozásoknak megfelelően elég stabilnak tűnnek. Mi lehet a patogenetikai a szerepe az észlelt ko-rezisztenciabeli különbségeknek a különböző típusok között, olyan antibiotikum párok (pl. makrolid/linkózamid) között, amelyek terápiás együtt alkalmazása nem valószínű?

- A *C. difficile* alkalmazkodóképessége és a genom plaszticitása meghatározta a több antibiotikummal szemben rezisztens törzsek számának növekedését, jelenleg a járványt okozó klinikai izolátumok többsége multi-drug rezisztens (MDR). A mobilis elemek és az antibiotikum célpontok széles skálája közvetíti a rezisztenciát számos antibiotikummal szemben, beleértve a makrolid-lincosamid-streptogramin B (MLS_B) családot és az fluorokinolonokat, amelyek jelentős rizikótényezői a CDI kialakulásának. Ezenkívül a törzsek csökkent érzékenysége a CDI-terápiában alkalmazott első vonalbeli antibiotikumokkal szemben -különösen a metronidazol és a vancomycin-, valamint a relapszusokra alkalmazott antibiotikumokkal szemben (például a rifamycinek) szerepet játszhat a kezelésre adott rossz klinikai válaszban. Úgy tűnik, hogy az antibiotikumok rezisztenciája fennmaradt ebben a kórokozóban, függetlenül a genetikai elemek/rezisztenciát okozó mutációk megszerzésétől és az antibiotikumok szelekciós nyomásának csökkenésétől. Ez a tulajdonság magyarázhatja a

„régi” rezisztenciák fennmaradását és az „új” rezisztenciák gyors terjedését a *C. difficile* populációban. Az antibiotikum-rezisztenciák multifaktoriális jellege és a *C. difficile* járványok széles körű és gyors terjedése hangsúlyozzák a hatékony antibiotikum politika szerepét, az infekció kontroll programok végrehajtását és alternatív terápiák kifejlesztését a rezisztens törzsek elterjedésének megakadályozására és megfékezésére, valamint a hatékony terápia biztosítására.

- A részletes genetikai elemzések kimutatták, hogy a *C. difficile* változékony genom tartalommal, a mobilis elemek széles skálájával rendelkezik, amelyek közül sok az antibiotikum-rezisztenciát kódolja. A horizontális géntranszfer mellett más mechanizmus is hozzájárulhat az antibiotikum-rezisztencia kialakításához a *C. difficile* törzsekben, ami soktényezős jelenségnek tűnik. A *C. difficile*-ban a makrolid-lincosamid-streptogramin B (MLS_B) családdal szembeni rezisztencia általában riboszomális metilációval jár. A B osztályú erythromycin riboszomális metilázok (erm) génjei a legelterjedtebbek a *C. difficile* populációban. A *C. difficile*-ban az *erm*B gén általában mobilizálható genetikai elemeken helyezkedik el és a Tn5398, egy mobilizálható, nem konjugatív, 9,6 kb hosszúságú elem a legismertebb ezen elemek között. A Tn5398 az *erm*B gén két példányát tartalmazza és képes *in vitro* átvitelre a *C. difficile*-ból a *Staphylococcus aureus*-ba és a *Bacillus subtilis*-ba. Az MLS_B-re rezisztens *C. difficile* törzsek többségében az *erm*B-t tartalmazó elemek eltérő genetikai szerkezettel rendelkeznek a Tn5398-hoz képest. Tizenhét ilyen szerkezetet (E1-E17) azonosítottak PCR-módszerrel, az E4-et találták a leggyakoribbnak az európai *C. difficile* klinikai izolátumok között. Az E4 elemek rokonságban vannak a *C. difficile* 2007855-ben azonosított Tn6194 konjugatív transzpozonnal. Habár az *erm*B-tartalmú elemek terhekkel (cost) járnak a *C. difficile* fitneszben *in vitro*, ezek az elemek gyakoriak a *C. difficile* populációban, ami arra utal, hogy a fitnesz terheitől függetlenül egyéb tényezők (azaz a transzfer képessége és a törzsek belső genetikai jellemzői) részt vesznek sikeres elterjedésükben.

- Az erythromycinnel és a clindamycinnel vagy csak az erythromycinnel szembeni rezisztenciát figyeltek meg az *erm* génekre negatív *C. difficile* törzsekben is. Bár ezen törzsek némelyikében a 23S rDNS vagy riboszomális fehérjék (L4 vagy L22) változását találták, ugyanezeket a változásokat észlelték az érzékeny izolátumoknál is, ezért kizárták a rezisztenciában játszott szerepüket. Ezenkívül a rezisztens *erm*-negatív törzsek kezelése két pumpa-inhibitorral (rezerpin és karbonil-cianid-m-klór-fenil-hidrazon - CCCP) nem eredményezte a MIC csökkenését, ami arra utal, hogy a rezisztenciát nem az efflux mechanizmusok közvetítik. A közelmúltban meghatároztak más olyan tényezőket, amelyek szerepet játszhatnak az MLS_B elleni *C. difficile* rezisztenciában *erm* gének hiányában. A linezolidra és más klinikailag releváns antibiotikumokra rezisztens *C. difficile* törzsekben *cfr*B vagy *cfr*C géneket találtak, amelyek egy 23S rRNS metiltranszferázt kódolnak, és rezisztenciát mutatnak a PhLOPSA-val szemben (fenikolok, linkozamidok, oxazolidinonok, pleuromutilinek és streptogramin A). A *cfr* gént egy nem konjugatív, Tn6218 elnevezésű transzpozonban azonosították, amely a Tn916-hoz kapcsolódik.

Ugyanez a kérdés felmerül a rifampicin rezisztenciában megfigyelt növekedésről is. Rifampicin kúraszerű alkalmazása fokozza-e a *C. difficile* betegség kockázatát, pl. antituberkulotikus kezelés alatt?

- Bár 1980-ban Borriello már közölte egy 60 éves, meningitis basilaris tuberculosa-ban szenvedő férfibeteg, hosszas rifampicin (RIF) terápia után kialakuló rifampicin-asszociált pseudomembranosus colitisét, azonban ez a szer nem tartozott az elsődleges rizikócsoportba tartozó antibiotikumok közé. A legfrissebb adatok azonban már azt mutatják, hogy a *C. difficile* klinikai izolátumok 15%-a rezisztens a rifampinnal szemben és az általános rezisztencia aránya növekvőnek tűnik. A rifamicinekre rezisztens törzseket a *C. difficile* páneurópai vizsgálatban szinte az összes országban (17/22) kimutatták, a rezisztencia magasabb arányát (57% és 64% között) jelentették Olaszországban, Csehországban, Dániában és Magyarországon. Úgy tűnik, hogy az antibiotikumnak való kitettséget követő szelektív nyomás szerepet játszik a rifamicinekkel szemben rezisztens *C. difficile* törzsek kiszelektálódásában, ezért a rezisztens *C. difficile* törzsek akár a terápia során is megjelenhetnek. A rifamicineket általában tuberkulózis elleni szerként (TB) használják. H. Pituch és mtsai egy lengyel TBC központ adatai alapján megállapították, hogy tuberkulózis elleni szerekkel, különösen rifampicinnel kezelt betegeknél, akiknél a kezelés alatt vagy után akut hasmenés alakult ki, igen jelentős volt a CDI előfordulása. A Lengyelországban vizsgált, TBC-ben szenvedő és elhúzódó RIF terápiával kezelt betegekből izolált törzsek, amelyek a RT046-hoz tartoznak magas MIC-értéket mutattak ezekkel az antibiotikumokkal szemben.

4. A diszkussziós fejezetből derül ki egyértelműen, hogy a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek extraintesztinális fertőzésekből származtak, míg vizsgált enterotoxinoknak az intesztinális hatásait említi a szakirodalmi háttérben. Milyen kórfolyamati szerepe van ezeknek a toxinoknak az extraintesztinális fertőzésekben?

- A *B. fragilis* enterotoxin (fragilizin: BFT) egy cink-metalloproteáz, mely az intesztinális epitéliumban a zonula adherensek szoros illeszkedéseit (tight junction) károsítja az E-cadherin hasításával, ami az epitéliális sejtekben az aktin-citoszkeleton átrendeződését eredményezi. Mivel ezen a barrieren rés keletkezik, így vastagbélgyulladás, hasmenés alakul ki a betegnél. A BFT-t az enterotoxigenikus *B. fragilis* (ETBF) törzsek szekretálják, melyek a ma már négy ismert BFT izotípust eltérő *bft* locuson kódolják, melyek egy 6-kb nagyságú genom szegmensen helyezkednek el. Ez a genom szegmens kizárólag az ETBF törzsekben található meg és *B. fragilis* patogenitási szigetnek („pathogenicity island") nevezik. Az enterotoxin termeléséért felelős gén patogenitási szigete egy új konjugatív transzpozonban található, ez a patogenitási sziget mobilizáló fehérjéket kódoló génekkel szomszédos és így átvihetők a toxint nem-termelő törzsekbe. Ezt a toxint a C11 (fpn) és a C10 proteázok (bfp) aktiválják, amelyek elősegítik a törzsek invazivitását. Az enterotoxin-termelő *B. fragilis* izolátumok metalloproteáz aktivitása a HT29/C1 human colon epitheliális sejtvonalon ezen törzsek potenciális invazivitását feltételezi különböző infekciókban, azonban nem ismert, hogy ezek a törzsek tartalmaznak-e olyan egyedi genetikai elemeket, amelyek fokozott virulenciát biztosítanak az extraintesztinális kórképekben. Egyes jelentések szerint az extraintesztinális ETBF prevalenciája eltérő, kuwaiti adatok alapján az enterotoxin gént hordozó extraintesztinális *B. fragilis* törzsek 49,9%-os előfordulása viszonylag magas, összehasonlítva a Lengyelországban

14,4%-os, Japánban 18,6%-os, az Egyesült Államokban 6,2–38% és a magyarországi 13–25%-os adatokkal. Az extraintesztinális *bft* pozitív törzsek több mint fele mindegyik kutatás szerint sebváladékból származott, ez valószínűleg azt jelenti, hogy a *bft*-pozitív törzsek patogénebbek a sebfertőzésekben, mint a *bft*-negatív törzsek. Német és kaliforniai kutatók vizsgálatai alátámasztották, hogy a hemokultúra-izolátumok sokkal gyakrabban hordozzák az enterotoxin gént, mint az egyéb klinikai izolátumok (Claros MC. *et al.* 2000). Az irodalomban kevés adat található az enterotoxin termelés és a bakterémia közötti összefüggésről. Egy 2006-ban készült tanulmány szerint a hemokultúrából származó törzsek 57%-a tartalmazta a BFT termeléséért felelős patogenitási szigetet és/vagy a szomszédos génszegmenseket, míg az egyéb klinikai mintákból származó törzsek esetén csak a törzsek 10%-a tartalmazta a patogenitási szigetet és a szomszédos génszegmenseket együttesen. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a patogenitási sziget és a szomszédos génszegmensek a *B. fragilis* törzsek fontos általános virulencia faktorai lehetnek. Azonban az enterotoxin patogenetikai szerepe a *B. fragilis* bakterémia kialakulásában továbbra sem tisztázott. Érdekes azonban, hogy a véráramban a BFT csak egyetlen, fragipain (Fpn) nevű endogén bakteriális cisztein proteázzal (C11) aktiválható. Az ETBF *fpn* mutáns törzs nem tudott letalitást okozni egerekben, amikor baktériumokat intravénásan adtak be, ami az Fpn fontosságát jelzi az ETBF által közvetített szepszis összefüggésében. Az *fpn* gén a legtöbb NTBF (nem toxikus BF) és ETBF törzsben jelen van, ami arra utal, hogy az Fpn a BFT aktiválásán kívül valószínűleg egyéb funkcióval is rendelkezik. Az a tény, hogy a *B. fragilis* enterotoxin metalloproteáz, alátámasztja azt a hipotézist, miszerint ez a toxin bizonyos eszközökkel, például a bradikinin kaszkád aktiválásával felgyorsítja a *B. fragilis* vérkeringésbe jutását.

- Azok a vizsgálatok, amelyek az ETBF jelenlétét vizsgálták az extraintesztinális fertőzésekben, még nem jutottak egyértelmű konszenzusra, ugyanakkor azt sugallják, hogy az ETBF törzsek magasabb arányban fordulnak elő a véráram- és a hüvelyi fertőzésekben, mint más anatómiai lokalizációból származó mintákban. Kimutatták, hogy a BFT *in vitro* toxikus a vese és a tüdő hámsejtjeire, valamint az endotheliumra, ami potenciális szerepet sugall az extraintesztinális fertőzésekben. Míg a kolonizáció más genetikai meghatározói, beleértve a kapszula poliszacharidot, szerepet játszanak a bélen kívüli fertőzésekben és a tályogképződésben, az ilyen patogenitási funkció nem egyértelmű a BFT esetében. Jelentős mennyiségű, az emberi populációra összpontosító epidemiológiai vizsgálatra és a modellrendszerekben végzett párosított mechanisztikus elemzésekre lesz szükség annak tisztázása érdekében, hogy a BFT és a hozzá kapcsolódó patogenitási szigetek milyen potenciális evolúciós előnyökkel járhatnak a *B. fragilis* genomban.

Milyen arányú ezen enterotoxin géneknek az intesztinális hordozása? Mivel magyarázható, hogy a fekális mikrobiota transzplantációban nem alakulnak ki ezen enterotoxinoknak tulajdonított komplikációk annak ellenére, hogy a donor székleteket nem szűrik ilyen irányban?

- Az ETBF-et egészséges egyének és hasmenéses betegek székletmintáiban is azonosították. Az ETBF prevalenciája körülbelül kétszer olyan magas a hasmenésben szenvedő, tünetes betegeknél (20-30%), mint egészséges egyéneknél (10-20%). A különböző földrajzi helyekről származó jelentések az ETBF kolonizációjának magasabb százalékát mutatják az 1 évesnél

idősebb, hasmenésben szenvedő gyermekeknél, mint az életkornak megfelelő kontrolloknál. 1 évesnél fiatalabb gyermekeknél a prevalencia a legalacsonyabb az általános populációban és nem jár hasmenéssel, ami arra utal, hogy a bélfejlődés fontos a hasmenés kialakulásához. A különböző földrajzi területeken az ETBF-törzsek hasmenéssel társított gyakorisága jelentősen változó (Bangladesben 3,5%, Olaszországban 28%). Eddig csak egy nagy tanulmány vizsgálta az ETBF szerepét a hasmenésben felnőtteknél (15 évesnél idősebb egyénekként definiálva), azonosítva az ETBF-et 728 hasmenéses beteg 27%-ában és 194 egészséges kontroll 12%-ában. Ebben a vizsgálatban a 30 évesnél fiatalabb felnőttek 19%-a, a 30 és 60 év közötti felnőttek 10,6%-a és a 60 évesnél idősebb felnőttek 3,7%-a tünetmentesen kolonizált volt az ETBF-fel. A 15 és 30 év közötti felnőttek körében az ETBF aránya hasonló volt a hasmenéses és a hasmenés nélküli betegeknél, míg az ETBF és a hasmenéses megbetegedések közötti szignifikáns összefüggés az idősebb betegeknél jelentkezett. Más tanulmányok is azt sugallják, hogy az aszimptomatikus kolonizáció az ETBF-el gyakori (~30%-ig). Bozemanban (Montana, USA) szennyvízből tenyésztett 237 *B. fragilis* törzs 9,3%-a ETBF volt, ami az ETBF közepesen magas endémiás hordozására utal. Az ETBF és a krónikus bélbetegségek közti összefüggést több mint 20 éve fedezték fel, amelyet először gyulladásos bélbetegségben (IBD) szenvedő betegeknél tanulmányoztak, majd igazolták, hogy az ETBF a fekélyes vastagbélgyulladással és a vastagbél neopláziájával is társulhat. Az ETBF társulása vastagbélrákos (CRC) betegeknél szórványos és családi eseteket foglal magában, ami arra utal, hogy ennek a betegségnek a progressziója, annak kezdetétől függetlenül, fiziológiásan közös. Az emberi populációkban az ETBF magas tünetmentes kolonizációja közötti különbség, valamint az ETBF-hez társult IBD és szórványos CRC esetek alacsony száma arra utal, hogy a patogenitás nem sztochasztikus és ismeretlen gazdaszervezeti érzékenységi tényezőktől függ. Jelenleg nem ismert, hogy az ETBF törzsek tipikusan tünetmentes hordozókban termelik-e az enterotoxint. A szekretált BFT mennyiségét egészséges személyekben és betegekben egyaránt mérő vizsgálatokra szükség lesz, hogy funkcionális összefüggést mutassanak ki az ETBF hordozása és a betegség specifikus megnyilvánulásai között. Ezenkívül az a tény, hogy a toxin termelő törzsek okozzák a *B. fragilis* fertőzések túlnyomó részét, megnöveli azoknak a vizsgálatoknak a komplexitását, amelyek az ETBF epidemiológiai és mechanisztikus hozzájárulásának meghatározásához szükségesek emberi betegségekben.

- A hatékony probiotikus beavatkozások, emellett a széklet traszplantáció kivitelezése részletes molekuláris ismereteket igényel a niche-megszerzés genetikai determinánsainak repertoárjáról a *B. fragilis* törzsei esetében. A *bft* genomiális megszerzése több, egymástól független, horizontális átvitelű esemény révén következett be. Így feltételezhető, hogy a különféle genetikai hátterek, amelyek különböző előnyös képességekkel bírnak a niche létrehozásában és a törzsek versenyében, BFT-t produkálhatnak és potenciálisan betegségeket okozhatnak. Számos esetben bizonyított, hogy bár a székletben található törzsek a *bft* gént hordozták, azonban az nem fejeződött ki, illetve a toxin termelés mértéke túl alacsony volt, így nem okozott hasmenést a gazdaszervezetben. Több, a jelenleginél részletesebb vizsgálat szükséges annak megismerésére, hogy milyen tényezők játszhatnak szerepet a *bft* gént hordozó törzsek esetében a hasmenés kialakulásában. A gazdaszervezet kolonizációjának bonyolultsága miatt személyre szabott orvosi perspektíva szükséges, amelyen keresztül hatékonyan kezelhetők azok, akiket az

ETBF-vel összefüggő betegség fenyeget. Ebből a célból a niche-n belüli ismereteknek elő kell mozdulniuk a kolonizáció genetikai meghatározóinak megértése felé.

5. Az európai felmérésben mivel magyarázható, hogy a *Bacteroides/Parabacteroides* moxifloxacin rezisztenciában a skandináv törzsek szerepelnek legrosszabbul, amikor szinte minden rezisztencia adat náluk szokott a legalacsonyabb lenni.

Professzor Úr kérdését gyakorlatilag Szabó Dóra Professzor Asszony is feltette, így a válaszom ugyanaz, mint a másik opponensnek:

- A vizsgálatunkban kapott, egyes esetekben jelentős rezisztencia-szintbeli különbségek az európai régiók között bennünket is meglepett. Az Európai Antimikrobiális Rezisztencia Felügyeleti Hálózat (EARS-Net) szerint az antibiotikumokkal szemben rezisztens Gram-negatív baktériumokról szóló klinikai jelentések száma növekszik. Általánosságban elmondható, hogy a skandináv országokban alacsony az antibiotikum-rezisztencia százalékos aránya, míg ez a szint magasabb a dél- és kelet-európai országokban. A rezisztencia ezen változása valószínűleg összefügg az antibiotikum-használat politikáinak és stratégiáinak különbségeivel ezekben az országokban. Így például Dániában kezdetben alacsony volt az antibiotikumok fogyasztása más európai országokhoz képest, ez azonban az elmúlt évtizedben megváltozott és az antibiotikumok fogyasztása ma már magasabb Dániában, mint más skandináv országokban. Az antimikrobiális rezisztencia növekedése, amelyet Európában a *B. fragilis* csoport esetében tapasztaltak, komoly problémát jelent. Ezt a növekedést a skandináv államok közül pld. Dániában igazolták, ahol számos, több gyógyszerre rezisztens törzset izoláltak az elmúlt években Justesen és munkatársai. A disszertációban ismertetett adatok a 2008. január és 2009. március között izolált releváns klinikai izolátumok antibiotikum érzékenységi viszonyait mutatják be. Az adott időszakban - bár a svéd antibiotikum felhasználási adatok jóval a magyarországi alatt voltak - a Finnország-beli cefalosporin és kinolon fekvőbeteg intézményekben és járóbetegellátásban való felhasználása magasabb volt, mint Magyarországon (*lásd mellékelt ábra*).

- Az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ szerint az emberek által elfogyasztott antibiotikumok jelentős része a járóbeteg-terápiában alkalmazott antibiotikum. Bár Svédországban az antibiotikumok felhasználása az orvostudományban és a mezőgazdaságban alkalmazott előírások miatt csökken, azonban az antibiotikumokkal szemben rezisztens *Enterobacteriaceae* fertőzésekről szóló jelentések folyamatosan növekszenek. 2016-ban Svédországban a karbapenemázt termelő *Enterobacteriaceae*-ben szenvedő betegek több mint 70%-a fertőzött külföldön. Vizsgálati adatok a *bla*CTX-M, *qnr*B és *qnr*S gének előfordulásának növekvő gyakoriságát mutatták ki egészséges hollandiai önkéntesek székletében közvetlenül azután, hogy visszatértek a nemzetközi utazásaikról. Ezek a megállapítások tovább erősítik azokat a korábbi megfigyeléseket, amelyek szerint az utazók hozzájárulnak az antimikrobiális gyógyszerekkel szembeni rezisztencia terjedéséhez.

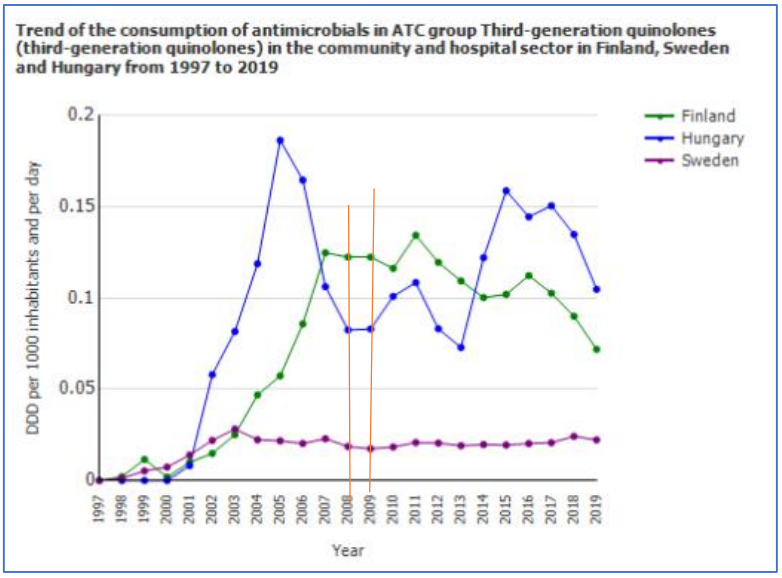
- Az ECDC adatbázisából származó legfrissebb (2019-es) adatok szerint Finnországban a humán gyógyászatban leggyakrabban alkalmazott antibiotikum csoport a penicillin és származékai béta-laktám antibiotikumok voltak (33,6%), ezt a tetracyclinek követték (21,6%), majd a harmadik helyen az egyéb béta-laktám antibiotikumok (köztük a cefalosporinok) álltak

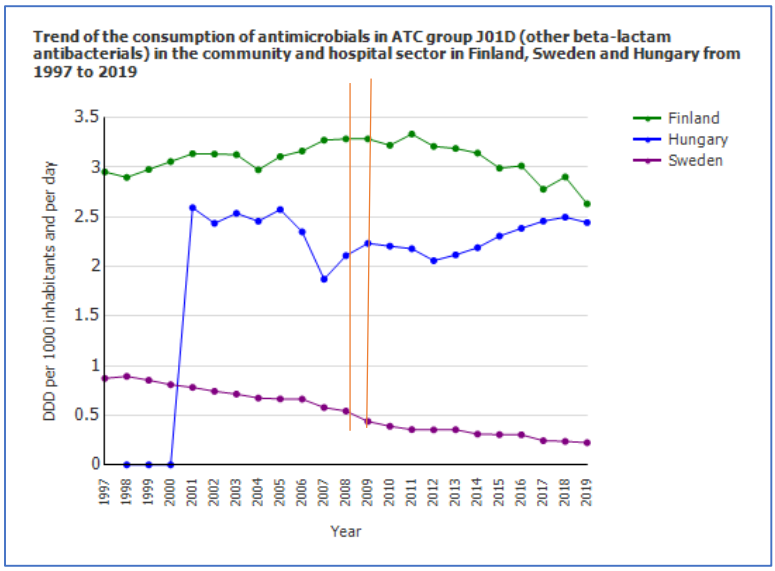
(18%). Svédországban szintén a penicillin és származékai béta-laktám antibiotikumok voltak a leggyakoribbak (53,4%), ezt a tetracyclinek (19,4%) és a kinolonok (5,9%) követték. Magyarországon a penicillin és származékainak alkalmazási aránya 33,9%, a második helyen a macrolid-linkózamid típusú antibiotikumok (20,2%) állnak, ezt követik az egyéb béta-laktám antibiotikumok (köztük a cefalosporinok) (16,9%), majd a kinolonok (14,3)%.

- Meglepő, hogy egészen a közelmúltig a haszonállatoknak beadott antibiotikumok körülbelül 70%-a nem terápiás célokra, hanem például a hozamfokozásra vagy a növekedés elősegítésére irányult. Az ilyen célú antibiotikum felhasználást általában nagyon alacsony koncentrációban, hosszú ideig tartó etetéssel hajtják végre, ami nagyon veszélyes gyakorlat, mert szelektálhatja a rezisztens baktérium populációkat. 1986 óta Svédországban az antibiotikumokat nem használják növekedés serkentőként az állattenyésztésben, és csak néhány antimikrobiális gyógyszert, például penicillineket, trimetoprimet és szulfonamidokat alkalmaznak az állati fertőzések kezelésére. Dánia 1998 óta felfüggesztette a növekedés ösztönzés céljából alkalmazott antibiotikumok adását a broiler csirkéknek és a felnőtt sertéseknek, 1999 óta pedig a malacoknak. (web link: https://www.pewtrusts.org/en/projects/antibiotic-resistance-project). Az 1990-es években publikált jelentések kimutatták, hogy a növekedést stimuláló avoparcin antibiotikum, amely ugyanúgy a glikopeptid család tagja, mint a vancomycin, a vancomycin-rezisztens *Enterococcus faecium* (VRE) szelekciójához vezet. Még olyan országokban is alacsony VRE-szintet találtak a táplálékállatok vagy az emberek kórházakon kívüli székletmintáiban, ahol az avoparcint még soha nem használták (például Svédországban és az Egyesült Államokban). Az EU-ban 1997-ben betiltották az avoparcin alkalmazását a vancomycin klinikai hasznosságának megőrzése érdekében. Miután az élelmiszer-állati növekedést elősegítő antibiotikumokat Svédország 1986-ban betiltotta, az Európai Unió 1997-ben betiltotta az avoparcint, 1999-ben pedig a bacitracint, a spiramicint, a tilozint és a virginiamicint. Mivel a vízi fajok (halak, kagylók, garnélák és puhatestűek) globális termelése az elmúlt évtizedben gyorsan növekszik, így az antibiotikumok használata az akvakultúrában is fokozódni látszik. Sajnos napjainkban már a halgazdaságokban is sok MDR kórokozó baktériumot találtak. Mivel az antibiotikumok szabad környezetbe jutása növelheti az MDR baktériumok megjelenését, ezért alkalmazásuknál körültekintő gondosságra van szükség.

1.-2. ábra: A kinolonok és a 3. generációs cefalosporinok felhasználása Finnország, Svédország és Magyarország összehasonlításában 1997-2019.

Forrás: https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-consumption/surveillance-and-disease-data/database





Végezetül szeretném még egyszer megköszönni Professzor Úrnak, hogy több területen is új eredménynek fogadta el az általam végzett különböző vizsgálatokat és kutatásokat. Hálás vagyok bírálói munkájáért, építő észrevételeiért és kérem válaszaim szíves elfogadását.

Zsoldiné dr Urbán Edit

Pécs, 2021 július 01.