Válaszok: Prof. Dr. Szabó Dóra kérdéseire:

Szeretném megköszönni Szabó Dóra Professzor Asszonynak a disszertációm gondos áttanulmányozását. Köszönöm az elismerő szavakat és külön köszönöm, hogy a feltett 12 kérdéssel lehetőséget adott számomra vizsgálati eredményeink részletesebb kifejtésére, illetve azok tovább gondolására.

Válaszaimat az alábbiakban részletezem.

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

- 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, 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 nozokómiális CDI

kialakulásával. A nozokómiális CDI gazdasági hatása is 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 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 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. . A drasztikus intézkedés hatására a CDI előfordulása az elmúlt évtizedben feltűnően csökkent 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 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. A *Bacteroides/Parabacteroides* nemzetségben az antibiotikum érzékenység tekintetében nagy regionális eltéréseket mutatott ki a jelölt európai szinten, mely a Skandináv országokban a rezisztens törzsek nagyobb előfordulásával jellemezhető. Ezzel szemben a kiterjedt spektrumú béta laktamáz (ESBL) termelő és karbapenemáz termelő *Enterobacteriaceae* törzsek előfordulása a Skandináv országokban alacsony. Ezt a Skandináv országok alacsony antibiotikum fogyasztásával indokolják. Ezzel szemben a *Bacteroides* törzsek moxifloxacin rezisztenciája a Skandináv régióban kiemelkedően magas volt, illetve a cefoxitin rezisztencia Finnországban volt a legmagasabb. Mi áll ennek a jelenségnek a hátterében? Mely antibiotikumok felhasználása jellemző a Skandináv országokra, mely Magyarországra a humán és állatgyógyászati antibiotikumok tekintetében?

- 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.

- 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.

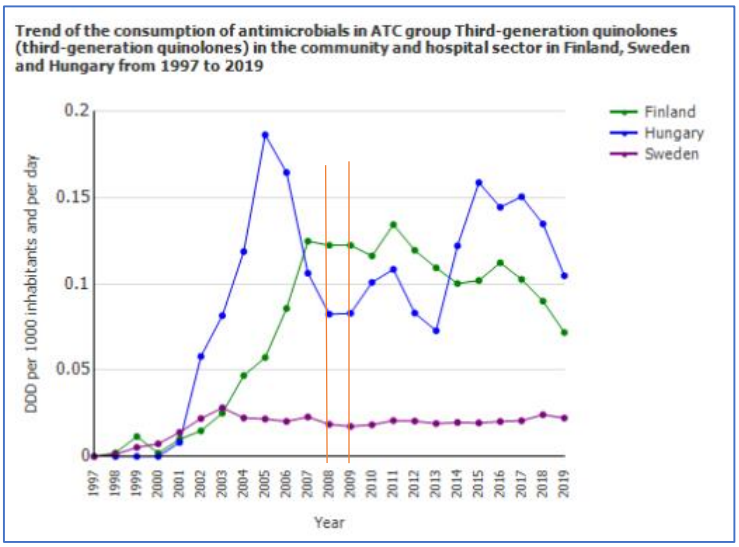
- Az ECDC adatbázisából származó legfrissebb (2019-es) adatok szerint Finnországban a humán gyógyászatban leggyakrabban alkalmazott antibiotikum csoport a penicillin és származékai béta-laktám antibiotikumok voltak (33,6%), ezt a tetracyclinek követték (21,6%), majd a harmadik helyen az egyéb béta-laktám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

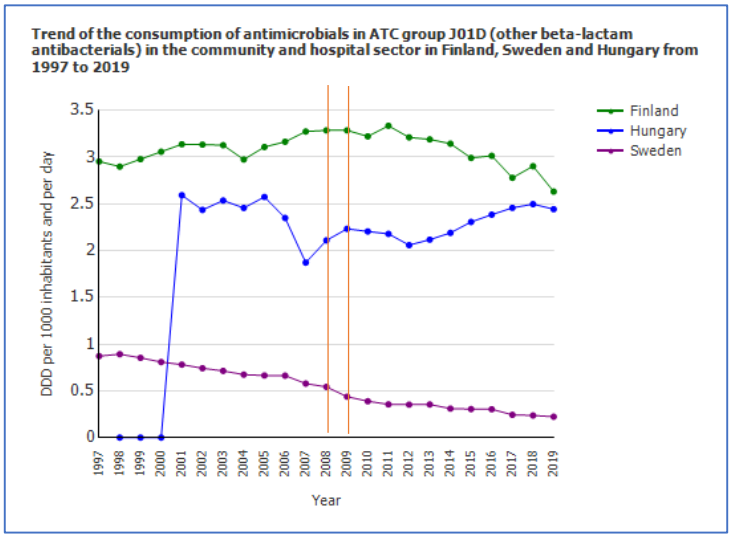
- Meglepő, hogy egészen a közelmúltig a haszonállatoknak beadott antibiotikumok körülbelül 70%-a nem terápiás célokra, hanem például a hozamfokozásra vagy a növekedés elősegítésére irányult. Az ilyen célú antibiotikum felhasználást általában nagyon alacsony koncentrációban, hosszú ideig tartó etetéssel 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





3. A jelölt eredményei alapján a magyarországi *Bacteroides* törzsek közel 100%-a ampicillin rezisztensnek bizonyult és csupán 4,5% volt amoxicillin-klavulánsavra rezisztens. Milyen rezisztencia mechanizmus állhat a *Bacteroides* törzsek amoxicillin-klavulánsav rezisztenciájának hátterében?

- Az irodalmi adatok alapján a *Bacteroides/Parabacteroides* nemzetség fajai rendelkeznek a legtöbb antibiotikum-rezisztencia-mechanizmussal és a legmagasabb rezisztencia-arányokkal az összes anaerob kórokozó közül. A béta-laktám ágensekkel szembeni rezisztencia **leggyakoribb mechanizmusa a béta-laktamáz (a *cep*A gén terméke) enzim termelése**, amely egy olyan kromoszómán kódolt 2e osztályú cefalosporináz, ami szinte az összes *Bacteroides* fajnál megtalálható. Mivel ezt az enzimet gátolják a leggyakrabban alkalmazott (szulbaktám, klavulánsav és tazobaktám) és az újabb (avibaktám, relebaktám, vaborbaktám) béta-laktamáz inhibitorok, az ezeket az inhibitorokat tartalmazó antibiotikumok hatékonyak a béta-laktamáz enzimet termelő törzsekkel szemben. A bacteroidesek esetében a béta-laktám/béta-laktamáz inhibitor kombinációkkal kapcsolatos rezisztencia mechanizmusokat nem sikerült még teljesen tisztázni, de úgy tűnik, hogy azok függenek a közvetlenül a *cep*A gén előtt, attól megfelelő távolságban elhelyezkedő IS-elemek (Inszerciós Szekvencia) jelenlététől, illetve a membrán-módosulásoktól, például a porin veszteségtől. A cefoxitin rezisztenciáért felelős génről, a *cfx*A-ról kimutatták, hogy távoli rokonságban van a *B. fragilis* endogén *cep*A-val. A karbapenemekkel szembeni rezisztencia továbbra is ritka. Két olyan enzim génjét azonosították eddig, amelyek képesek lebontani ezeket a szereket: a *cfi*A-t és a *ccr*A-t, amelyek mind a B osztályú metallo-laktamázokat kódolják. Ezek az enzimek rezisztenciát biztosítanak a karbapenemekkel, a béta-laktámokkal és a béta-laktám/béta-laktamáz inhibitor kombinációs szerekkel szemben is.

- **Megváltozott penicillin kötő fehérjék (PBP)**: Az aerob Gram-negatív baktériumok számos fajában kimutatták, hogy a módosított PBP affinitás rezisztenciát eredményez a béta-laktám antibiotikumokkal szemben. A béta-laktám aktivitás és a PBP affinitás korrelációja a *B. fragilis*-ben nem egyértelmű, részben azért, mert ellentmondásosak a baktériumok PBP-inek számozása és molekulatömegének vizsgálata során kapott adatok. A legtöbb vizsgálatot a sejtek vagy sejtkivonatok jelölt antimikrobiális szerrel történő jelölésével és az eredmények nátrium-dodecil-szulfát (SDS) poliakrilamid gélelektroforézissel történő elemzésével végezték. A *B. fragilis* PBP-fajtáinak pontosabb kimutatását a fluoreszcens penicillin-analóg, a bocillin-FL alkalmazásával érték el. A *B. fragilis* genom-szekvenciájának megismerése a korábbinál teljesebb elemzést tett lehetővé, segítségével eddig kilenc feltételezett PBP gént azonosítottak: A, 1ab, 1c, D, 2, 2x, 3, 4 és 7. A bacteroidesek PBP-i a béta-laktám antibiotikumok iránti affinitásukban és ezen fehérjék gátlásának morfológiai következményeiben különböznek az *E. coli* PBP-itől. Mindenesetre, amint több szerző megállapította, nagyon nehéz korreláltatni egy adott PBP 50%-os gátló koncentráció-affinitását egy antibiotikum iránt a MIC-el, mivel általában nem ez az egyetlen mechanizmus, amely felelős a rezisztenciáért. E nehézség ellenére számos tanulmány összefüggést tárt fel a béta-laktám-vegyületek *Bacteroides*-fajok PBP-jeivel szembeni csökkent affinitása és az ezen szerekkel szembeni rezisztencia között. A *Bacteroides* törzsek esetében az elsődleges célpont a legtöbb béta-laktám antibiotikum számára a PBP2,

amely részt vesz a szeptációban, és megfelel az *E. coli* PBP3-nak. A *Bacteroides* törzsek esetében PBP1 komplex általában a másodlagos célhely és a sejt megnyúlásával társul, amely megfelel az *E. coli* PBP1-jének. Az olyan vegyületek, mint az imipenem és a meropenem, kezdetben a PBP3-hoz kötődnek és a sejtek lekerekedését okozzák, majd a PBP2-hez kapcsolódnak. *B. fragilis* rezisztens törzsében a 80 kDa-os PBP csökkent affinitását figyelték meg imipenem, piperacillin, cefoperazon, cefotaxim és a ceftazidim iránt. A PBP-k változásai - főként a PBP1 és/vagy PBP2 módosulásai - összefüggésben vannak a nem béta-laktamáz enzim által közvetített cefoxitin-rezisztenciával a *B. fragilis* csoportba tartozó cefoxitin-rezisztens mutánsokban. A *B. thetaiotaomicron* 238m PBP1 komplex (86 kDa) affinitása a cefoxitinhoz és a piperacillinhez 100-szoros, illetve 70-szeres csökkenést mutatott a szülőtörzséhez viszonyítva.

- A *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek esetében eddig még kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a **külső membrán porin fehérjék** változása és az antimikrobiális rezisztencia között. A *B. fragilis* 45 kDa-os porinszerű fehérjéje potenciálisan korrelálhat a *B. fragilis* antibiotikum-rezisztenciájával, illetve a *B. thetaiotaomicron* egy feltételezett 70 kDa-os porinja és a laktám-szerekkel szembeni rezisztencia között is potenciális összefüggés állhat fenn. Korábbi vizsgálatok arra utaltak, hogy a *Bacteroides* és *Parabacteroides* spp. törzseiben a kromoszomális cefalosporináz hiperprodukciója a porinok elvesztésével együtt béta-laktám /béta-laktamáz inhibitor rezisztenciát eredményez. A jelenlegi kutatások alapján azonban valószínűbbnek tűnik, hogy a külső membrán (porin) fehérjék változása és az antimikrobiális rezisztencia közötti összefüggések asszociatívak voltak és egyértelmű összefüggést nem mutatható ki közöttük.

4. A jelölt adatai alapján a magyarországi *Bacteroides ovatus* izolátumok 16,66%-a meropenem rezisztensnek, a *B. thetaiotaomicron* törzsek 55,7%-a clindamycin rezisztensnek bizonyult. Mi állhat ennek a jelenségnek a hátterében?

- A két faj érzékenységi viszonyainak jelentős eltérése a magyarországi vizsgálatban - különösen a meropenem és a clindamycin esetében - egyrészt a kevesebb elemszámmal (pld. *Bacteroides ovatus* izolátumok 16,66%-a 24 törzs esetében 4 törzset jelent) magyarázható. Másrészt a szakirodalomból is ismert az a megfigyelés, hogy az ún. indol-pozitív bacteroidesek rezisztencia arányai általában magasabbak az egyéb *Bacteroides* fajokénál. A jelenség több felmérés adatai alapján ismert, azonban az okait mélyebben még nem kutatták. A rutin diagnosztikában is ismert, hogy az aerob baktériumok között pld. a *Proteus/Providencia/Morganella* család tagjai közül az indol pozitív speciesek általában rezisztensebbek az indol negatív törzseknél. A különböző nemzetközi és országos anaerob baktérium antibiotikum érzékenységi felmérések során öt fő tényezőről derült ki, hogy befolyásolják az antibiotikum érzékenységi arányokat: ezek a faj, ország, kórházi központ, antibiotikum-fogyasztás és a klinikai minta típusa.

- L. Dubreuil 2003-ban közölt felmérése alapján hasonló eredményeket találtak: cefotetán és a clindamycin esetében jelentős érzékenységbeli különbségeket figyeltek meg a különböző fajok között. A *B. fragilis* törzsek érzékenyebbek voltak, mint a *B. thetaiotaomicron*, a *B. ovatus*, a *B. vulgatus*. A *B. thetaiotaomicron* rezisztensebb volt, mint a *B. distasonis*, a *B. vulgatus* és más

fajok, de rezisztencia viszonyaiban nem különbözött a *B. ovatus*-tól. Mivel nem találtak szignifikáns különbséget a clindamycinnel és a cefotetánnal szembeni rezisztenciában a *B. distasonis* és a *B. vulgatus* vagy más fajok esetében, így a *B. fragilis* csoportot három alcsoportra osztották: (i) *B. fragilis* törzsek, (ii) *B. thetaiotaomicron* és *B. ovatus* törzsek és (iii) egyéb, más fajok törzsei. Az clindamycinnel és a cefotetánnal szembeni rezisztencia vizsgálata során alkalmazott statisztikai módszer ezeket az egyes fajcsoportokat összekapcsolta, holott rezisztencia-mechanizmusaik között nem volt összefüggés.

- Snydman az USA-ban 1997-2004-ig vizsgált időszakban készült tanulmánya a *B. fragilis* csoport rezisztencia-mintázatának változékonyságát vizsgálta és néhány fontos faj-specifikus antibiotikum érzékenységi mintázatot talált: a *B. ovatus* karbapenem rezisztencia aránya magasabb volt, mint más *Bacteroides* fajoké, a *B. vulgatus* rezisztencia aránya magasabb volt a piperacillin-tazobactam esetében, a *B. distasonis* ellenállóbb volt az ampicillin-szulbaktámmal és a cefoxitinnal szemben, a *B. ovatus* és a *B. uniformis* nagyon ellenálló volt a moxifloxacinnal szemben, a moxifloxacin rezisztencia aránya a *B. vulgatus* törzsek között kimagasló, >50% volt. Veloo és mtsai 2015-ben közölt felmérésükben a hollandiai törzsek között ilyen eltéréseket a vizsgált fajok között nem figyeltek meg. Egy dániai vizsgálatban olyan páciensek székletmintáiból származó *Bacteroides/Parabacteroides* törzseket vizsgáltak, akik széles spektrumú antibiotikum terápiában részesültek. Bár az összes vizsgált faj esetében a meropenem iránti csökkent érzékenység 5% volt, de a *B. ovatus /xylanisolvens* törzsek 13%-a nem volt érzékeny, a *B. thetaiotaomicron* törzsek 47%-a pedig clindamycin rezisztensnek bizonyult.

- Kouhsari és mtsai 2019-ben 3 iráni kórház fekvőbetegeinek székletmintáiból izolált *Bacteroides/Parabacteroides* törzseket vizsgálták: a *B. ovatus* törzsek 13,6%-a meropenem rezisztens, míg a *B. thetaiotaomicron* törzsek 90,4%-a clindamycin rezisztensnek bizonyult. Dumont 2020-ban 2 francia kórház anaerob hemokultúra izolátumainak rezisztencia eredményeit hasonlították össze, ahol (bár az izolátumok száma kevés volt) hasonló eredményeket kaptak az indol pozitív izolátumok esetében: így megállapították, hogy a *B. ovatus* és a *B. thetaiotaomicron* törzsek jóval rezisztensebbek voltak a vizsgált antibiotikumokra, mint a többi *Bacteroides/Parabacteroides* törzs.

5. A *Bacteroides* törzsek esetében magyarázható-e a moxifloxacin rezisztencia a *bex*A MATE multidrug efflux pumpa jelenlétével, ha a nem-fragilis *Bacteroides* moxifloxacin rezisztens törzsek 38,9%-a, míg a nem-fragilis *Bacteroides* moxifloxacin érzékeny törzsek 2,4%-a hordozta ezt a gént? Tekintettel arra, hogy a PCR vizsgálatok csak a *bex*A gén jelenlétét és nem annak expresszióját vizsgálják és nem adnak információt annak expressziójáról, van-e arra vonatkozó adata a jelöltnek, illetve van-e nemzetközi adat arra vonatkozóan, hogy ezen törzsek esetében milyen arányú volt a *bex*A gén expressziója? Milyen adatok vannak arra vonatkozóan, a MATE multidrug efflux pumpa expressziója, aktivitása indukálható-e, és ha igen, akkor mivel? Tekintettel arra, hogy az efflux pumpák nem specifikusak egy-egy antibiotikumra, a MATE multidrug efflux pumpa milyen egyéb antibiotikum ellen okozhat rezisztenciát?

- Kimutatták, hogy számos proton-motoros erővel (PMF) működő vagy energiafüggő (ATP) multidrug efflux pumpa fontos szerepet tölt be az antimikrobiális rezisztencia és az MDR fenotípus kialakulásában; ezek az efflux pumpák hasonló szerepet játszhatnak az antibiotikum-rezisztens *B. fragilis*, valamint a nem fragilis *Bacteroides* fajok rezisztencia-mechanizmusában. Ezekben a baktériumokban két transzporter-szupercsalád, az RND (*Resistance Nodulation Division*) és a MATE (*Multi-antimicrobial extrusion protein*) tagjai kerültek kimutatásra: az RND családból a bmeABC1-16 transzporterek (amelyek szerkezetileg a *Pseudomonas aeruginosa* MexAB-OprM efflux rendszer homológjai), a MATE családból pedig a BexA (*Bacteroides* exporter A; a *Vibrio parahaemolyticus* NorM transzporterének a homológja) transzporterek kerültek azonosításra. A *Bacteroides*-ekben található RND transzportereknek széles a szubsztrát-specificitása, amely számos antibiotikum-családra és egyéb toxikus ágensre (β-laktámok, tetracyclinek, kinolonok, erythromycin, fuzidinsav, novobiocin, metronidazol, triklozán, nátrium-dodecil-szulfát/SDS/, ethidium-bromid, epesavak) is kiterjed. Az bmeABC transzporterek expresszióját az előbb említett szubsztrátok indukálhatják (különösen erős induktoroknak találták az ampicillint, imipenemet, norfloxacint, levofloxacint és az SDS-t az MDR *Bacteroides* törzsekben), a *bme*B gének kifejeződésének növelésével.

- A jelenleg elérhető kísérleti adatok arra engednek következtetni, hogy a BexA transzporter szubsztrát-specificitása jelentősen szűkebb az RND-transzportereké hez képest (amely részint a szubsztrát transzporterben való kötődéséhez szükséges jól definiált konformációval és H-kötés donor-akceptor viszonyokkal magyarázható); döntően a kinolon antibiotikumok és az ethidium-bromid kipumpálására képesek, míg a pumpa expresszióját bizonyítottan a kinolon antibiotikumok, a cetrimid, az ethidium-bromid, a klórhexidin, a delaquinium és egyéb detergensek képesek indukálni. BexA-transzporter knock-out mutánsok esetén (*B. fragilis* és *B. thethaiotaomicron* törzsekben) a norfloxacin és ciprofloxacin MIC-ekben figyeltek meg szignifikáns csökkenést a vad típusú törzsekhez képest, míg a moxifloxacin MIC-ek nem változtak számottevően. Tehát a *bex*A jelenléte a moxifloxacin-rezisztens törzsek esetén a rezisztens fenotípus kialakításában csak kisebb részben játszhat szerepet, míg nagyobb szerep feltételezhető a *gyr*A és *par*C-génekben bekövetkező mutációknak, melyek gyakran alakulnak ki előzetes kinolon-eredetű szelekciós nyomás következtében.

- A *bex*A génnel kapcsolatos kutatásaink meglehetősen új területet képviselnek az anaerob baktériumok körében, így nem találtam arra vonatkozó nemzetközi szakirodalmi adatot, hogy a gén expresszióját vizsgálták-e *Bacteroides/Parabacteroides* törzsekben. Mivel a PCR vizsgálataink során csak a *bex*A gén jelenlétét és nem annak expresszióját vizsgáltuk, további molekuláris és fenotípusos vizsgálatokat terveztünk a *bex*A gén expressziójának kimutatására.

- Ricci és mtsai (2003) leírtak két olyan újabb fluorokinolont, amelyek úgy tűnik, hogy célzottan a MATE targetjei lehetnek, így ezekkel szembeni rezisztencia jelezheti a MATE MDR funkcionalitását/expresszióját fenotípusos tesztben: a clinafloxacin és garenoxacin elsősorban a MATE-efflux pumpák targetjei, így ezekkel a fluoroquinolonokkal MATE pumpák aktivitása specifikusabban vizsgálható, mint az efflux pumpa gátló verapamillal vagy reserpinnel.
- A *B. thetaiotamicron bex*A génjét *E. coli*-ba klónozták és azt találták, hogy a gén spontán is leíródik, de expresszióját indukálhatja a tetracyclin, ha a tertracyclin promótere a *bex*A közelében van - igaziból ez egy funkcionális teszt, hiszen nem csak PCR-ral bizonyították a

jelenlétét, de annak funkcionalitását és indukálhatóságát is igazolták (bár nem egy természetes, hanem rekombináns baktériumban).

6. A magyarországi gyűjteményből származó multidrug rezisztens *Bacteroides* törzsek vizsgálata során milyen kritériumok alapján tekintették az izolátumokat multidrug rezisztensnek?

Az izolátumokat a nemzetközi szakirodalom alapján MDR-nek tekintettük, ha három vagy több antibiotikum csoportból legalább egy antibiotikummal szemben rezisztens volt.
„Multi Drug Resistant Anaerobic Bacteria: Definition: Resistant for at least one antibiotic agent in three or more antibiotic categories."

7. A jelölt vizsgálatai és eredményei alapján az összes multidrug rezisztens *Bacteroides* törzs hordozta a *tet*Q gént. A *tet*Q gén az irodalmi adatok alapján nagyon elterjedt, tekintettel a tetracyclin származékok széles körű használatára a humán és állatgyógyászatban. Vizsgálták-e a nem MDR törzsek között a *tet*Q és *tet*X gének előfordulási gyakoriságát?

A nem MDR törzsek között a *tet*Q és *tet*X gének előfordulási gyakoriságát több alkalommal is vizsgáltuk és publikáltuk:

Az **első** vizsgálatban az európai törzsgyűjteményből random beválogatva 161 *B. fragilis* csoportba tartozó izolátumot vizsgáltunk meg az egyéb antibiotikum rezisztencia gének jelenlétének kimutatása céljából (**Eitel Zs.** 2006.) A 161 *Bacteroides* törzs között a tetracyclin rezisztenciáért felelős gének előfordulása: *tet*Q esetén 80,1%, a *tet*X esetén 9,9% és a *tet*X1 esetén 5,0% volt, viszont nem találtunk sem *tet*M- sem *tet*36-pozitív törzset a vizsgált törzsek között. A vizsgálatba bevont *B. fragilis* törzsek között csak 3 (1,9%) törzs volt rezisztens tigecyclinre (MIC: 16 mg/l) ezek mindegyike a *tet*Q gént hordozta, azonban a *tet*M, *tet*X, *tet*X1 és a *tet*36 gének nem voltak jelen egyik tigecyclin-rezisztens *Bacteroides* törzsben sem.

1. táblázat: *A tetracyclin rezisztenciáért felelős gének prevalenciája a vizsgált törzsek között*

***Bacteroides* törzsek**	**A rezisztencia géneket hordozó törzsek száma (%)**				
	***tet*M**	***tet*Q**	***tet*X**	***tet*X1**	***tet*36**
B. fragilis n=128	0	101 (78,9%)	13 (10,2%)	7 (5,5%)	0
non-fragilis *Bacteroides* n=33	0	28 (84,8%)	3 (9,1%)	3 (9,1%)	0
Tigecyclin rezisztens törzsek száma*	***tet*M**	***tet*Q**	***tet*X**	***tet*X1**	***tet*36**
B. fragilis n=3	0	3 (100%)	0	0	0
non-fragilis *Bacteroides* n=0	0	0	0	0	0

* A CLSI szerinti tigecyclin rezisztencia határérték: ≥16 mg/l

- Munkacsoportunk 2007-2008-ban három magyarországi laboratórium részvételével történt multicentrikus felmérés során vizsgálta a tigecyclin és öt komparátor antibiotikum *in vitro* hatékonyságát bőr- és lágyrész infekciókból, és intraabdominalis infekciókból származó

anaerob baktériumok esetében. Ebben a tanulmányban 280, *Bacteroides fragilis* csoportba tartozó törzset is vizsgáltunk. A tigecyclin a glycylcyclin család első tagja, a minocyclin félszintetikus származéka. Az alapvegyületen történt módosítás megvédi a tigecyclint azoktól a rezisztencia mechanizmusoktól, amelyek hatástalanítják a tetracyclineket, így várhatóan megőrzi hatékonyságát a tetracyclin rezisztens törzsekkel szemben is.

A **következő** vizsgálatunkba célzottan 35 *Bacteroides* törzs került beválogatásra. Kiválasztásuk a tigecyclin MIC értékük alapján történt, bevonásra kerültek érzékeny (MIC ≤4 µg/ml) és emelt szintű MIC-értékkel rendelkező (8 mg/l és 16 mg/l) törzsek is (**Bartha NA**, 2011). A kiválasztott izolátumok az ismertetett európai törzsgyűjteményből és a hazai törzsgyűjteményünkből (amelyet a fent említett hazai tigecyclin-rezisztencia helyzetének felmérésére gyűjtöttünk) származtak.

- A 35 kiválasztott *Bacteroides* törzsből 12 rendelkezett emelkedett tigecyclin MIC értékkel (≥8 mg/l) így mérsékelten érzékenynek, vagy rezisztensnek bizonyultak, míg 23-nak alacsony volt a tigecyclin MIC értéke (MIC ≤4 mg/l), így az érzékeny tartományba estek. Ebben a csoportban volt 8 törzs, amelynek MIC értéke 4 mg/l volt. Minden tetracyclinre mérsékelten érzékeny vagy rezisztens izolátum (MIC ≥8 mg/l) hordozta a *tet*Q gént, míg a 6 érzékeny (tetracyclin MIC 4 mg/l) izolátumból csupán kettőnél volt jelen. A *tet*Q gén minden izolátumban jelen volt, amely emelkedett tigecyclin MIC értékkel rendelkezett, míg a *tet*X gént 2 esetben (16,7%), a *tet*X1 gént 9 esetben (75%) sikerült kimutatni (2. táblázat). A 4 mg/l-es tigecyclin MIC értékkel rendelkező törzsek között a *tet*Q gént 8 (100%), a *tet*X gént 1 (12,5%), a *tet*X1 gént pedig 6 (75%) esetben tudtuk kimutatni. A 0,064-2 mg/l közötti tigecyclin MIC értékekkel rendelkező törzsek között a *tet*Q gént 73,3%, a *tet*X gént 2 (13,3%), a *tet*X1 gént pedig 46,7%-ban tudtuk kimutatni.

2. táblázat: *A rezisztencia gének jelenléte a különböző tigecyclin MIC-el rendelkező törzsek esetében*

***Bacteroides* törzsek száma/tigecyclin MIC**	**A rezisztencia gént hordozó törzsek száma/(%)**			
	***tet*Q**	***tet*X**	***tet*X1**	***erm*F**
≥8 mg/l (n=12)	2 (16,7)	9 (75,0)	12 (100)	4 (33,3)
4 mg/l (n=8)	1 (12,5)	6 (75,0)	8 (100)	3 (37,5)
<4 mg/l (n=15)	2 (13,3)	7 (46,7)	11 (73,3)	6 (40,0)

- A *tet*Q gén jelenléte erős korrelációt mutatott a tetracyclin és tigecyclin fenotípusos rezisztenciával, ezen felül a *tet*X1 gén jelenléte is jól korrelált a tigecyclin rezisztenciával, bár kevésbé erősen, mint az előző esetben. Az *erm*F gént a 35 törzsből 13-ban (37,1%) tudtuk kimutatni. Hét törzsben (hat esetben a tigecyclin MIC ≥ 4 mg/l, egy esetben pedig 2 mg/l volt) az *erm*F gén együtt volt jelen a *tet*Q és *tet*X1 génekkel.

- Ez, a válogatott törzsekkel történő vizsgálatunk kimutatta a *tet*X és *tet*X1 gének jelenlétét a megemelkedett MIC értékekkel rendelkező *Bacteroides* törzsekben, azonban közvetlen prediktív értéke csak a *tet*X1 gén jelenlétének volt. A *tet*Q és *tet*X1 gének esetében magasabb prevalenciát figyeltünk meg azonban a törzsekben, amelyek ≥4 mg/l-es MIC értékekkel

rendelkeztek. A vizsgálatban a *tet*X1 gén detektálását is elvégeztük, annak ellenére, hogy ezt egy pszeudo-génnek tartják, mivel a *tet*X génnel való 66%-os homológiája miatt azt vártuk, hogy redox aktivitással rendelkezzen. A *tet*X1 gén váratlanul magas (46,7-75%) prevalenciája figyelemre méltó és véleményünk szerint szemben áll azzal elképzeléssel, hogy pszeudo-gén lenne. A *Bacteroides* spp-ben gyakran megtalálhatók a konjugatív transzpozonok (CTn-k): törzsek több mint 80%-a tartalmaz legalább egy konjugált transzpozont. A *Bacteroides*-ben lévő konjugatív transzpozonokat gyakran „tetracyclin-rezisztencia-faktoroknak" nevezik, és sok közülük tetracyclin-expozíció révén stimulálható, ezek kb. 150 kb méretűek. Számos *B. fragilis* konjugált transzpozon is tartalmaz erythromycin rezisztencia géneket, például az *ermF* (cTnDOT), *ermB* (cTnBST) vagy *ermG* (cTnGERM1). Kísérletünk során az ***erm*F** gén jelenlétét szintén vizsgáltuk, hisz ezúton további információkhoz juthatunk a genetikai elemek jelenlétéről, pld. CTnDOT-ről (tetracycline resistance conjugative transposon), amely a *tet*Q-t, *tet*X1-et, *tet*X2-t (99%-os homológia a *tet*X-el) és egyúttal az *erm*F-et is hordozza. A vizsgálat során három olyan törzset találtuk, amelyek az *erm*F mellett a *tet*Q, *tet*X és *tet*X1-es géneket is hordozták. Ezek a törzsek hordozhatnak CTnDOT-szerű konjugatív transzpozonokat, tehát a mobilis genetikai elem prevalenciája kb. 8,6% lehet ebben a *Bacteroides* populációban, ami összhangban van az előző eredményekkel (10%). Vizsgálataink kifejezetten jelentősek abból a szempontból, hogy a plazmidok és transzpozonok, amelyek hordozzák ezen rezisztencia géneket, nagyban elősegíthetik azok terjedését a különböző baktériumok (fajok, illetve egyes törzsek) között. Ezen törzsek nemcsak az általuk hordozott rezisztencia gének terjesztéséért felelősek, hanem a társ-rezidens mobilizálható elemek által hordozott antibiotikum rezisztencia gének átvitelében is fontos szerepet játszhatnak a mobilis elemek kivágásának és átadásának stimulálásával. Egyelőre még nem tisztázott, hogy a kromoszomális *tet*X és *tet*X1 gének magas prevalenciája az emelkedett tigecyclin MIC értékekkel rendelkező *Bacteroides* törzsekben valós veszélyt jelent-e, de a *tet*X és *tet*X1 gének jelenléte a mobilis genetikai elemeken felhívja a figyelmet a tigecyclin-rezisztencia terjedésének lehetőségére, mind a bacteroidesek, mind más aerob, fakultatív- és obligát anaerob baktériumok között. További vizsgálatok szükségesek, – pld. egy magas rezisztenciával rendelkező törzsből a rezisztens fenotípus átvitele egy érzékeny törzsbe konjugációval – hogy igazolható legyen a jelen kutatás során feltételezett, lehetséges géntranszfer. A több különböző antibiotikummal szemben rezisztens *B. fragilis* törzsek súlyos terápiás problémát, klinikai kudarcot okozhatnak, ráadásul, mivel a bacteroidesek nagyon fontos, domináns tagjai a normál humán intesztinális mikrobiotának, ki vannak téve a különböző okokból alkalmazott antibiotikumok általi szelekciós nyomásnak. A vizsgálatok alapján szignifikáns rezervoárjai és forrásai lehetnek a különböző antibiotikum rezisztencia géneknek. Vizsgálatunkban az obligát anaerob Gram negatív *Bacteroides* izolátumokban találtunk *erm*B és *erm*G géneket, melyek a Gram-pozitív speciesekre jellemzőek, illetve *tet*X és különböző *tet*X1 géneket, melyek az aerob típusú tetracyclin oxidáló enzimek termeléséért felelősek. A vizsgált rezisztencia gének némelyike fenotípusosan érzékeny törzsben volt megtalálható, amely a felveti a genetikai szabályozás kérdését. A vizsgálatok kivitelezését az anaerob munkacsoportunkba tartozó Dr. Eitel Zsuzsa és Dr. Bartha Noémi végezték, aki Nagy Erzsébet Professzor Asszony irányítása alatt PhD-tek.

8. A jelölt vizsgálatai alapján a *B. ovatus* D92 törzs metronidazollal szemben rezisztenciát mutatott, MIC értéke 32 mg/l volt, azonban a törzs a *nim* gént nem hordozta. Mi a jelölt

véleménye, milyen rezisztencia mechanizmus állhatott a metronidazol rezisztencia hátterében?

- A nitroimidazolok hatásmódjuk szerint olyan prodrugok, amelyek a nitrocsoportjuk redukálását követően fejtik ki antimikrobiális hatásukat. Ezt általában a nitroreduktáz enzimekkel (NTR) lehet elérni akkor, ha prosztetikus csoportként flavin-mononukleotidot (FMN) vagy flavin-adenin-dinukleotidot (FAD) használnak; redukálószerként pedig vagy NADH-t, vagy NADPH-t. A mechanizmus a következő lépésekből áll: (i) a molekulák passzív diffúzió útján jutnak be a sejtekbe, (ii) a nitrocsoport reaktív gyökökké redukálódik és (iii) a gyökök reagálnak a sejtben lévő DNS-sel vagy fehérjével. A szer sejteken belül belüli redukciója a vegyület redoxpotenciáljától és az átvitt elektronok számától függ.

- A nitroimidazolokkal szembeni rezisztencia általában azért fordul elő, mert csökken (1) a *nim* gének által kódolt, a nitrocsoport redukálásáéért felelős nitroreduktáz enzimek expressziója; (2) a *nim*-negatív, de metronidazol-rezisztens *Bacteroides* törzsek rezisztenciájáért valószínűleg egyéb rezisztencia-mechanizmusok tehetők felelőssé: így a metabolikus shift a piruvát laktáttá történő átalakulásához kapcsolódó útvonalhoz a laktát-dehidrogenáz révén; csökkent uptake; az antibiotikum fokozott kiáramlása; fokozott DNS-javítás kapacitás; az antioxidáns védekező rendszerek aktiválása; a vas-vas transzporter FeoAB hiánya; a ramnóz katabolizmust szabályozó RhaR fehérje túlzott expressziója, illetve olyan mutációk, melyek megváltoztatják a szénhidrátok felhasználását a redox állapot érintésével, amely lerövidíti a szer sejtkárosító hatását. Ezek a rezisztencia-mechanizmusok a célszervezettől függően különböznek.

9. A multidrug rezisztens *Bacteroides* törzsek közül négy bizonyult moxifloxacin rezisztensnek, ezek közül egy *B. ovatus* törzs *bex*A gént hordozott. A *B. fragilis* Sz38 GyrA alegységében a Ser82-Phe szubsztitúciót igazoltak. A GyrA mutáció egymagában nem feltétlenül okoz magas szintű kinolon rezisztenciát. Történtek vizsgálatok a QRDR régió más részeinek vizsgálatára, vagy más rezisztencia mechanizmusok feltárására?

- Munkacsoportunk a disszertáció beadása után (2019 decembere) további, részletesebb vizsgálatokat tervezett a gyűjtött törzsekkel. Eddig még csak egy vizsgálatsorozatot végeztek el a törzsekkel, ennek során az alacsony és magas moxifloxacin MIC értékkel rendelkező izolátumok QRDR régióit megszekvenálták és általában samesense vagy missense mutációkat találtak. Tervbe vettük az MDR törzsekkel kapcsolatos egyéb vizsgálatokat, illetve azt terveztünk, hogy mind külföldi, mind országos szinten gyűjtünk a laboratóriumoktól további MDR törzseket. Ezek a vizsgálatok munka, idő és nem utolsósorban pénz igényesek és sajnos 2020 tavaszán a pandémia miatt megakadtak, jelenleg szünetelnek. Természetesen az MDR törzsekkel eltervezett vizsgálatokat folytatni szeretnénk.

10. A jelölt vizsgálta a *B. fragilis* törzsek jelentős patogenitási faktorainak az enterotoxin felszabadulásáért felelős géneknek, a *fpn* és *cfi*A géneknek a vizsgálatát. A két gén előfordulás között negatív korrelációt figyelt meg. Milyen jelenség állhat ennek hátterében?

- A magyarországi törzsek vizsgálata során az adatainkat elemezve jutottunk erre a figyelemreméltó, érdekes összefüggésre. A fragilizint a C11 proteáz (fpn) aktiválja, és a C10

proteázzal (bfp) együtt jelentős szerepet játszik az invazivitásában. Két cisztein-peptidáztípust írtak le a közelmúltban, melyek szerepet játszanak a törzsek patogenitásában: a *bfp*1–4 géneket, amelyek a C10 peptidázt kódolják, és az *fpn* géneket, amelyek a C11 peptidázt kódolják (fragipain). Dokumentálták a C10 peptidáz és a gyulladásos bélbetegség és a szepszis patogenezisének lehetséges kapcsolatát, és bebizonyították, hogy a fragipain aktiválja a *B. fragilis* enterotoxint. Az enterotoxin termelésért felelős gének illetve a karbapenem rezisztenciáért felelős *cfi*A gén együttes jelenlétét munkacsoportunkon kívül csak W. Jafal és kollégái vizsgálták és közölték. Eredményeik szerint a 72 (34,2%) *bft*-pozitív izolátum multirezisztens (MDR) volt, ezek közül 64 (88,9%) *bft*-1 és 8 (11,1%) *bft*-2 altípus volt, a *bft*-3 pozitív törzsek egyike sem volt multirezisztens. Az összes karbapenem rezisztens törzs hordozta a *cfi*A gént, ez a 210 *bft*-pozitív izolátum 16,2%-ának felel meg. Nem találtak szignifikáns összefüggést a *bft* gének és *cfi*A gén előfordulása között. A *fnp* gén jelenlétét nem vizsgálták. Mivel egyéb, erre vonatkozó adatot a szakirodalomban nem találtam, ezért további, nagyobb számú törzzsel érdemes lenne a vizsgálatunkat folytatni.

11. Kérem a jelöltet, hogy ismertesse milyen antibiotikum rezisztencia mechanizmusokat képes a MALDI TOF MS rendszer detektálni és ismertesse a véleményét arról, hogy alkalmasnak tartaná-e a jövőben a MALDI TOF MS rendszert, hogy antibiotikum rezisztencia vizsgálatokat végezzenek vele a rutin mikrobiológiai laboratóriumban.

- Az antibiotikum-rezisztencia korai, gyors felismerése a MALDI-TOF MS segítségével különösen hasznos lehet a klinikusok számára az antibiotikum-terápia ésszerűsítése érdekében a szisztémás fertőzésben szenvedő betegek terápiájának vezetése során, illetve minden olyan esetben, amikor a terápia hozzájárul a szervek működésének megőrzéséhez és/vagy a beteg túléléséhez. A multi-drog rezisztencia különösen drámai probléma a szisztémás fertőzésekben, valamint a kritikus testtájakat érintő fertőzésekben (pl. szem, idegrendszer, szepszis) ahol a hatékony terápia időben történő beadása alapvető fontosságú a szervspecifikus funkciók megkímélésében, vagy a beteg túlélése érdekében. Ezért számos tanulmány vizsgálja a MALDI-TOF MS technológia alkalmazásának lehetőségét az antibiotikum-rezisztencia gyors kimutatására elsőként a véráram fertőzésekből izolált bakteriális kórokozókban, valamint az antifungális rezisztencia kimutatására patogén gombákban.

- Jelenleg a pontos baktérium species identifikáláson túl már több, különböző osztályba tartozó antibiotikummal szembeni antimikrobiális rezisztenciát sikeresen detektál a MALDI-TOF módszer a klinikailag releváns baktérium fajokban, beleértve az *Enterobacteriaceae* család tagjait, nem fermentáló Gram-negatív baktériumokat, a Gram-pozitív coccusokat, anaerob baktériumokat és mycobacteriumokat. A legszélesebb körben használt módszerek közé tartozik a béta-laktamáz aktivitás mérése a béta-laktám gyűrű hidrolízisének kimutatásával, az antibiotikum rezisztenciáért/csökkent-érzékenységért felelős vagy azzal összefüggő biomarkerek felismerése, valamint a vagy antimikrobiális gyógyszerek nélkül.

*1. A **béta-laktamáz aktivitás** mérése MALDI-TOF MS-vel*

A MALDI-TOF MS egyik első sikeres alkalmazása az antibiotikum-rezisztencia kimutatására annak a megfigyelésnek az eredménye, hogy a béta-laktám gyűrű hidrolízise a béta-laktám antibiotikumok béta-laktamázt termelő (aerob és anaerob) baktériumok általi expozíciója után

a tömegspektrumokban az antibiotikumnak megfelelő csúcs csökkenésével és a hidrolízis termékeit képviselő csúcsok megjelenésével módosulhat.

- A véráramfertőzést okozó Gram-negatív baktériumok karbapenem-rezisztenciájának kimutatására vizsgálatot végeztek az imipenem hidrolízisének mérésével *Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Enterobacteriaceae* baktériumokban. Az elemzést egy MBT Compass STAR-BL modul szoftver (Bruker Daltonics) segítségével hajtották végre, automatikusan eredményt (érzékenység vagy rezisztencia) számolva az antibiotikum hidrolízisének mértéke alapján. Ez a vizsgálat, amely a baktériumok 30 perces inkubálását igényli az antibiotikummal, 98%-os érzékenységet és 100%-os specificitást mutatott, 60 perces inkubációval mindkettő elérte a 100%-ot. A béta-laktám-rezisztencia azonban csak akkor mutatható ki, ha béta-laktamázok közvetítik, míg a többi rezisztencia-mechanizmus nem derül ki, ezért a negatív eredményeket más vizsgálatokkal kell megerősíteni.

2. A gyógyszerrezisztenciával összefüggő ***biomarkerek*** *azonosítása*

- A baktériumok karbapenemekkel szembeni rezisztenciájának kimutatására javasolt MALDI-TOF MS alapú megközelítések egyike a *bla*KPC karbapenemáz géneket hordozó plazmidok azonosítására támaszkodik. A közelmúltban azonosították az *A. baumannii* kiterjesztett spektrumú C osztályú béta-laktamázt, amely az *Acinetobacter*-eredetű cefalosporinázok (ADC) családjába tartozik (m/z~40,279) és a karbapenem-rezisztencia lehetséges bio-markereként értékelték. Az érzékenység 96%-os és a specificitás 73% volt, összehasonlítva a mikrodilúciós imipenem-érzékenységi tesztekkel (Chang *et al.*, 2018). A ClinProtTools elemző szoftver (v3.0; Bruker Daltonics) segítségével a KPC-t termelő és a KPC-t nem termelő *K. pneumoniae* törzsek fehérje mintázatának lehetséges eltéréseit vizsgálva 11,109-Da csúcsot detektáltak a KPC-termelő izolátumokban és ez a csúcs minden KPC-t nem-termelő izolátumban hiányzott. Korábbi eredmények azt mutatták, hogy a 11,109-Da csúcs egy hipotetikus p019 nevű fehérje hasítási terméke (Lau *et al.*, 2014), mivel azonban a p019 polipeptid hiányzott a blaKPC-t hordozó plazmidok egy részében, a negatív eredményeket megerősítő tesztekkel kell kiegészíteni.

- A meticillin-rezisztencia heterogén jellege a *Staphylococcus aureus*-ban akadályozta a meticillin-rezisztens *S. aureus* (MRSA) és a meticillin-érzékeny *S. aureus* (MSSA) egyértelműen megkülönböztethető csoportokba történő besorolását az egyes törzsek spektrumprofiljainak klaszterelemzése alapján (Wang *et al.*, 2013). Részleges sikert értek el egy olyan módszer kidolgozásával, amely egy fenolban oldódó fehérjetoxin (PSM-mec) termelésére támaszkodik az MRSA törzsek esetében, amelyet a MALDI-TOF MS detektálhat 2415 ± 2,00 m/z molekulatömeg/töltés csúcsként és az MRSA-izolátumok legfeljebb felében lehet jelen (Rhoads *et al.*, 2016; Schuster *et al.*, 2018). A PSM-mec peptid nem okoz meticillin-rezisztenciát és biológiai funkciója ismeretlen, de expressziója összefügg a meticillin-rezisztenciával. Kimutatták, hogy a 2415 ± 2,00 m/z csúcs jelenléte megjósolja a *mec*A gén hordozást *S. aureus*-ban, közel 100%-os specificitással. Az „MBT subtyping module" (Bruker Daltonics) szoftvert a PSM-mec kimutatására fejlesztették ki az *S. aureus* izolátumok tömegspektrumában, közvetett bizonyítékot szolgáltatva a meticillin-rezisztenciára. Bár a PSM-mec jelenléte összefügg a meticillin-rezisztenciával koaguláz-negatív

staphylococcusokban (CoNS) is, ezek többsége nem termeli (Schuster *et al.*, 2018), így korlátozottan használható a methicillin-rezisztencia kimutatására ebben a baktérium csoportban.

- Az extrém gyógyszerrezisztens *P. aeruginosa* fertőzések növekvő előfordulása a meghatározott magas kockázatú klónok globális terjedésének köszönhető. Közülük az ST175 különösen gyakori Spanyolországban és Franciaországban. A MALDI-TOF biomarker csúcsalapú felismerési modellt három spanyol és francia gyűjteményben értékelték. A spektrumanalízis két biomarker-csúcsot (6,911 és 7,359 m/z) mutatott ki az összes ST175 törzsben, amelyek az érzékeny törzsekben hiányoztak. A 7,359 m/z csúcs már ismert volt az ST175-esetében (Cabrolier *et al.,* 2015), a második csúcs felismerése 97,8%-ra növelte a specificitást (Mulet *et al.*, 2019).

- Egy másik megközelítés, amely a membrán lipidek tömegspektrometriai elemzésére összpontosított bebizonyította, hogy a bakteriális glikolipidek fajspecifikus jellemzőkkel rendelkeznek, amelyek lehetővé teszik a baktériumok azonosítását. Ezután egy lipid-extrakciós protokollt írtak le (Liang *et al.*, 2019), amely az azonosítási időt <1 órára csökkenti. Ezt a módszert vizsgálták az antibiotikum-rezisztencia kimutatására és a mikrobák azonosítására a tenyésztés nélkül, a klinikailag releváns ESKAPE kórokozók és colistin rezisztens baktériumok esetén. Különböző rezisztencia biomarkereket találtak: az mcr-1-tartalmú *P. aeruginosa* törzsek tömegeltolódást mutattak (1,446–1,569 m/z), ami a lipid A-hoz adott PEtN (Δm/z 123) adalékból származik. Az 1,569 m/z ion nem figyelhető meg az érzékeny törzsekben; míg a *K. pneumoniae* az lipid A AraN-modifikációját mutatta (Am/z 131), amely a hexa-acetilezett lipid-A (1,824 m/z) terminális foszfátcsoportjához kapcsolódott és módosított szerkezetet eredményezett 1,955 m/z nyomáson; hasonlóan a *Morganella morganii* és AraN-módosított lipid A-ionok tömegspektruma 1,796-ról 1,927 m/z-re tolódott.

- A fent leírt módszerek egy-egy rezisztencia-mechanizmusra specifikusak, ezért megkövetelik a negatív eredmények megerősítését. Előnyük, hogy rutinszerűen azonosítási eljárást alkalmaznak, anélkül, hogy az adott baktériumtörzset antibiotikummal inkubálnák, majd az identifikációs lépés után egy másik spektrális elemzés következik, kivéve a Liang módszerét, amely nem igényel előtenyésztést.

3. MALDI biotípus-antibiotikum érzékenységi teszt gyors teszt (MALDI Biotyper-Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay: ***MBT-ASTRA)***

- Az MBT-ASTRA gyors módszer az antibiotikum-rezisztencia kimutatására a MALDI-TOF MS szoftvereszköze segítségével, amely kiszámítja és összehasonlítja az antibiotikum hatásnak kitett vagy antibiotikumnak nem kitett baktériumok spektrumának görbe alatti területét (AUC). A vizsgált baktériumtörzs AUC-értékeit összehasonlítják a baktériumok szaporodásának mérésével: ha a törzs érzékeny az adott antibiotikummal szemben, a baktérium-szuszpenzió és az antibiotikum AUC-értéke csökkenni fog az antibiotikum nélküliéhez képest, míg rezisztens törzs esetén az AUC-érték antibiotikummal vagy anélkül változatlan marad.

- Elvileg az MBT-ASTRA alkalmazható az antibiotikumok és a baktériumok minden kombinációjára (Ceyssens *et al.*, 2017). Értékelték az MBT-ASTRA módszert az

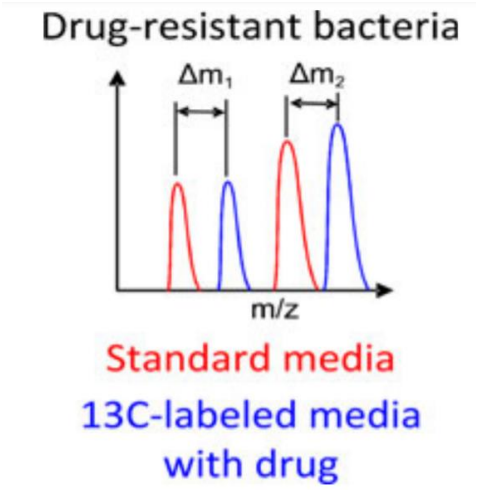
antimikrobiális rezisztencia kimutatására számos véletlenszerűen kiválasztott *Mycobacterium tuberculosis* és nem tuberkulózisos mycobacterium (NTM) klinikai izolátumban. A *M. tuberculosis* törzseket rifampicinre, izoniazidra, linezolidra és etambutolra, valamint az NTM klaritromicinre és rifabutinra való érzékenységet tesztelték.

- Az MBT-ASTRA módszert vizsgálták (Jung *et al*., 2014) a gentamicinnel és ciprofloxacinnal szembeni érzékenység kimutatására különböző *Enterobacteriaceae*-törzsekkel, valamint monomikrobiális haemokultúrákból közvetlenül kinyert Gram-negatív baktériumok esetén cefotaximmal, piperacillin-tazobactammal és ciprofloxacinnal szemben. Összességében a mikrobiális azonosítás és az érzékenységi teszt eredményeit ~4 óra alatt érték el. A kísérletek során egyértelmű különbséget sikerült megfigyelni az érzékeny és a nem érzékeny izolátumok között a gentamicin esetében, a ciprofloxacin és a piperacillin-tazobaktám esetében néhány izolátumot tévesen minősített érzékenynek az MBT-ASTRA, főleg akkor, ha a MIC értékek közel voltak a vizsgálatban alkalmazott antibiotikum koncentrációhoz. Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy az MBT-ASTRA ígéretes megközelítés lehet a monomikrobiális haemokultúrákból közvetlenül kinyert Gram-negatív baktériumok gyors antibiotikum érzékenységi vizsgálatához, ugyanakkor rámutatnak a módszer optimalizálásának szükségességére is.

- Az MBT-ASTRA módszert Justesen és mtsai, 2018-ban a *B. fragilis* antibiotikum érzékenységi vizsgálatára alkalmazták, egyértelműen kimutatva a clindamycin, meropenem vagy metronidazol hatásának kitett, érzékeny (ATCC 25285) és rezisztens (O18) törzs közötti különbséget. A módszer pontosságát azonban klinikai izolátumokon kell megerősíteni.

*4. A csúcsváltozás detektálásán alapuló vizsgálatok stabil izotópjelölés (MBT-rezisztencia) után Assays Based on Detection of Peak Shift After Stable Isotope-Labeling: (**MBT-Resist**)*

- A MALDI-TOF MS által a baktériumok gyógyszer rezisztenciájának meghatározására szolgáló másik megközelítés a nem radioaktív izotóppal jelölt táptalajok felhasználásán alapul (Demirev *et al.,* 2013). A baktériumokat párhuzamosan két különböző táptalajban tenyésztik, az egyik nem tartalmaz izotópot, a másik pedig ^{13}C-izotópot tartalmaz szénkomponensként. Az antibiotikum tartalmú stabil izotóppal jelölt táptalajban növesztett intakt mikroorganizmus tömegspektrumát összehasonlítják a nem jelölt táptalajban tenyésztett intakt mikroorganizmus tömegspektrumával a gyógyszer jelenléte nélkül. A gyógyszer rezisztenciát egy vagy több mikroorganizmus-biomarker jellegzetes tömegeltolódásának előrejelzésével lehet meghatározni bioinformatikai algoritmusok alkalmazásával. Az ilyen jellegzetes tömeg-eltolódások megfigyelése azt jelzi, hogy a mikroorganizmus még a gyógyszer jelenlétében is életképes, így beépíti az izotópos jelölést a jellegzetes biomarker molekulákba. A módszer teljesítményét az intakt *E. coli* példáján szemléltetem, amelyet kontrollban (jelöletlen) és ^{13}C-jelölt táptalajon szaporítottak és a MALDI TOF MS elemzi. A rezisztens baktériumok a ^{13}C-et tartalmazó polipeptidjeikbe beépülő antibiotikum jelenlétében szaporodhatnak, ami a csúcsok elmozdulását eredményezi a tömegspektrum magasabb m/z értékére.



Forrás: Demirev PA, Hagan NS, Antoine MD, Lin JS, & Feldman AB: (2013). Establishing Drug Resistance in Microorganisms by Mass Spectrometry. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 24(8), 1194–1201.

- Az MSSA-t MRSA-törzsektől megkülönböztető módszer alkalmazhatóságának értékeléséhez ^{13}C-jelölt lizint tartalmazó tenyésztő táptalajt használnak oxacillin- és cefoxitin-rezisztens *S. aureus* klinikai izolátumok vizsgálatára (Sparbier *et al*., 2013). A baktériumokat 3 órán át három különböző körülmény között inkubálták: ^{12}C-tartalmú táptalaj antibiotikum nélkül, ^{13}C-tartalmú táptalaj antibiotikum nélkül és ^{13}C-tartalmú táptalaj antibiotikummal.

- Jung és mtsai 2014-ben *P. aeruginosa* törzsek meropenem-, tobramicin- és ciprofloxacin-érzékenységét elemezték a MALDI TOF módszerrel. A törzseket normál táptalajban, (13) C6-(15) N2-jelzett lizinnel, valamint jelzett lizinnel és antibiotikummal kiegészített táptalajban inkubálták. A jelölt aminosavak beépülése miatt bekövetkező csúcseltolódásokat MALDI-TOF MS-sel detektálták. Félig automatizált algoritmust hoztak létre az adatok gyors és elfogulatlan kiértékeléséhez. A javasolt teszttel mindhárom antibiotikum esetében egyértelmű különbséget lehetett tenni a rezisztens és az érzékeny izolátumok között. Elméletileg ez a módszer, valamint az MBT-ASTRA is alkalmazható az antibiotikumok és mikroorganizmusok minden osztályára, de a két módszernek vannak hátrányai: (i) a mikrobiális növekedéshez szükséges inkubációs idő, (ii) a különböző izolátum-antibiotikum kombinációk kísérleti körülményeinek optimalizálásának szükségessége, (iii) a tömegspektrumok változása és az MIC értékek közötti összefüggés korrelációja. Az MBT-ASTRA és az MBT-Resist közötti fő különbség az, hogy az utóbbi három különböző szaporodási körülményt igényel.

5. *Antibiotikum-rezisztencia közvetlen célpontra eső mikrocsepp növekedési vizsgálattal (**DOT-MGA**)*

- Ez az innovatív módszer lehetővé tette az antibiotikumok breakpoint-koncentrációival inkubált baktériumok antimikrobiális rezisztencia/érzékenységének kimutatását közvetlenül a MALDI-TOF MS tárgylemezén (Idelevich *et al*., 2018). Ugyan a szerzők a *K. pneumoniae* és a *P. aeruginosa* törzsek esetében vizsgálták a meropenemmel szembeni rezisztenciáját, de a módszer bármilyen mikrobiális faj és antimikrobiális szer esetén alkalmazható, függetlenül a rezisztencia mechanizmusoktól. Mindkét mikroorganizmus esetében elérték a 100%-os

érzékenységet és a specificitás., Az antibiotikummal történő inkubálás után a spektrumok elemzését a MALDI Biotyper 3.1 szoftverrel végezték, amelyet rutinszerűen használunk mikrobiális azonosításra. Ugyanez a munkacsoport egy másik tanulmányukban a direkt célpontra adott mikrocsepp növekedési vizsgálatot a meropenemre nem érzékeny és meropenemre érzékeny *Enterobacteriaceae* izolátumokkal kiegészített vérmintákból származó pozitív haemokultúrák esetén értékelték.

- Correa-Martinez és munkacsoportja 2019-ben kifejlesztettek egy szűrővizsgálati panelt a kiterjesztett spektrumú béta-laktamáz (ESBL) és az AmpC béta-laktamáz aktivitás kimutatására. A panelt 50 klinikai izolátumon validálták, beleértve az *Enterobacteriaceae,* a *Hafniaceae,* a *Morganellaceae* és a *Yersiniaceae* család fajait, amelyek különböző mechanizmusokkal (ESBL és/vagy AmpC) rezisztensek a harmadik generációs cefalosporinokkal szemben. Négy cefalosporin és ESBL (klavulánsav) és/vagy AmpC (kloxacillin) β-laktamáz inhibitor közötti szinergetikus hatást értékeltek a hatékony β-laktamáz termelés kimutatására. A baktériumok inkubációs idejét β-laktamáz inhibitorokkal és/vagy antibiotikumokkal együtt vagy anélkül 4 órán belülre optimalizálták. A PCR-eredményekhez képest az ESBL, az AmpC és az ESBL+ AmpC rezisztencia pozitív százalékos egyeztetési értékei 94,4;, 94,4 és 100%, a negatív százalékos egyeztetési értékek pedig 100; 93,7 és 100% voltak.

- A jövőbeli kutatások további erőfeszítéseket fognak tenni a MALDI-TOF MS-alapú vizsgálatok finomítása és optimalizálása érdekében, hogy a lehető legrövidebb időn belül pontos és megbízható eredményeket érhessenek el. Az ezen a területen folytatott jövőbeli kutatások fő célja a módszerek egységesítésének és a mikrobák egyidejű érzékenységi vizsgálatának az antimikrobiális szerek különböző csoportjaira történő kiterjesztése lesz a multirezisztens mikroorganizmusok elterjedtsége miatt. Eddig csak két, kereskedelemben kapható készletet engedélyeztek a spektrumok automatizált értelmezéséhez szükséges szoftverekkel a klinikai mikrobiológiai laboratóriumokban a karbapenemáz aktivitás vagy a 3. generációs cefalosporinokkal szembeni rezisztencia kimutatására.

- Összegzésként elmondható, hogy a gyógyszer-rezisztenciával összefüggő csúcsok közvetlen kimutatásának lehetősége a mikrobiális izolátumok MALDI-TOF tömegspektrumában korai, hasznos, bár korlátozott információval szolgálhat, amely segítséget nyújthat a klinikusoknak az empirikus antimikrobiális terápia ésszerűsítésében, főleg néhány javasolt markernél a karbapenem-rezisztencia kimutatására. Új analitikai algoritmusok kifejlesztése, az eljárások automatizálása és a vizsgálatok optimalizálása várhatóan kibővíti és finomítja a MALDI-TOF MS klinikai alkalmazási lehetőségeit a klinikai diagnosztikai mikrobiológiában.

12. Mi a jelölt véleménye arról, hogy a *Cutibacterium acnes* példájára a jövőben a a MALDI TOF MS rendszer alkalmas lehet-e nozokómiális fertőzések epidemiológiai nyomon követésére a kórházakban, továbbá mi a jelölt véleménye arról, hogy alkalmas-e a MALDI TOF MS a *C. difficile* különböző ribotípusainak felismerésére?

- A baktériumok és gombák speciesszintű meghatározásán túl egyre gyakrabban alkalmazzák a MALDI-TOF MS módszert szubspeciesek meghatározására, mint például *Francisella tularensis, Legionella pneumophila, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Streptococcus*

pneumoniae esetében. Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy a módszerrel lehetőség van különbséget tenni a *Salmonella enterica* ssp. *Typhi enterica* szerovar és a kisebb klinikai jelentőséggel bíró *Salmonella enterica* ssp. *enterica* szerotípusok között. Sőt, bebizonyosodott, hogy még meg lehet különböztetni a *Campylobacter jejuni* ssp. *jejuni* különböző MLST szekvencia típusait (STs) egyetlen biomarker ion felhasználásával.

- A fajkomplexek, mint a *Burkholderia cepacia* komplex és az *Acinetobacter baumannii* komplex tagjainak vagy a *Candida parapsilosis* komplex tagjainak fajszintű azonosítására is alkalmas a módszer. Bizonyos esetekben a tömegspektrum alapján lehetőség van virulens és kevésbé virulens patotípusok elkülönítésére, például a *Yersinia enterocolitica* esetében a SARAMIS adatbázis speciális, célzott fejlesztésével elkülöníthető volt a nem patogén 1A patotípus a patogén 2-es és 4-es patotípustól (Vanlaere *et al.*, 2008). Saját vizsgálataink igazolták, hogy a módszer alkalmas a *Streptococcus agalactiae* magas virulenciájú ST-17 és ST-1 klónjainak elkülönítésére a törzsek identifikálását követően (dr. Ábrók Mariann PhD 2021).

- Egyes kísérletek bizonyítják, hogy a módszer valódi, járványügyi szempontból fontos tipizálási vizsgálatokra is alkalmas. A tömegspektrumok alapján készített dendrogramok a vizsgált törzsek közötti hasonlóságról adnak felvilágosítást néhány perccel az azonosítást követően. Az MRSA-törzsek fontosabb klonális komplexei (CC5, CC8, CC22, CC30, CC45) reprodukálható spektrum-különbségeket mutattak a species identifikálást követő analízis alapján, amelyet Biotyper 2.0 és FlexAnalysis programok (Bruker) segítségével végeztek el.

- A *Listeria monocytogenes* I., II. és III. csoportba tartozó törzsek esetében a hagyományos pulzáló mezejű gélelektroforézis (PFGE) módszert alkalmazva a molekuláris tipizálással teljesen megegyező eredményt kaptak a tömegspektrométerrel történő méréssel, igazolva a MALDI-TOF MS-módszer epidemiológiai célú tipizálásra való alkalmasságát például ételeredetű esethalmozódás esetén (Barbuddhe *et al.*, 2008). A mycobacteriumok speciesszintű identifikálása mellett a MALDI-TOF MS-sel a kapott spektrumok dendrogramban való összehasonlító megjelenítése alapján az izolátumok közötti rokonsági fokra is következtetni lehet - hasonlóan a spoligotipizálási módszerhez.

- A klaszterezésen alapuló MALDI-TOF MS-tipizálási módszerek fő problémája a tömegspektrum csúcsainak megfelelő fehérjékkel kapcsolatos ismeretek hiánya. Ez a probléma bizonyos mértékben megoldható a proteotipizálás segítségével. Ezt a mikrobiális tipizálási módszert eleinte tömegspektrometria-alapú PhyloProteomics-nak (MSPP) hívták, jelenleg proteotipizálásnak nevezik. A proteotipizálási módszer alapvető jellemzője az allélek izoformáinak aminosav-szekvencia katalógusa. Ezek az izoformák a riboszomális fehérjéket kódoló gének (biomarker gének) nem szinonim mutációinak eredményei. A mutációk tömegeltolódások formájában detektálhatók a MALDI-TOF spektrumokon belül.Ezután lehetséges egy izolátumot egy specifikus proteotipizálásból származó típushoz rendelni a rögzített biomarker tömegek sémájának és a megfelelő aminosav-szekvenciáknak az elemzésével. A proteotipizálás legfontosabb előnye a teljes tömegspektrum-klaszterezési megközelítésekhez képest, hogy a filogenitás levonásához csak az ugyanazon fehérje alléles izoformáinak egy meghatározott halmazához rendelt tömegváltozásokat veszik figyelembe.

A C. difficile tipizálás lehetőségei:

- Az elmúlt évtized során a hipervirulens PCR-ribotípusok (RT) - például a RT027 vagy az RT176 - gyorsan megjelentek és elterjedtek világszerte, mely ribotípusok megjelenése a betegség súlyosságával, fokozott mortalitási arányokkal járt együtt. Ezért nagyon fontos, hogy a lehető leggyorsabban, tipizálási módszerekkel is azonosítani lehessen a járványtörzseket. Eddig a *C. difficile* törzsek tipizálását főként a PCR-ribotipizálás tette lehetővé, ez a módszer azonban speciális laboratóriumokra korlátozódik, magas költségekkel iár, azonban a betegség kitörése esetén az azonnali reagáláshoz elengedhetetlen a gyors, pontos, reprodukálható és olcsó diagnosztikai módszer. A MALDI-TOF MS-t használó kutatók már a 2010-es évek elején vizsgálatokat végeztek a *C. difficile* törzsek tipizálására alacsony molekulatömegű (LMW) tömegtartomány (2–20 kDa) felhasználásával, azonban csak néhány specifikus, virulensebb ribotípusra összpontosítottak. Az igen komoly járványügyi jelentőséggel bíró, gyakori *C. difficile* ribotípusba tartozó törzseket (001, 027 és 126/078) el lehet különíteni egy saját fejlesztésű adatbázis használatával, a SARAMIS™ (Shimadzu) szoftver segítségével. Reil és mtsai 2011-ben 25 különböző *C. difficile* PCR ribotípus standard készletének felhasználásával adatbázist készítettek a SARAMIS™ szoftverben rögzített különböző tömegspektrumokkal. Az adatbázist 2009-ben prospektív módon összegyűjtött, 29 különböző PCR-ribotípusba tartozó, 355 *C. difficile* törzzsel validálták. Megállapították, hogy egy kiterjesztett MALDI-TOF rendszer képes volt felismerni a 001, 027 és 078/126 ribotípusok specifikus markereit, lehetővé téve ezen törzsek gyors és hatékony azonosítását.

- Cheng és mtsai. (2018) felfedezték, hogy 5 jellemző marker alapján a *C. difficile* Clade 4 törzseket meg lehet különböztetni más *C. difficile* törzsektől a MALDI-TOF MS segítségével Egy másik, nemrégiben készült tanulmányban Corver és munkatársai két peptid markert azonosítottak (m/z = 4927,81 és m/z = 5001,84), amelyek lehetővé teszik a *C. difficile* MLST 1. és 11. típusának MALDI-MS általi azonosítását. Ortega és munkatársai egy másik MALDI-TOF MS-alapú altípus-alapú megközelítést tettek közzé: olyan nagy molekulatömegű (HMW) tipizálásnak nevezett technikát alkalmaztak, ahol a 30-50 kDa tömegtartományú fehérjeprofilt elemezték. Ez a módszer a *C. difficile* törzseket a „surface layer" fehérje szerint csoportosítja. A tanulmányon belül különböző HMW profilokat azonosítottak, az egyik ilyen profil csak az RT027 törzseket hordozta magában, ami értékes eszköz lehet a gyors típus meghatározásra járványos helyzetben.

- 2018-ban Li és mtsai: a *C. difficile* 37 típusú multilokusz szekvencia (ST37), amely főleg a 017 ribotípusnak felel meg, domináns genotípus volt Kínában. Ebben a tanulmányban a MALDI-TOF MS-t 204 *C. difficile* klinikai izolátum elemzésére és jellemzésére használták és azt találták, hogy két fő fehérje csúcs (m/z 3,242 és 3,286) megoszlása szignifikánsan különbözött az ST37 és a nem ST37 típus törzsek és a klinikai izolátumok között. Ezt a megállapítást megismételték és megerősítették mind a bioMérieux Vitek MS, mind a Bruker Microflex LT rendszerek alkalmazásával számos földrajzi régióból származó izolátum vizsgálatával. A két csúcs kombinációja 49 ST37 izolátum közül 47-ben volt jelen, ami 95,9% -os érzékenységet eredményezett. Ezzel szemben a csúcskombináció 155 nem ST37 izolátum közül 153-ban hiányzott, ami 98,7%-os specificitást mutatott.

- Calderano és mtsai 2021-ben az LMW-n alapuló MALDI-TOF tipizálási módszerekre összpontosító korábbi vizsgálatok mellett a legvirulensebb ribotípusok (például RT027 és RT078), és további HMW és proteotipizálási vizsgálatok elemzésére olyan fehérje biomarkerek azonosításának lehetőségét vizsgálta, amelyek egyedileg képesek kimutatni a jelenleg felismert ribotípusokat. Bár az egyes ribotípusok differenciálása az LMW vagy a HMW tartományban is elérhető, a ribotípusok nagy számának figyelembevételével a PCR-ribotipizáláshoz képest a legjobb megkülönböztető erőt mindkét molekuláris tartomány kombinált elemzésével érték el.

Végezetül szeretném ismételten megköszönni Szabó Dóra Professzor Asszonynak disszertációm apró részletekre is kitérő, alapos bírálatát, munkásságom méltatását és pozitív értékelését és tisztelettel kérem válaszaim elfogadását.

Zsoldiné dr Urbán Edit

Pécs 2021 július 01.