Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Molekuláris Biotechnológiai
és Mikrobiológiai Tanszék
4032 Debrecen, Egyetem tér 1

# OPPONENSI VÉLEMÉNY

Zsoldiné Dr. Urbán Edit

„Klinikailag fontos humán patogén anaerob baktériumok diagnosztikája és antibiotikum rezisztencia vizsgálata”
című MTA doktori értekezéséről

Dr. Urbán Edit MTA doktori értekezésében az elmúlt mintegy 20 év kutatási eredményeit foglalta össze. A dolgozatban szereplő kísérletes klinikai-epidemiológiai vizsgálatok aktualitását és gyakorlati jelentőségét nem szükséges külön hangsúlyozni. A *Clostridioides difficile*, hasonlóan a *Bacteroides/Parabacteroides* taxon opportunista humánpatogén fajaihoz, kórházi környezetben gyakran előforduló baktériumok. Orvosi mikrobiológiai, epidemiológiai vizsgálatukat többek között a *C. difficile* több földrészre is kiterjedő járványos előfordulásai, illetve a *Bacteroides/Parabacteroides* fajok, anaerob baktériumok között egyedülállóan nagy antibiotikum rezisztencia értékei és diverz rezisztencia mechanizmusai is indokolják.

Az értekezés alapját 31, a PhD fokozat megszerzése után megjelent közlemény képezi, melyekben a jelölt 17 esetben első, vagy utolsó szerző. Ez utóbbi közlemények összesített impakt faktora 29,866. A dolgozat alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora 64,793. A dolgozat alapjául szolgáló publikációk tudománymetriai adatai megfelelnek az MTA doktori disszertációkra vonatkozó követelményeknek. Jól tükrözik a dolgozatban bemutatott kutatások eredményességét, jelentőségét és a jelölt meghatározó hozzájárulását elérésükhöz.

Az értekezés hagyományos felépítésű; tartalmazza a követelményekben meghatározott valamennyi fejezetet. A disszertáció 161 oldal terjedelmű, melyből a tartalmi rész 134 oldal, az idézett közlemények felsorolása, a dolgozathoz kapcsolódó saját publikációk bemutatása és a köszönetnyilvánítás 28 oldalt tesz ki. A leírtak megértését 14 ábra és 39 táblázat segíti.

A dolgozat Bevezetés fejezetében a jelölt bemutatja a *C. difficile* és *Bacteroides/Parabacteroides* taxonok legfontosabb orvosi mikrobiológiai vonatkozásait, valamint kitér a MALDI-TOF MS módszer orvosi diagnosztikai jelentőségének ismertetésére

is. E fejezetek igényesen összegzik mindazon információkat, melyek a dolgozat további részeinek megértéséhez szükségesek. Hiányoltam azonban egy olyan részt a Bevezetés fejezet elejéről, amiben a szerző röviden megfogalmazza, hogy mi kutatásainak témája és miért ezt a témát választotta. Az olvasónak, így egészen a Célkitűzések fejezetig várnia kell, hogy kiderüljön miről fog szólni az értekezés.

A Célkitűzés fejezet precízen meghatározza azon kísérleteket, melyek eredményei a dolgozatban bemutatásra kerülnek. Kívülálló számára azonban nem világos, hogy miért pont ezeket a vizsgálatokat tervezték. Egy ilyen nagy lélegzetű összefoglaló műben pár mondatban érdemes lett volna kitérni a tervezett vizsgálatok előzményeire, jelentőségére és a kutatások távlati céljaira is.

Az anyagok és módszerek fejezet túlságosan hosszú. A legtöbb esetben elegendő lett volna talán csak felsorolni az alkalmazott módszereket a megfelelő hivatkozásokkal együtt, és a hangsúlyt inkább a kísérleti megközelítés logikájára, a saját fejlesztésű módszerek bemutatására és az adatok kiértékelésének módszertanára helyezni.

Az Eredmények fejezet az orvosi mikrobiológiában megszokott alapossággal és részletességgel mutatja be az összegyűjtött adatokat és a levont következtetéseket. Egy összefoglaló mű esetében ez a részletesség talán szükségtelen. Az adatok zömét érdemes lett volna táblázatokban, mellékletekben összefoglalni és csak a későbbi diszkusszió szempontjából valóban fontos megfigyeléseket kiemelni a szövegben. Ezen fejezet, a dolgozat három témájának megfelelően, három alfejezetre tagolódik.

Az első alfejezetben a szerző bemutatja a *C. difficile* izolátumok toxintermelésével, ribotipizálásával és antibiotikum érzékenységének jellemzésével kapcsolatos, valamint a baktérium extraintesztinális előfordulásáról gyűjtött adatait, illetve összehasonlít három, toxin-termelő *C. difficile* törzsek kimutatására alkalmas diagnosztikai módszert.

A második alfejezetben európai és magyarországi *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek antibiotikum rezisztenciájával kapcsolatos adatokat, illetve az egyes régiók közötti különbségeket tárgyalja a szerző. Kitér a magyarországi *Bacteroides* törzsek multidrog rezisztencia génjei és a magyarországi *Bacteroides fragilis* törzsek patogenitási génjei előfordulásának jellemzésére is.

A harmadik alfejezetben a jelölt azon kutatásait mutatja be, melyek klinikailag releváns anaerob baktériumok faji-, egyes esetekben típus-, illetve altípusszintű, MALDI-TOF MS módszeren alapuló identifikálásának megbízhatóságát vizsgálják.

A Megbeszélés fejezetet a dolgozat legértékesebb része. Tartalmas, informatív, logikusan felépített. Az Eredmények fejezetben bemutatott adatok megismétlését egy összevont Eredmények és megbeszélések fejezet segítségével el lehetett volna kerülni.

A szerző 20 pontban foglalta össze legfontosabb eredményeit. Tartalmi szempontból valamennyi tézispontot elfogadom. Formai szempontból nézve azonban egyes tézispontok túlságosan hosszúak és feleslegesen ismétlik azokat az adatokat, amelyeket már az Eredmények fejezetben bemutatott, majd a Megbeszélés fejezetben diszkutált a jelölt.

Legfontosabb eredményei közül kiemelendő:

1. Úttörő munkát végezett a magyarországi *C. difficile* kutatások területén.

- Munkacsoportjával megteremtette a toxin-termelő *C. difficile* törzsek okozta infekciók diagnosztikájának és molekuláris epidemiológiájának alapjait.
- Egy 20 évet átölelő időszakot lefedve részletesen vizsgálta a *C. difficile* ribotípusok térbeli és időbeli elterjedését Magyarországon. Elsőként izolálta kutatócsoportjával a 027-es ribotípusba tartozó törzset hazánkban, majd pár év múlva igazolta tömegessé válását.
- Elsőként tanulmányozta a magyarországi *C. difficile* törzsek antibiotikum rezisztenciáját és annak időbeli változását.
- Feltárta az extraintesztinális *C. difficile* fertőzések gyakoriságát és hátterét.

2. Meghatározó eredményeket ért el a magyarországi *Bacteroides/Parabacteroides* törzseket célzó orvosi mikrobiológiai kutatásokban.

- Részletesen tanulmányozta az európai és magyarországi *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek antibiotikum rezisztenciáját, a régiók közötti különbségeket és az időbeli változásokat.
- Tanulmányozta a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek multidrog rezisztenciájának molekuláris hátterét, elsőként izolált a kelet-európai régióból multirezisztens *B. fragilis* törzset, felhívta a multidrog rezisztens törzsek lokális halmozódásának lehetőségére a figyelmet és kimutatta, hogy a magyarországi multidrog rezisztens törzsek rezisztenciájának molekuláris háttere törzsenként eltérő.
- RT-PCR alapú módszert dolgozott ki, melynek segítségével feltérképezte a hazai *B. fragilis* törzsek toxintermelésének molekuláris hátterét.

3. Hozzájárult az MALDI-TOF MS módszeren alapuló klinikai identifikálási módszerek fejlesztéséhez és magyarországi elterjesztéséhez.

- Munkacsoportjával elsőként használtak Magyarországon MALDI-TOF MS módszert anaerob baktériumok faji szintű meghatározására.
- Igazolták e módszer használhatóságát a *Bacteroides/Parabacteroides* taxon klinikailag releváns fajainak meghatározására.

- Nemzetközi együttműködés keretében részt vett a *B. fragilis cfiA* rezisztencia gént hordozó és nem hordozó izolátumok (Divízió I. és II.), illetve a *Cutibacterium acnes* típusok és altípusok MALDI-TOF MS módszeren alapuló azonosítását lehetővé tévő módszerek kifejlesztésében.

*Formai észrevételek*

A korábban említett formai észrevételeket is beleértve érdemi, a dolgozat szakmai részét is érintő formai észrevételem nincs. Figyelembe véve a dolgozat terjedelmét, a formai kifogások mennyiségüket tekintve sem számottevőek.

Rövidítések jegyzéke - Azon rövidítéseket (pl. PCR, Da, kDa, bp, DNS, mRNS, UV), melyeket a szerző közismertségük miatt (jogosan) nem magyaráz meg a dolgozatban első előfordulásukkor, szükségtelen a Rövidítések jegyzékében feltüntetni.

A nyelvezet magyaros és igényes. Elírások, pontatlan megfogalmazások, szerkesztési hibák csak elvétve fordulnak elő a dolgozatban. Gyakoriak viszont a vessző hibák. Sok helyen használ a szerző rendkívül hosszú, többszörösen összetett mondatokat. E mondatok, különösen azon esetekben, amikor a vesszők sem segítik a tagmondatok felismerését, nehezen érthetőek. A „Fischer's exact teszt" magyarul „Fisher egzakt teszt". A számnevek vegyesen hol betűvel, hol számmal vannak írva. A nagyobb számnevek esetében célszerű lett volna egységesen a számok használata.

Az ábrákhoz, táblázatokhoz tartozó leírások általában kevés információt tartalmaznak, így az ábrák, illetve táblázatok egy része önmagában nem érthető, csak a szöveg alapos átolvasása után.

Az 1. ábra betűi igen aprók, nem tudtam őket elolvasni.

A 3. ábrán a zöld és piros nyilak eltérő jelentéssel bírnak, ami a szövegből ki is derül. Érdemes lett volna ezt az ábraaláírásban is jelölni.

A 49. oldalon hivatkozott 4. táblázatot nem találtam meg. (A 41. oldalon van ugyan egy 4. táblázat, de az nem a 49. oldalon jelzett adatokat tartalmazza.) Az 5. táblázatból viszont kettő is van (egy-egy a 43. és az 50. oldalon), de egyik sem mutatja be azon adatokat, amelyeknek a hiányzó 4. táblázatban kellene lenniük.

A 6. táblázat „Közvetlenül a székletből" részéből az „Összesen" oszlop hiányzik.

A 12. táblázat esetében a „19,7" után feleslegesen szerepel egy „%" jel és nincs definiálva, hogy mit jelent a „Geometriai" oszlop.

A 7. ábra vízszintes tengelyének címe „mg/ml", helyesebb lett volna a „MIC (mg/ml)" cím használata.

A 8. ábra felesleges.

A 78. oldalon említett 23. táblázat adatai valójában a 22. táblázatban vannak feltüntetve.

*Tartalmi észrevételek és kérdések*

A „szignifikáns” kifejezés láttán az olvasó automatikusan várja valamilyen statisztikai próba eredményét. Ott, ahol ilyen vizsgálatok nem történtek célszerű kerülni ezt a szót. A „*p*” (valószínűség) értéke nem lehet kisebb, mint nulla (84. oldal).

Nem találtam statisztikai elemzésekre utaló adatokat a *C. difficile* vizsgálatát bemutató fejezetekben. Néhány (pl. gyakorisági adatokban való eltérésekre, tendenciózus változásokra utaló) állítást érdemes lett volna statisztikai próbákkal is alátámasztani.

Nem találtam statisztikai elemzésekre utaló adatokat a *Bacteroides/Parabacteroides* törzsek antibiotikum rezisztenciájával kapcsolatos adatok bemutatásakor sem. Itt is érdemes lett volna a régiók közötti különbségeket statisztikai vizsgálatokkal is tesztelni.

Ugyanezen alfejezet második felétől kezdve már voltak statisztikai vizsgálatok is. E vizsgálatok adatai azonban csak részben lettek közölve. Visszatérő probléma volt, hogy a szignifikancia vizsgálatok eredményei csak egy-egy kiválasztott adatpár esetében lettek bemutatva. Nem világos, hogy a többi esetben nem végeztek számításokat, nem volt szignifikáns a különbség/korreláció, vagy biológiai szempontból nem volt jelentős mértékű a tapasztalt szignifikáns változás. A statisztikai vizsgálatok eredményeinek bemutatása általában csak a „*p*” értékek megadására korlátozódott. Az Anyagok és Módszerek fejezetben például szerepelt a Pearson-féle korrelációs és Spearman-féle rangkorrelációs vizsgálat, de korrelációs együtthatókat nem találtam a dolgozatban. Nem derült ki egyértelműen, hogy mikor milyen tesztet használtak, esetenként a számításokhoz felhasznált adatok nem, vagy hiányosan lettek megadva (a 74. oldalon hiányoztak például a magas szintű ampicillin rezisztenciát mutató törzsek gyakoriságai adatai). Érdemes lett volna az elvégzett statisztikai vizsgálatok eredményeit a táblázatokban (is) feltüntetni az összes felhasznált adattal, a módszer pontos megnevezésével, korrelációs számításoknál a korrelációs koefficiensekkel együtt.

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

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

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

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

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

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

Összefoglalva megállapítom, hogy a doktori disszertáció eredeti kutatásokon alapul és jelentős, új tudományos eredményeket fogalmaz meg. Tudományos teljesítménye és a benyújtott értekezés alapján Zsoldiné Dr. Urbán Editet méltónak tartom az MTA doktori fokozat elnyerésére, javaslom a nyilvános vita kitűzését és a disszertáció alapján az MTA doktora cím odaítélését.

Debrecen, 2021. március 4.

Emri Tamás
egyetemi docens
az MTA doktora