

## Válasz Prof. Dr. Kónya József bírálataira

Tisztelt Professor Úr!

Köszönöm, hogy elvállalta disszertációm értékelését és köszönöm kérdéseit.

Professor Úr megjegyzéseivel kapcsolatban:

*„Formailag és tartalmilag is szokatlan megoldás, hogy a szakirodalmi háttér lényeges területeit a jelölt nem rakta össze erre dedikált fejezetben. Az általános bevezetés a földrajzi és társadalmi háttér valamint a régiós antibiotikum surveillance ismertetésére szorítkozik míg további szakmai háttér az egyes projekteknél ismert a jelölt.....A szűk szakterületén nem jártas szakemberekre gondolva az értekezés szakirodalmi háttéréből hiányolom a releváns genetikai mechanizmusok és elemek működésének és vizsgálati kiértékelésének az átfogó ismertetését, mivel ezek hiánya megnehezíti a vizsgálati konklúziók követését az egyes projektekben....”*

Köszönöm a megjegyzést, és bár ez kemény kritika, az alkalmazott eljárás teljesen tudatos döntés eredménye volt. Feltételezem, az MTA doktori disszertáció céljainak értelmezésében van kettőnk között eltérés. Céлом semmiképpen nem egy laikus olvasó számára szóló összefoglaló, ismeretterjesztő írás elkészítése volt, hanem hogy a szakma képviselői előtt érthető, követhető módon ismertessem munkámat. A vizsgálatok egy, a szakma hazai képviselői előtt talán kevésbé ismert környezetben történtek. Ezek a helyi, a hazaitól sokban eltérő viszonyok (helyi demográfiai viszonyok, egészségügyi rendszer, antibiotikum felhasználás, surveillance stb) jelentősen befolyásolták az általunk vizsgált kérdéseket, az antibiotikum rezisztencia prevalenciát, a rezisztens törzsek terjedést. Ezek bemutatását elengedhetetlennek tartottam ahhoz, hogy az eredmények a megfelelő kontextusba helyezhetőek legyenek. Úgy gondoltam, hogy ez fontosabb volt, mint az olyan ismeretek (pl. horizontális gén transzfer, integronok stb.) bemutatása, ami már minden, nem csak az antibiotikum rezisztencia génekkel foglalkozó orvosi, klinikai mikrobiológus számára evidencia. Hogy az amúgy is hosszú disszertáció ne legyen még terjedelmesebb, ezért választottam azt a megoldást, hogy a mind a négy nagy projektet érintő helyi ismertető kerüljön a Bevezetésbe, míg az egyes projektek háttérét jelentő specikus információk a négy fejezet előtt az Előzmények fejezetekben kerültek röviden ismertetésre.

A dolgozatot újra olvasva változatlanul úgy érzem, hogy a szükséges háttér ismeretek itt kellően összefoglalásra és leírásra kerültek ahhoz, hogy az adott fejezetben a mikrobiológiában közismert alapok ismeretét feltételezve, illetve azok részleteire irodalmi hivatkozások formájában utalva a vizsgálatok miéртje, a problémák, az eredmények interpretálása és az esetleges újdonságok a szakemberek számára követhetőek, értelmezhetőek legyenek. Az e fejezetekben szereplő, úgy vélem

bőséges hivatkozások (az ESBL termelőkről szólóban 17, a nem fermentálókról szólóban 26, a karbapenem rezisztens bélbaktériumokról szólóban 30, végül a kolisztin rezisztenciáról szólóban 12) részint az alapvető releváns ismeretek jól ismert összefoglalói, részint a helyi specifikus információk ismertetői. Sajnálom, de elfogadom, ha Professor Úr úgy érzi, hogy a fenti célt nem sikerült maradéktalanul elérnem.

Ami a terminológia angol-magyar szóhasználatát illeti, kétségkívül itt saját megítélésemre hagyatkoztam, és azokat a kifejezéseket, amik a hazai szaknyelvben inkább angolul rögzültek, azokat megtartottam angolul (pl. „load régió”, „primer walking”), míg azokat, melyeknél inkább a magyarra fordított verzió terjedt el, pl. polimeráz láncreakció, az angolnak megfelelő rövidítés ellenére (PCR) magyarul használtam. A rövidítések jegyzékében igyekeztem a betűszavakat feloldani – ahol az csak angolul volt megoldható, ott az angol verzió megadásával, ahol a betűk magyarul is értelmezhetőek voltak (pl. MRSA) ott a magyarral – de, újra olvasva a rövidítések jegyzékét, kétségkívül ezt nem sikerült minden esetben konzekvensen követnem.

A rövidítések visszafogottabb használatával kapcsolatban a tudományos értekezések, cikkek eljárását követtem, azaz, ami egyszer kiírásra, feloldásra került, és van nemzetközileg elfogadott rövidítése, azt rövidítettem, a feloldást a rövidítések jegyzékében megadva.

Az akronimek ragozott alakjai esetén, bár ezek a szakmai beszédben jelentős mértékben „főnevesültek” és elterjedtek, valóban elegánsabb lett volna írásban pl. „CTX-M-15 -öt” helyett „CTX-M-15 enzimet” stb. írni.

Professor Úr kérdéseivel kapcsolatban:

**1. Az ESBL termelés mögött álló gének incidenciája az enteroaggregatív törzsekben véletlen eseménynek, horizontális akvizíciónak tűnik.** Ezzel az állítással egyetérték, amennyiben minden genetikai esemény “véletlenszerű”, illetve a ESBL gének jelenléte *Escherichia coli*-ban kivétel nélkül horizontális géntranszfer, bár nem mindig plazmid akvizíció, eredménye. A leírt öt törzsből is csak két esetben tudtuk a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> jelenlétét plazmidon igazolni, azonban mind az öt esetben a gén előtt fellelhető volt az *ISEcp1*, ami az esetek nagy részében a gént mobilizálja (Karim A. et al. Plasmid mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence *ISEcp1*. FEMS Microbiol Lett 2001; 201: 237–241, Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol. 2006 Oct;9(5):466-75.). A kérdésre: **„Léteznek-e olyan epidemiológiai vagy biológiai hatások, amelyek az antibiotikummal nem kezelendő virulens bélbaktériumokat fogékonyabbá tennék plazmid kódolt rezisztencia hordozására?”** válaszom: Jól ismert, hogy eltekintve a donor és recipiens tulajdonságaitól, a plazmidok eltérnek egymástól konjugálhatóságukat illetően. Egy antibiotikum rezisztenciát kódoló plazmid prevalenciáját nyilvánvalóan az adott antibiotikumok jelenléte, a szelekciós nyomás révén elősegíti, sőt egyes antibiotikumok, pl. fluorokinolonok, jelenléte még a konjugációs frekvenciára is

hatással lehet. Ebben az értelemben nem számít, hogy az adott antibiotikumot kezelésképpen kapja-e meg a beteg, vagy az a környezetben is fellelhető.

Ha az antibiotikumoktól független biológiai, epidemiológiai hatásokat vizsgáljuk, az utóbbiakkal kapcsolatban a környezeti higiénének mindenképpen szerepe van, azaz, hogy milyen mértékben exponálódik egy élőlény (akár állat, akár ember) egy másik individuum flórájával, mely az újabb donor-recipient találkozásokat lehetővé teszi. Ilyen szempontból a szennyvízelvezetés teljes vagy részleges hiánya, a szennyvizek kezelésének bizonyos módszerei jelentős mértékben elősegíthetik a rezisztens bélbaktériumok terjedését a környezetben, és ily módon a "donorok" száma, tehát a konjugáció valószínűsége is nő.

Ami a biológiai hatásokat illeti, ismét csak antibiotikumoktól és az egyes plazmidok konjugációs apparátusától függetlenül az befolyásolhatja egy plazmid terjedését, rögzülését egy populációban, hogy hordoz-e a recipient számára az antibiotikum rezisztenciától függetlenül előnyös géneket, és hogy a plazmid replikációja a recipient számára energetikailag „megéri-e”. Ezen túlmenően a recipientek fogékonyságát és a donorok „hajlandóságát” változatos, szinte nem csak faj, de törzs-függő módon befolyásolják az olyan környezeti paraméterek, mint a hőmérséklet, ozmolaritás, egyes ionok, tápanyagok jelenléte vagy hiánya. És nem szabad elfelejteni az egy recipientben már meglévő plazmid-repertoárról sem: azonos inkompatibilitási csoportba tartozó plazmidok felvétele nem, vagy csak sokkal ritkábban történik meg, ilyenkor általában az azonos inkompatibilitási csoportba tartozó plazmid elvesztése mellett.

Végül azt is feltétlenül meg kell említenünk, hogy egy plazmid, akár rezisztencia plazmid stabilitására más, nem antibiotikus szerek által gyakorolt hatása vonatkozásában Molnár József professzor és munkatársai munkássága révén különösen gazdag a hazai irodalom. Úgyhogy összegezve, a plazmid kódolt rezisztencia terjedése, fennmaradása számos, komplex epidemiológiai és biológiai hatás eredménye.

**2. Mi a különbség a "load régió" és a "rezisztencia sziget" között?** A „load régió” (én erre nem ismerek a magyarban már elterjedt kifejezést) egy plazmidnak azt a részét jelenti, ahol újabb inzerciók nagy valószínűséggel létrejönnek. Itt nem feltétlenül rezisztencia gének inszertálódnak, lehet itt csupán egy IS elem, vagy egy toxint és antitoxin kódoló géncsoport. Ezzel szemben a „rezisztencia sziget” az ilyen, esetleg többszörös inzerciók révén kialakult antibiotikum rezisztencia gének csoportja.

**3. Melyek azok az értekezésben feltüntetett és fel nem tüntetett adatok és ismeretek, amelyek alapján az új eredmények 15. pontjában ténylegesen igazolható az "inszerció utáni evolúció" ill. a "független inszerció események" bekövetkezése?** Általánosan elfogadott (és logikus), hogy amennyiben azonos strukturával rendelkező plazmidok egy adott gén egymástól csak egy, vagy csak néhány aminosavban különböző alléljait tartalmazzák, a legvalószínűbb az, hogy ezek egy inszerció eseményt követő, az adott gént érintő mutációk, ha úgy tetszik

evolúciós lépések eredményei. Ez különösen olyan esetekben tételezhető fel, ahol a különböző allélok egymástól eltérő mértékű, a gazda számára fokozott előnyt jelentő aktivitással bírnak (mint pl. a dolgozatban is szereplő NDM-1, -4 és -7 allélok esetén). Az IncX3 plazmidokat nem csak magunk, hanem egyéb irodalmi hivatkozások is olyan platformnak tartják, amin a *bla*<sub>NDM</sub> gének evolúciója zajlik (Wu W, et al. NDM Metallo- $\beta$ -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. Clin Microbiol Rev. 2019;32:e00115-18, Guo X, et al. Global prevalence, characteristics, and future prospects of IncX3 plasmids: A review. Front Microbiol. 2022;13:979558.). Ezzel szemben, ha egy adott gén jelentősen eltérő szerkezetű plazmidokban is fellelhető, az elsősorban egymástól független inszerciós eseményekkel magyarázható (lásd a 4.3.2.2. fejezetet és a 15. és 16. ábrát). Tekintve, hogy mi magunk nem végeztünk olyan kísérletet, mely egy adott allélt tartalmazó plazmidban laboratóriumi körülmények között létrejött evolúciós változásokat követte volna, hanem követtük az irodalomban is elfogadott és hivatkozott nézetet, elismerem, az új eredményeknél a 15. pont alatt az „igazoltuk” helyett jobb lett volna a „mi is valószínűsítettük” kifejezés.

**4. A lipopoliszacharid mag típusának közvetett ill. hipotetikus virulencia szerepet tulajdonít az értekezés.** Az állításnál lényegesen óvatosabban fogalmaztunk, minthogy „hipotetikus virulencia szerepet tulajdonítsunk” a mag típusának. Azt írtuk: „Mindemellett a kérdés, hogy a korábban ritkán előforduló anti-K-12 mag ellenes antitestek hiánya utat nyithatott-e egy ilyen klón terjedésének, a jelen eredményeink alapján csak felvethető, de nem megválaszolható” – tehát itt a hangsúly szándékosan igen erősen egy, a jelen ismeretek birtokában nem eldönthető feltételezésen van. Éppen ezért azt megmondani, hogy – Professzor Úr kérdésének megfelelően – „**mennyire valószínű vagy mennyire valószínűtlen, hogy a genetikai kapcsoltság miatt a magtípusnak nem virulencia, hanem csak indikátor szerepe van?**” kísérletes adatok híján nem lehet. És mivel való genetikai kapcsoltság? A különböző virulencia faktorokkal? Ezek azért még UPEC törzsek esetén is jelentősen eltérnek és ilyen, esetleges kapcsoltságra vonatkozó adatokat, se pro, se kontra nem ismerek. Éppen ezért korlátoztuk a leírást azoknak az adatoknak az ismertetésre melyek, sugallják, de nem bizonyítják (!), hogy a mag típusnak szerepe lehet akár a kórokozó-gazda patológiás elváltozáshoz vezető kölcsönhatásában, akár egy törzs fokozott kolonizációs képességében. Ha létezik ilyen hatás, hogy ez közvetlenül a mag régió, vagy a mag régióhoz kapcsolt külső LPS szerkezetek, vagy az ezek ellen meglévő vagy kialakuló immunválasznak tudható-e be, ebben jelenleg én nem tudok állást foglalni, éppen ezért óvakodtunk minden ilyen jellegű állítástól.

**5. Az új eredmények 20. pontjában „méretében a régióban egyedülálló” tanulmányokat említ. A tanulmány méretének akkorának kell lenni, hogy kellő statisztikai erőt biztosítson. Utólag értékelve milyen tanulmány méretek lehettek szükségesek a jelenségek észleléséhez és ezek hogy viszonyulnak a tényleges méretekhez?** Ami a tanulmányok méretét illeti, azaz hogy megfogalmazásunk szerint „méretében a régióban egyedülálló tanulmányok” – ról van szó, ez ténykérdés. A korábban az Arab-félszigetről megjelent tanulmányok maximum néhány tucat

karbapenem rezisztens törzs tanulmányozásából vontak le következtetéseket (melyek többsége egy, vagy néhány kórházból került izolálásra, ezeket a dolgozatban természetesen idézzük). Ezzel szemben mi az egyik tanulmányban 1192 nem-ismételt, öt ország 33 kórházából származó, a másokban kizárólag az Emirátusokban 15 kórházban izolált 504 törzs vizsgálatával kapcsolatos eredményeinket írtuk le. Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a "méretében a régióban egyedülálló" kifejezés helyénvaló, sőt az eredmények értékelése szempontjából kifejezetten fontos tény. Megjegyzem, ezek a számok karbapenem rezisztens bélbaktériumok tekintetében, még az azóta eltelt időben keletkezett inter-kontinentális vizsgálatokat esetén is jelentősek.

Hogy milyen vizsgálati számok lettek volna elegendőek, azaz, hogy ezek a törzsszámok tekinthetők-e reprezentatívnak, azt az első, nemzetközi tanulmány esetén nem lehet megválaszolni, mivel nem ismerjük a beküldő országok össz bélbaktérium izolátum számát, illetve azon belül a karbapenem rezisztens törzsek arányát. Más szóval azt nem tudjuk, hogy a vizsgált 1192 törzs reprezentatív volt-e az Arab-félsziget CRE törzsei tekintetében és hogy mennyit kellene vizsgálnunk ahhoz, hogy az legyen. De ezzel a vizsgálattal kapcsolatban ezt nem is állítottuk, itt egyszerűen arról volt szó, hogy minél szélesebb körből gyűjtött minél több törzset vizsgálunk (5 ország, 33 kórház, 1192 izolátum), annál realisabb képet kapunk.

A kizárólag Emirátusi törzseket vizsgáló tanulmány esetén ismert volt kórházak által az adott időintervallumban jelentett össz bélbaktérium izolátum szám, és az, hogy ezek közül hány volt karbapenem rezisztens. Mi az adott időszakban előforduló karbapenem rezisztens izolátumok 45,9%-át vizsgáltuk. Nyilvánvalóan a tanulmányozandó populáció nagyságát befolyásolja, hogy milyen az abban vizsgálandó paraméterek gyakorisága, jellege, eloszlása és hogy milyen statisztikai módszert alkalmazunk ezeknek összehasonlítására. Miután nagyon sok paramétert vizsgáltunk és azokat jellegüknél fogva különböző statisztikai módszerekkel hasonlítottuk össze, hogy egyszerűsítsünk a válaszon egy egyszerű minta szám kalkulátort használva (Sample Size Calculator, Calculator.net) megbecsültük, hogy 95% -os konfidencia és 5% hibahatár mellett milyen mintaszámra lenne szükségünk, hogy az az adott időszak helyi CRE törzseit reprezentálja.

Először az ebben az időben izolált bélbaktérium populációban, azaz 16385 nem ismétlődő izolátum esetén az akkor ismert átlag karbapenem rezisztencia %-kal számoltunk (tekintve, hogy ez az egyes fajok között különböző, a súlyozott átlaggal, 6,7%, dolgoztunk). Így azt kaptuk, hogy 96 törzs lenne e populációra nézve reprezentatív. De a létező legrosszabb, szerencsére teljesen irreális esetet is feltételezve, miszerint 50-50% lenne az esélye annak, hogy egy átlagos emirátusi bélbaktérium izolátum karbapenem rezisztens legyen, így is csak 376-es vizsgálandó törzsszámra lenne szükség az általunk ténylegesen tanulmányozott 504 helyett. Ezek alapján úgy véljük, a törzspopuláció 45,9% -át vizsgálva a gyűjtemény joggal tekinthető az adott időszak emirátusi CRE törzsei tekintetében reprezentatívnak.

Ismételten megköszönve Professzor Úr bírálatát és azt, hogy eredményeimet elegendőnek tartja az MTA doktori cím megszerzéséhez, kérem válaszaim elfogadását.

Pécs, 2024. július 12.



Dr. Sonnevend Ágnes