



Opponensi vélemény Dr. Sonnevend Ágnes „Multirezisztens Gram-negatív kórokozók vizsgálata az Arab-félsziget országaiban” című MTA értekezéséről

Dr. Sonnevend Ágnes MTA doktori értekezése az antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztencia kialakulását és elterjedését mutatja be az Arab-félsziget országaiban megfigyelt multirezisztens kórokozók megjelenésének és elterjedésének a tükrében.

Az antibiotikum rezisztencia globális probléma, amely súlyos következményekkel járhat a jövőben. A rezisztencia kialakulása a baktériumok természetes válaszreakciója az antibiotikumokra, és a helytelen, kontrollálatlan antibiotikum használat hozzájárulhat a probléma terjedéséhez. Az Európai Unióban évente 25 ezer ember hal meg multirezisztens baktériumok okozta megbetegedésben, és világszerte évente 700 ezer ember veszíti életét az antimikrobiális rezisztencia miatt. Az antimikrobiális rezisztencia kezelése és nyomon követése kiemelt fontosságú és globális szinten is folyamatos figyelmet igényel.

Az antibiotikum rezisztencia az Arab-félsziget országaiban is egyre súlyosabb méreteket öltött. A rezisztens baktériumok terjedése komoly kihívást jelent a régió egészségügyi rendszerei számára. Az antibiotikumok gyakran nem megfelelő indikációval, nem megfelelő dózisban és időtartamban kerülnek felírásra, ami elősegíti a rezisztencia kialakulását. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai szerint az Arab államokban az antibiotikum-rezisztencia aránya egyes kórokozók esetében eléri az 50-60%-ot. Ez különösen aggasztó a kórházi fertőzések esetében, ahol a rezisztens baktériumok terjedése veszélyezteti a betegellátás biztonságát. A probléma kezelése érdekében a régió országainak sürgősen lépéseket kell tenniük az antibiotikum-használat racionalizálására, a kórházi higiénés szabályok betartására, valamint a rezisztencia monitorozására és jelentésére. Az antibiotikum-rezisztencia az Arab-félszigeten is komoly közegészségügyi fenyegetést jelent, amely csak összehangolt, regionális és globális összefogással kezelhető eredményesen.

Dr. Sonnevend Ágnes MTA doktori munkája elsőként mutatja be és tárja fel a korábban nem ismert antibiotikum-rezisztencia adatokat, rezisztencia mechanizmusokat és kórházi járványok epidemiológiai jellemzőit az Arab-félszigeten.

A 2000-es évek elején a vizsgált régióban, az Arab-félsziget országaiban először a kiterjedt spektrumú béta-laktamáz enzimeket termelő Enterobacterales törzsek jelentették a kihívást, azonban később a karbapenem rezisztens, majd azt követően a kolisztin rezisztens Enterobacterales törzsek és nem fermentáló baktériumok megjelenése tovább nehezítette az antibiotikum rezisztencia terjedése okozta problémát. Fontos megjegyezni, hogy a 2000-es évek elején csak néhány, kis mintaszámot elemző cikk volt elérhető ebben a régióban, ezért részletekbe menő, tipizáló módszerek alkalmazásával végzett vizsgálatok és eredményeink értelmezése a helyi és a nemzetközi klónok viszonylatában is még megoldásra várt.

Dr. Sonnevend Ágnes MTA doktori értekezésében elsősorban a jelenleg világviszonylatban is komoly problémát okozó multirezisztens Gram-negatív baktériumok, a multirezisztens Enterobacterales tagjai (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp.), a multirezisztens nem fermentáló baktériumok (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii*) kórházi előfordulását jellemzi. Mikrobiológiai aspektusból az antibiotikum rezisztencia tekintetében, az értekezés tartalmaz fenotípusos-, és genotípusos interpretálásokat, ugyanakkor a járványügyi szempontokból végzett különböző molekuláris vizsgálatok felhasználásával kitér arra is, melyek a régióban megjelenő béta-laktamázok (pl: ESBL és karbapenemáz gének), valamint mely egyéb antibiotikum rezisztencia gének (pl: aminoglikozid és kolisztin rezisztenciáért felelős gének) vannak jelen a régióban különböző klónokban.

A magyar nyelvű MTA doktori értekezés 10 fejezetből áll az irodalommal és a függelékkel együtt. Jól szerkesztett, olvasmányos, stílusa gördülékeny, terjedelme 178 oldal. A tartalomjegyzék a decimális beosztást követi. Mind a 46 táblázat, mind a 36 ábra jól szerkesztett, könnyen átlátható és értelmezhető. A táblázatok és az ábrák is kiemelkedően szépek, színesek, látványosak és alátámasztják a szövegben leírtakat, megértésüket elősegítik. Egy helyen, a 37. oldal 4. ábrájánál a jelölések pontosítása lenne szükséges: az X tengelyen nemcsak a kéthetes időintervallumokat, hanem legalább évet, hónapokat kellett volna jelölni. Az értekezésben alkalmanként egy-két elütés, betűhiba található, de ezek nem vonnak le a dolgozat értékéből.

A jelölt az olvasmányos Bevezetésben áttekintést ad az Arab-félsziget egészségügyi helyzetéről, a régióban a kórházi tartózkodások átlagos hosszáról, a népesség összetételéről, gazdasági helyzetéről és az antibiotikumok felhasználási szokásairól. Betekintést kapunk a régió kereskedelmének-, és az extrém mértékű turizmusának hatásáról a kórokozókra és az antibiotikum-rezisztencia terjedésére.

A „Célkiűzések” fejezetben négy fő pontban foglalja össze a jelölt doktori értekezése célkitűzéseit, melyek az alábbi témaköröket ölelik fel: multirezisztens, elsősorban ESBL termelő Enterobacterales vizsgálata; kórházi fertőzéseket okozó, nem fermentáló multirezisztens Gram-negatív kórokozók vizsgálata; karbapenem rezisztens Enterobacterales vizsgálata, és a kolisztin rezisztencia vizsgálata.

Az „Anyagok és Módszerek” fejezetben részletesen ismertetésre kerülnek a felhasznált baktérium törzsek, a környezeti mintavétel módja, a különböző antibiotikum érzékenységi vizsgálatok, a külső membrán fehérjék vizsgálata, a baktériumok antibiotikum rezisztenciája. A jelölt bemutatja a virulencia faktorok, és egyéb gének kimutatását molekuláris módszerekkel. A fejezet tartalmazza továbbá a plazmidok izolálásának és jellemzésének, a DNS-DNS hibridizációnak, a teljes genom szekvenálásnak, a Sanger szekvenálásnak és a statisztikai módszereknek a leírását is.

A „Eredmények” fejezet 121 oldal terjedelmű. A fejezet címe lehetne akár Eredmények és megbeszélés, hiszen ebben a fejezetben Dr. Sonnevend Ágnes az előzmények ismertetését követően, az eredmények bemutatása és megvitatása során összefoglalja és áttekinti az adott témakör nemzetközi és helyi jellegzetességeit, így helyezve megfelelő kontextusba a kapott eredményeket és a dolgozat főbb megállapításait.

Az Eredmények fejezet logikusan témánként van felosztva négy részre.

Az első részben a jelölt a multirezisztens és ESBL termelő bélbaktériumokat vizsgálta. A jelölt elsőként mutatta ki az ESBL termelést enteroaggregatív *E. coli* törzsekben és vizsgálta a multirezisztens és ESBL termelő salmonella és shigella törzseket is. Kivizsgálta és jellemezte egy ESBL termelő *K. pneumoniae* által okozott kórházi járványt újszülött intenzív osztályon. Végezetül analizálta az ESBL termelő *E. coli* ST131 globális klón LPS mag (core) régióját azzal a céllal, hogy meghatározza a ST131-es klón globális elterjedésének hátterét.

Az Eredmények fejezet második részében a jelölt a multirezisztens nem fermentáló Gram-negatív baktériumok vizsgálata című fejezetben áttekinti a véráram fertőzést okozó *Stenotrophomonas maltophilia* törzsek molekuláris epidemiológiáját egy hármas progresszivitási szintű kórházban. A jelölt ceftazidim rezisztens *A. baumannii* plazmidon elhelyezkedő blaPER-7 gén ír le, valamint NDM-2 termelő *A. baumannii* törzset az Egyesült Arab Emírségekben. Emellett Dr. Sonnewend Ágnes jellemzi az *A. baumannii* törzsek járványos és sporadikus eloszlását Abu Dhabi Emírátság kórházaiban. Végezetül egy szaúdi kórházban összehasonlítja a klinikai és a környezeti mintából izolált *A. baumannii* izolátumokat járványügyi szempontból.

A harmadik részben, a karbapenem rezisztens bélbaktériumok-, és kolisztin rezisztens bélbaktériumok vizsgálata során a jelölt egyes karbapenemázokat országosan, illetve regionálisan elsőként ír le és jellemez (NDM-1, NDM-7, VIM-4, KPC-2) illetve összehasonlítja a karbapenemázokat kódoló IncX3 plazmidokat. Vizsgálja továbbá a karbapenemáz-, és 16S RNS metiláz aminoglikozid rezisztencia gének gyakoriságát, és a kettős karbapenemázt termelő törzseket.

Az Eredmények fejezet negyedik, egyben utolsó részében a kolisztin rezisztens bélbaktériumokat vizsgálja. Elsőként írja le az *mcr* gén jelenlétét az Arab-félsziget országaiban, meghatározza a CRE törzsek kolisztin rezisztenciáját és annak genetikai hátterét, és jellemzi az első panrezisztens járványt az Egyesült Arab Emírátsókban

beazonosítva egy kolisztin rezisztenciát okozó ritka kromoszómális mutációt. Végezetül a jelölt brojlercsirkék ürülékéből határozza az *mcr* gén előfordulásának gyakoriságát.

Az „Irodalom” fejezet rendkívül nagy számú, összesen 369 közleményt tartalmaz. A közlemények tartalmazzák mind a hazai-, mind a legfrissebb nemzetközi publikációkat.

A következő eredményeket tekintem új eredménynek:

1. Elsőként írta le a jelölt a blaCTX-M-15 gén előfordulását az Arab-félszigeten enteroaggregatív *E. coli*, *Salmonella* spp. és *Shigella* spp. és *K. pneumoniae* ST348 esetében. .
2. Elsőként igazolta, hogy a globálisan elterjedt *E. coli* ST131 törzsek LPS mag szerkezetét kódoló szakasz a korábban klinikai izolátumok között ritka K-12 típusnak felel meg.
3. Elsőként mutatta ki, hogy *A. baumannii*-ban az eredetileg kromoszómális lokalizációban leírt blaPER-7 gén plazmidon is előfordulhat egy komplex, 1. osztályú integronon belül.
4. Elsőként írta le az Emirátusokban, és az elsők között a régióban *A. baumannii* NDM-2 termelését és 3 nagy globális klónnak a helyi kórházak közötti törzs-átvitelét.
5. Elsőként igazolta az Emirátusokban NDM-1, NDM-7, VIM-4 és KPC-2 jelenlétét egyszerre több, különböző fajba tartozó bélbaktérium esetén és jellemezte az azt hordozó IncX3 plazmidokat és a gént keretező szekvenciákat.
6. Elsőként írta le a 16S aminoglikozid metiláz gének kiemelkedően gyakori előfordulását a régióban, azonosítva a leggyakoribb típusokat (*armA*, *rmtC* és *rmtF*).
7. Kimutatta, hogy az MBL termeléstől független a ceftazidim-avibaktám rezisztencia, és a ritka aztreonám-avibaktám rezisztencia elsősorban nem a CRE törzsek között domináló *K. pneumoniae*, hanem az *E. coli* törzsek között fordul elő.
8. Elsőként mutatta ki, hogy az Egyesült Arab Emirátusokban a CRE törzsek epidemiológiáját alapvetően három nagy *K. pneumoniae* klón (ST14, ST231 és ST147) jelenléte határozza meg.
9. Igazolta, hogy Kuvaitban a magas VIM prevalencia oka elsősorban egy, a blaVIM gént hordozó IncA/C típusú plazmid, illetve részben egy, a gént tartalmazó In416 integron faji határokat átlépő terjedése volt.
10. Elsőként írta le az Arab-félsziget országaiban *mcr* gén jelenlétét kolisztin rezisztens törzsekben és jellemezte az azokat hordozó plazmidokat, melyek humán eredetű CRE törzsekben ritkán fordultak elő, ezzel szemben a brojlercsirkékben elterjedtek voltak.
11. Igazolta, hogy a *K. pneumoniae* CRE törzsek magas arányú kolisztin rezisztenciájáért elsősorban néhány kromoszómális gén mutációi a felelősek, illetve *K. pneumoniae* járványt okozó törzsben talált mgrB::blaOXA-181 inzerció kolisztin rezisztenciát okoz.

Megjegyzéseik az értekezéshez:

7. oldal - kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) enzimek - itt érdemes lett volna az angol nyelvű jelentést is kiírni, hogy a rövidítés logikusabb legyen

10. oldal beta-laktám – béta-laktám

20. oldal 7. táblázat 8. sor - zárójel

21. oldal 8. táblázat 3. sor - környezet- környezet

37. oldal 4. ábra - pontosabb jelölések, megnevezések; X tengelyen nemcsak a kéthetes időintervallumokat, hanem legalább évet, hónapokat kellett volna jelölni.

55. oldal - A táblázatban szerepel ugyan, de angolul, hogy az *Acinetobacter* spp. környezeti minták honnan kerültek izolálásra, de szerencsésebb lett volna az ábrán is magyarul szerepeltetni.

Kérdések:

1. A jelölt az értekezésben írja (Anyagok és Módszerek fejezet 16. oldal): „Kétséges kórházi fajmeghatározás esetén azt a 16S riboszomális gén szekvenálásával tisztáztuk.” Mely esetekben volt kétséges a meghatározás?
2. 31. oldalon a 4.1.2.2. fejezetben „Multirezisztens és ESBL termelő salmonella és shigella törzsek vizsgálata (III – V) „Kuvaitban a shigella törzsek 50, míg az Emirátusokban 39%-a volt MDR. Jóllehet az alkalmazott határértékek (MIC \leq 8 mg/L) szerint egyetlen törzs sem volt 3. generációs cefalosporinokkal szemben rezisztens, azok között, melyek \geq 1 mg/L értéket mutattak négy törzs (1, 1,5, 2 és 2 mg/L cefotaxim MIC értékekkel) mutatott fenotípusosan ESBL termelésre utaló mintát. PCR-rel egyikük esetén sem sikerült TEM, SHV vagy CTX-M típusú ESBL gént kimutatni.” Tekintettel arra, hogy más ESBL béta-laktamáz is mutat hasonló fenotípusos képet, más gének jelenlétére nem vizsgálták a törzseket?
3. 31. oldal 4.1.2.2. fejezet „Multirezisztens és ESBL termelő salmonella és shigella törzsek vizsgálata” Tekintettel a megfigyelt ESBL-termeléshez kapcsolódó csökkent ciprofloxacín érzékenységre, illetve rezisztenciára, végeztek-e ennek hátterének tisztázására genetikai vizsgálatokat, pontosabban, hogy kromoszomális mutációk voltak-e jelen, vagy az ESBL plazmidhoz kapcsolt *qnr* gének jelenléte áll-e a háttérben. Ha nem végeztek, vannak-e irodalmi adatok erre vonatkozóan?
4. 43. oldal második sor - „Egy esetleges A osztályú ESBL jelenlétére utaló, az enzim gátolhatóságán alapuló tesztekkel néhány olyan törzs esetén kaptunk pozitív reakciót, melyek az akkori határértékek alapján még 3. generációs cefalosporinokkal szemben egyértelműen érzékenynek minősültek és ezekben a törzsekben nem tudtuk kimutatni a leggyakoribb ESBL gének jelenlétét sem.” Az „A-osztályba tartozó” korábban nem volt definiálva a béta-laktamázok osztályozása. Mit jelent az „A-

osztályba” tartozó, kérem a jelöltet a béta-lakatomázok klasszifikációjának rövid ismertetésére.

5. Számos technika áll rendelkezésre a környezeti mintavétel esetében, miért éppen a nedves törülőkendő mintavétel mellett döntöttek. Ismertesse a jelölt a különböző technikákat és azok előnyeit és hátrányait.
6. Mi volt az oka, hogy a (Anyagok és Módszerek legelején 17. oldal) az eredmények értékelésekor a CLSI klinikai határértékeit vették figyelembe, míg tigecklin esetében az EUCAST útmutatásait követték?
7. A 4.2.2.5. fejezetben mivel magyarázza a jelölt az *Acinetobacter* spp. ilyen mértékű környezeti kontaminációját? Más kórházi fertőzéseket okozó baktérium törzsek esetében ritkán figyelhető meg ilyen mértékű környezeti kontamináció. Továbbá mi lehet az oka annak, hogy éppen a férfi belgyógyászatban volt megfigyelhető a legtöbb pozitív környezeti minta?
8. A 4.3.2.2. fejezetben mi a jelölt véleménye a disszeminációról? Elsősorban a plazmid IncX3, vagy a *K. pneumoniae* ST15 klón a felelős a disszeminációért?
9. Hogyan látja a jelölt a teljes genom szekvenálás szerepét a hatékonyabb járványkezelésben a jövőben pl.: a kolonizált, fertőzött betegek felismerésében, izolálásában, antibiotikum stewardship kialakításában?
10. A jelölt nagyon jól teszi, hogy az EUCAST és CLSI ajánlásokat párhuzamosan figyelembe veszi, hiszen vannak különbségek. Mi a különböző interpretációk oka, háttere a különböző antibiotikumokra vonatkozóan?
11. Mi a jelölt véleménye, miért nem terjedt el nagyobb mértékben az *mcr* gén a karbapenem rezisztens Enterobacterales baktériumok között?
12. Felkérem a jelöltet, ismertesse a jelenleg elérhető terápiás lehetőségeket a kolisztinre is rezisztens multirezisztens törzsek esetében.

Dr. Sonnevend Ágnes MTA doktori disszertációja egy rendkívül igényes munka, eredményei komoly nemzetközi jelentőséggel bírnak, az értekezés nyilvános vitára bocsátását támogatom. A jelölt számára a sikeres védést követően az MTA doktori cím odaítélését messzemenően támogatom.

Budapest, 2024. május 21.

Dr. Szabó Dóra, egyetemi tanár

Semmelweis Egyetem, Orvosi Mikrobiológiai Intézet