

**SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA**

Ph.D. értekezések

3002.

KÁLLAI ANDRÁS

Celluláris és molekuláris élettan
című program

Programvezető: Dr. Hunyady László, egyetemi tanár
Témavezető: Dr. Lőrincz M. Ákos, egyetemi adjunktus

Áramlási citometrián alapuló gyors módszer baktériumok antibiotikum rezisztencia profiljának meghatározására

Doktori értekezés

dr. Kállai András

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: dr. Lőrincz M. Ákos, PhD, egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Ludwig Endre, PhD, professor emeritus
Dr. Tóth József, PhD

Szigorlati bizottság

Elnöke: Dr. Domján Gyula, CSc, professor emeritus

Tagjai: Dr. Zima Endre, PhD, egyetemi tanár

Dr. Kovács Miklós, PhD

Budapest
2024

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítésjegyzék	4
1. Bevezetés	6
1.1. Antimikrobiális rezisztenciáról és antibiotikum érzékenységi vizsgálatokról általában.....	6
1.2. A baktériumok antibiotikum érzékenységének vizsgálati módszerei	10
1.2.1. Dilúciós eljárások	10
1.2.2. Korongdiffúziós és gradiens csík (Eteszt) módszerek.....	11
1.2.3. Fotometriás eljárások.....	12
1.2.4. Színreakcióval járó eljárások: kromogén táptalaj és kolorimetriás teszt rezisztens baktériumok kimutatására	12
1.2.5. Automatizált rezisztencia meghatározó rendszerek	13
1.2.6. Rezisztencia meghatározás molekuláris diagnosztikai módszerekkel	15
1.2.6.1. Polimeráz láncreakció.....	15
1.2.6.2. Teljes genom szekvenálás.....	16
1.2.7. Tömegspektrometriai módszer	17
1.2.8. Összefoglalás az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokról	19
1.3. Korábbi, áramlási citometrián alapuló antibiotikum érzékenységi vizsgálati módszerek.....	20
1.3.1. Az áramlási citométer története és működése	20
1.3.1.1. Az áramlás szabályozása: a hidrodinamikai fókuszálás	21
1.3.1.2. Fényforrások és megvilágítás	22
1.3.1.3. A fényszórás	23
1.3.1.4. Fluoreszcencia detektálása	24
1.3.1.5. Mérési eredmények feldolgozása	24
1.3.2. Baktériumok detektálása áramlási citométer segítségével	25
1.3.3. Az áramlási citométer alkalmazása antibiotikum érzékenységi profil vizsgálatára	26
2. Célkitűzések	32
3. Módszerek	33
3.1. Az áramlási citométer detektálási képességének maximalizálása és a minta fixálása fluoreszcens festék segítségével.....	34
3.2. Az optimális inkubációs idő meghatározása.....	37
3.3. Antibiotikum kiosztás	37

3.4. MIC meghatározáshoz a baktérium populáció számszerűsítése áramlási citométer segítségével.....	39
3.5. Az áramlási citométerrel történő MIC meghatározás empirikus megközelítése	41
3.6. A módszer módosítása és pontosítása <i>Staphylococcus aureus</i> esetén	42
3.7. Statisztikai módszerek	44
4. Eredmények.....	45
4.1. A fixálás és fluoreszcens jelölés hatása a baktériumok osztódási képességére	45
4.2. A baktériumok számának növekedése az inkubációs idő függvényében.....	46
4.3. A mikrodilúcióval és a MICy-vel meghatározott MIC értékek összehasonlítása.....	48
4.4. A két módszerrel kapott érzékenységi profilok összevetése.....	52
5. Megbeszélés.....	55
5.1. Antibiotikum rezisztencia meghatározás áramlási citométerrel	55
5.2. Az áramlási citométer detektálási képességének maximalizálása	57
5.3. Az áramlási citométer felépítése	58
5.4. Megfontolások az optimális inkubációs időt illetően	59
5.5. Megfontolások az alkalmazott antibiotikumok kapcsán.....	60
5.6. A mikrodilúció és MICy módszer összehasonlítása	61
5.7. A vizsgálatunk limitációi	62
5.8. A MICy extra költségei, előnyös tulajdonságai és továbbfejlesztési lehetőségei	62
6. Következtetések.....	64
7. Összefoglalás	65
8. Summary.....	66
9. Irodalomjegyzék	67
10. Publikációk jegyzéke.....	78
11. Köszönetnyilvánítás	80

Rövidítésjegyzék

Rövidítés	Jelentés
AO	acridine orange
AMR	antimikrobiális rezisztencia
AST	antibiotic susceptibility testing (antibiotikum érzékenységi teszt)
ATCC	American Type Culture Collection
ATU	Area of Technical Uncertainty
BMD	broth microdilution method (mikrodilúciós eljárás)
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CE	Conformité européenne (tanúsítvány)
CFU/ml	kolóniaképző egység (colony-forming unit) milliliterenként
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DiBAC ₄ (3)	Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol (fluoreszcens festék)
DNS	deoxiribonukleinsav
EA	essential agreement
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	extended spectrum beta-lactamase (széles spektrumú béta-laktamáz)
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FALS	Forward Angle Light Scattering
FC	flow cytometry (áramlási citometria)
FCM	flow cytometry method (áramlási citométer alapú módszer)
FDA	Food and Drug Administration
FL1	áramlási citométer 1-es fluoreszcens csatorna
FSC	forward scattering / előreirányú szórás (áramlási citometria során az áthaladó részecske méretétől függő paraméter)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
LB	Lisogeny broth vagy Luria-Bertoni táptalaj
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
MBT-ASTRA	MALDI Biotyper-Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay
MBT-RESIST	MALDI Biotyper- Resistance Test with Stable Isotopes Assay
MBT-STAR-BL	MALDI Biotyper-Selective Testing of Antibiotic Resistance-Beta-Lactamase Assay
MDR	multidrog rezisztens
MIC	minimal inhibitory concentration (minimális gátló koncentráció)
MICy	Áramlási citometrián alapuló antibiotikum érzékenység meghatározó eljárás: „MICytometry” rövidítése
MH	Mueller-Hinton táptalaj
MRSA	Methicillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-szenzitív <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
PI	Propidium iodide (fluoreszcens festék)

qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
RNS	ribonukleinsav
mRNS	messenger ribonukleinsav
RT-PCR	reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció
SEM	standard error of the mean (az átlag hibája)
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SSC	side scattering/ oldalra szórás (áramlási citometria során az áthaladó részecske granuláltságtól függő paraméter)
VRE	vancomycin rezisztens <i>Enterococcus faecium</i>
WHO	World Health Organization
XDR	extenzív drog rezisztens

1. Bevezetés

1.1. Antimikrobiális rezisztenciáról és antibiotikum érzékenységi vizsgálatokról általában

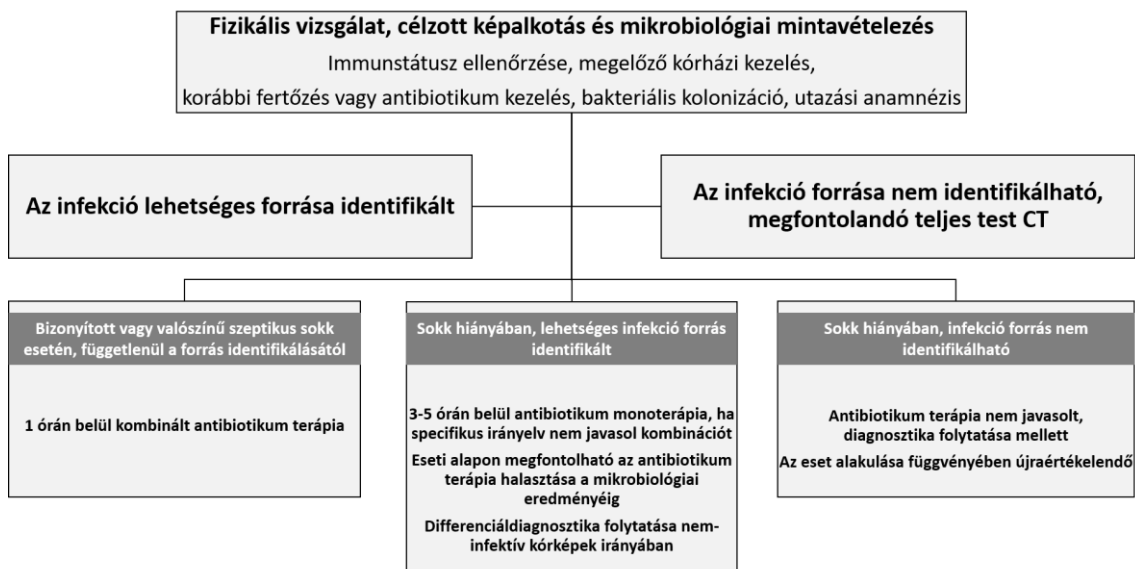
Az elmúlt évtizedekben - az antibiotikumok alkalmazásával párhuzamosan - egyre inkább előtérbe került a baktériumok antibiotikum rezisztenciájának kérdésköre és egyre fenyegetőbb, globális egészségügyi problémává váltak a polirezisztens baktériumtörzsek. A World Health Organization (WHO) megállapítása alapján világszerte veszélyes ütemben nő az antimikrobiális rezisztencia (AMR). Mindez az infekciókhoz köthető mortalitás és morbiditás szignifikáns romlásához vezet.⁽¹⁾

Murray és munkatársai 2019-es adatokat feldolgozva azt találták, hogy világszerte a hat leggyakoribb, rezisztenciát mutató patogén baktérium (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* és *Pseudomonas aeruginosa*) 929 000 fő halálához járult hozzá. Ugyanebben az évben összességében 3,57 millió fő vesztette életét rezisztens baktériumok okozta fertőzés következtében becslésük szerint.⁽²⁾ Az elmúlt években a COVID pandémia és az egészségügyi intézmények következményes túlterhelése szintén hozzájárult a rezisztens baktériumok arányának növekedéséhez. A Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2022-es riportjában megállapította, hogy 2019-hez képest 2020-ban legalább 15%-kal nőtt a rezisztens kórokozók által kiváltott infekciók aránya. Különösen szembetűnő a karbapenem-rezisztens *Acinetobacter* fertőzések esetén mért 78%-os növekedés.⁽³⁾

Miután egy új antibiotikum fejlesztése és piacra kerülése számos nehézségbe ütközik, ezért különösen fontos lenne a meglévő antimikrobiális terápiák hatékonyságának megőrzése.^(4, 5) Ebben kulcsszerepe lehet az antibiotikum stewardship stratégiáknak. E stratégiáknak célja az infektív betegségek kimenetelének javítása és az inadekvát antibiotikum terápia olyan negatív következményeinek elkerülése, mint az AMR és a nozokomiális infekciók kialakulása. Ehhez szükséges a megfelelő klinikai diagnózis, az adekvát gyógyszer- és dózisválasztás, szükség szerint a de-eszkaláció és a terápia megfelelő időtartamának meghatározása.⁽⁶⁾ A kórokozó érzékenységi profiljának megállapítása kiemelten fontos részét képezi a megfelelő diagnózisnak, továbbá

szükséges az antibiotikum terápia adekvátságának bizonyításához is.

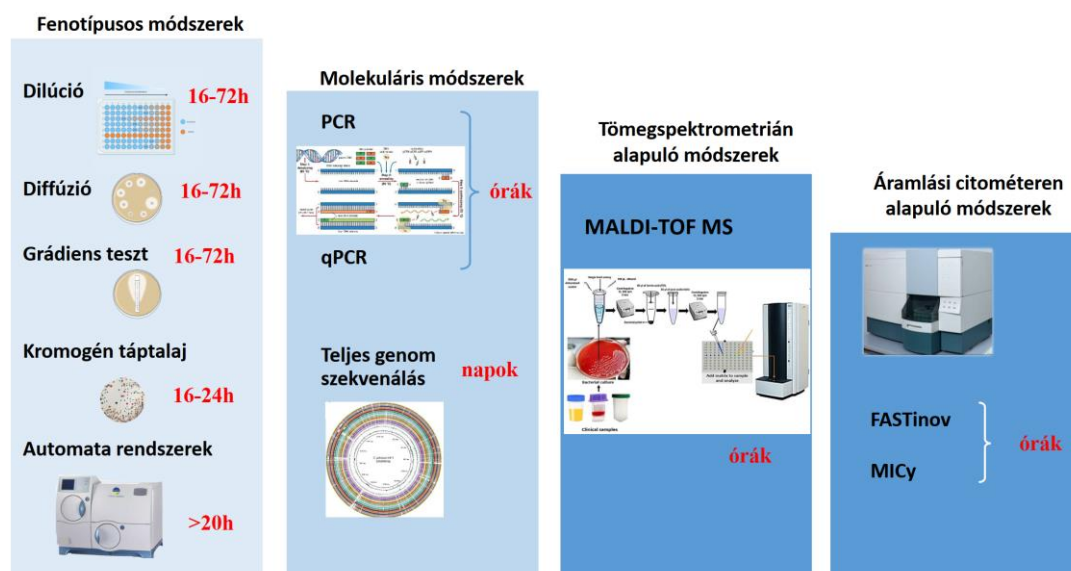
Emellett különösen az intenzív osztályon kezelt, súlyos állapotú betegek esetén életbevágó a mielőbbi mikrobiológiai diagnosztika, beleértve a kórokozó baktérium antibiotikum érzékenységi profiljának ismeretét is. Az antibiotikum terápia megkezdése előtt a klinikai állapot felmérése szükséges, ennek egy lehetséges döntési algoritmusát az 1. ábra foglalja össze. Szeptikus sokk esetén a megkésve kezdett antibiotikum a mortalitás fokozott rizikóját jelenti. A jelen ajánlások, beleértve a Surviving Sepsis Campaign legújabb, 2021. évi verzióját is, szeptikus sokk esetén egy órán belül antibiotikum terápia megkezdését javasolják és ezt nem hátráltathatja a szükséges mikrobiológiai minták levétele sem, még ha ez a fals negatív mikrobiológiai eredmények valószínűségét növeli is.⁽⁷⁾



1. ábra Antibiotikum alkalmazása a klinikai állapot és az infekció forrásának identifikálása függvényében Mokrani, D., J. Chommeloux, M. Pineton de Chambrun, G. Hékimian, and C.-E. Luyt, Antibiotic stewardship in the ICU: time to shift into overdrive című cikk ábrája alapján (6)

A fertőzés gyanított vagy igazolt forrása alapján levett mikrobiológiai minták lehetővé teszik a kórokozó identifikálását és ezt követően az antibiotikum érzékenységi profil megállapítását. Mindez azonban időigényes folyamat, ezért intenzív kutatások tárgyát képezik a gyors, megbízható, effektív és költséghatékony antibiotikum érzékenységi tesztek (antibiotic susceptibility test – AST) lehetőségei, melyeket a 2. ábra foglal össze. Egy adott baktérium antibiotikum rezisztencia profiljának meghatározásához a

jellemzően egy napot felölelő identifikáció után további egy-két napra van szükség a jelenlegi klinikai gyakorlatban. Az időigényt a fenotípusos vizsgálatoknál döntően a baktériumok osztódási sebessége és az adott mikrobiológiai módszer detektálási képessége határozza meg.

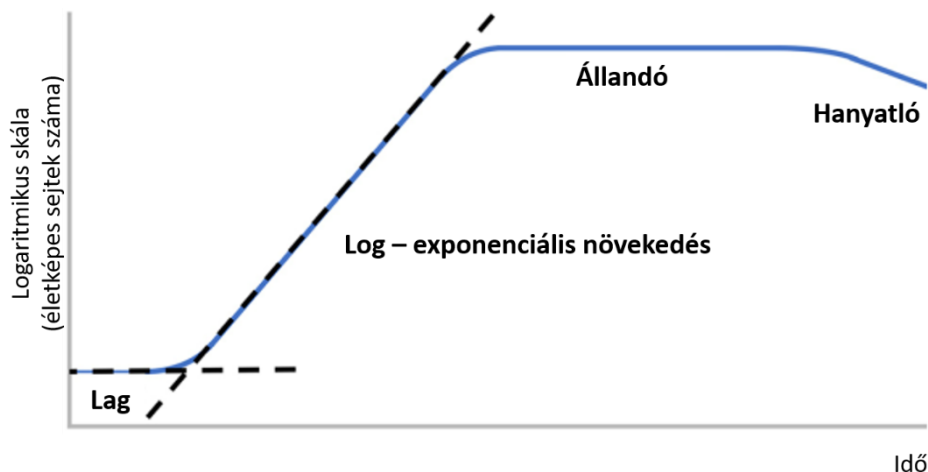


2. ábra Mikrobiológiai módszerek antibiotikum rezisztencia meghatározására és időigényük

Az Encyclopedia Britannica *polymerase chain reaction* és a <https://www.bdbiosciences.com> weboldalak, illetve Elbehiry, A. et al *How MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology Contributes to Microbial Infection Control in Healthcare Settings*, Gajic, I., J. et al. *Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods* és Salipante, S.J. et al. *Whole genome sequencing indicates *Corynebacterium jeikeium* comprises 4 separate genomospecies and identifies a dominant genomospecies among clinical isolates* című cikkek alapján készült ábra ⁽⁸⁻¹¹⁾

A baktériumok osztódási sebességét egy adott táptalajon a 3. ábra mutatja be. Ennek első fázisa a „lag” fázis, mely során a baktérium az adott tápanyag mennyisége és minősége függvényében felkészül az osztódásra, majd a log fázis alatt a baktériumok száma exponenciális növekedést mutat. Minél érzékenyebb módszer áll rendelkezésünkre a baktériumok számának változását tekintve, időben annál korábban tudjuk észlelni a baktériumok osztódását és ezt ki tudjuk használni fenotípusos érzékenységi profil vizsgálatára is. Természetesen az egyes baktériumoknak eltérő idő szükséges az osztódáshoz, mely időt nemcsak a baktérium fajtája, de azon belül a részben eltérő génállomány, mint például további, akár plazmidon kódolt rezisztencia gének jelenléte is befolyásolhat. Jelen pillanatban nem áll rendelkezésünkre részletes adatbázis arra

vonatkozóan, hogy az egyes baktériumok, különösen szelektálódó rezisztencia viszonyok mellett, milyen lag fázissal és osztódási képességgel bírnak. Arra már van evidencia, hogy *de novo* konjugált plazmid átmenetileg nyújtja a lag fázist, ennek klinikai vagy diagnosztikai jelentősége azonban még kérdéses. ⁽¹²⁾



3. ábra **Baktériumok növekedési fázisai táptalajon.** **Lag-fázis:** a baktérium felkészülési ideje az osztódás megkezdésére. **Log-fázis:** exponenciális növekedési szakasz, melyben a rendelkezésre álló tápanyagoknak köszönhetően folyamatosan osztódnak a baktériumok. **Állandó (stacioner) fázis:** megközelítőleg egyensúlyt tart az osztódás és sejthalál. **Hanyatló szakasz:** a fogyatkozó tápanyag mennyiség magával hozza a baktériumok számának csökkenését.

Bertrand, R.L. and W. Margolin, Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division című cikk ábrája alapján, engedéllyel módosítva. ⁽¹³⁾

A 3. ábra ennek megfelelően egy elméleti megközelítést és nem egy konkrét baktérium növekedési fázisait mutatja be. Ahogy azt a 1.3.2. fejezetben látni fogjuk egy konkrét példán, mind a lag, mind a log fázis hossza, illetve meredeksége erősen tápanyag, azaz környezet függő, így a fent említett részletes adatbázis elméletileg is nehezen képzelhető el. Szerencsére látni fogjuk, hogy az új és érzékeny módszerünk valószínűleg fejleszthető odáig, hogy ne is feltétlenül igényelje előre az adott baktérium osztódási képességének és az ehhez szükséges időnek a pontos ismeretét.

A továbbiakban előbb ismertetem a jelenleg AST céljára bevett mikrobiológiai módszereket, majd az áramlási citométer működési elvén túl a korábban AST céljából alkalmazott, de a mindennapi gyakorlatban meg nem jelenő, áramlási citométer alapú módszereket mutatom be. Végül az értekezés második felében a munkacsoportunk által fejlesztett új metodikát ismertetem.

1.2. A baktériumok antibiotikum érzékenységének vizsgálati módszerei

Az elmúlt évtizedekben számos módszert dolgoztak ki a baktériumok antibiotikum érzékenységének vizsgálatára. A következőkben eme módszerek rövid bemutatására kerül sor, kiemelve előnyeiket és hátrányaikat is. A már bevett klasszikus és újabb módszerek mellett külön fejezetben kerülnek bemutatásra az áramlási citométer alapú AST eddigi gyakorlati megvalósítási lehetőségei.

1.2.1. *Dilúciós eljárások*

A dilúciós eljárások között tartjuk számon az agar hígítósos és csősorozat hígítósos módszereket. Az agar hígítósos eljárás során az adott antibiotikum különböző koncentrációi felező hígításban az agar táptalajba keverve, míg a csősorozat eljárás során folyékony táptalajhoz adva kerülnek felhasználásra. A csősorozat eljárások között megkülönböztetünk makro- és mikrodilúciót.

Makrodilúció esetén az antibiotikumok felező hígítása minimum 1 ml tápoldatban, külön csövekben kerül inkubációra, miután a csöveket beoltottuk az izolált és identifikált baktérium standardizált szuszpenziójának előírás szerint csíraszámával ($1-5 \cdot 10^5$ CFU/ml)⁽¹⁴⁾. Az inkubáció 16-72 órája után vizuális megtekintéssel történik az értékelés. A többszörös osztódáson átesett, növekvő számú baktérium az oldat optikai denzitását növeli, egyre „zavarosabbá” teszi. Amennyiben nem látunk zavarosodást, feltételezhetjük, hogy az adott antibiotikum koncentráció gátolta a baktériumok osztódását. A módszer alkalmas a minimális gátló koncentráció (Minimal Inhibitory Concentration – MIC) meghatározására, mely az a legkisebb antibiotikum koncentráció, mely gátolni képes a baktériumok osztódását, vagyis a hígítási sorunkban az első cső, melynél optikai denzitás növekedés, zavarosodás nem észlelhető.

Nagy előnye a hígítósos módszernek, hogy kvantitatív eredményt ad MIC értékével, hátránya a makrodilúciónak, hogy a csősorozat előkészítése jelentős munkaterhelést és számos hibázási lehetőséget jelent, miközben jelentős mennyiségű anyagfelhasználás és hulladéktermelés is történik.

A makrodilúció egyes hátrányait kűszöböli ki a mikrodilúciós eljárás (broth microdilution method – BMD), melynek során nem külön álló csövekben, hanem 96 lyukú microplate lemezekon történik a felező hígítást tartalmazó táptalajok beoltása. A lemez

kialakításának megfelelően akár 12-féle antibiotikum nyolcszoros felező hígításban vizsgálható párhuzamosan 0,1 ml tápoldatban. A lemezek 16-24 órás inkubációját követően értékelésük továbbra is vizuálisan történik. Az eljáráshoz előregyártott, fagyasztott mikrodilúciós panelek állnak rendelkezésre kereskedelmi forgalomban, mely lehetővé teszi a munkafolyamat jelentős leegyszerűsítését. Mindennek megfelelően a kvantitatív eredményt, azaz MIC értéket adó mikrodilúciós eljárás jelenleg az AST módszerek gold standardje. ⁽¹⁰⁾

Az eljárást részletesen ismerteti és szabályozza European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) által kiadott eljárásrend. ⁽¹⁵⁾

1.2.2. Korongdiffúziós és grádiens csík (Eteszt) módszerek

Az egyszerűségéből adódóan az AST vizsgálatának egyik leggyakrabban alkalmazott módszere. A táptalajon szélesztik a megfelelő csíraszámú baktériumszuspenziót, majd a beoltott táptalajra helyezik a vizsgálni kívánt antibiotikumokkal átitatott papírkorongokat. Inkubációs időt követően meghatározásra kerül a korongok körüli gátlási zónák mérete, melyből szemikvantitatív módon következtethetünk az adott baktérium antibiotikum érzékenységi profiljára, de konkrét MIC értéket nem tudunk meghatározni. Eredményként érzékeny/fokozott expozíció mellett érzékeny/rezisztens kategóriák szerinti meghatározást kaphatunk. ^(10, 16)

A grádiens csík (Eteszt) módszer a korongdiffúziós módszer és az agar dilúciós eljárás kombinációja, ebben az esetben a beoltott táptalajra helyezett papír vagy műanyag teszt csík csökkenő, folyamatos grádiens képző koncentrációban tartalmazza az adott antibiotikumot. A változó koncentráció-grádiensnek megfelelően diffundál az antibiotikum a szilárd táptalajba, így a koncentráció-grádiens mentén változó gátolt zóna jelenik meg. A módszer egyes antibiotikumok esetében, mint például colistin vagy tigecycline, ellentmondásos eredményekhez vezetett. Ennek hátterében leginkább olyan, agar-specifikus faktorok hatását találták, mint a kétértékű kationok koncentrációja, mely befolyásolja például a colistin diffúzióját. ^(10, 17)

Mindkét módszer előnye az egyszerűségük, de hátrányuk, hogy értékelésük szintén megtekintéssel történik, az inkubációs időnek ennek megfelelő hosszúságúnak kell lennie, illetve, hogy csak szemikvantitatív eredményt adnak, pontos MIC érték nem határozható meg segítségükkel. Ebből adódóan rutinszerű alkalmazásuk mellett, amennyiben a

klínikum pontos MIC érték meghatározását kívánná meg, időigényes kiegészítő vizsgálatot szükséges indítani. Ennek megfelelően, bár számos cég gyárt grádiens csík tesztet, mégis a gold standard módszer változatlanul a BMD maradt. ⁽¹⁰⁾

1.2.3. Fotometriás eljárások

A fotometriás eljárások alapja a mikrodilúciós technika, de a lemezek kiértékelése nem szabad szemmel történik, hanem optikai denzitás alapján. A fotométer segítségével az optikai denzitás változása korábban észlelhető, bár ez a klinikai gyakorlaton nem sokat javít, mert a baktériumok osztódási sebességétől függően jellemzően 12-24 órás inkubációra van szükség. A mikrobiológiai laborok működését, az European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) adatbázissal való összevetés és a validálás igényét is figyelembe véve, az eredmény ennek megfelelően a következő munkanapra várható. Előnye mindemellett, hogy relatíve alacsony költségigény mellett a mérési eredmények kvantifikálhatóak. ⁽¹⁸⁾

1.2.4. Színreakcióval járó eljárások: kromogén táptalaj és kolorimetriás teszt rezisztens baktériumok kimutatására

A rezisztens baktériumok gyors szűrése kritikus jelentőségű a betegek izolációja szempontjából, mellyel megelőzhető lehet a kórházi járványok kialakulása. ⁽¹⁹⁾ Ennek megfelelően az elmúlt években a polirezisztencia kimutatására megbízható és gyors módszereket fejlesztettek ki, mint a kromogén táptalaj vagy kolorimetrián alapuló eljárások.

A kromogén táptalajok 1993-ban történt bevezetése óta számos, klinikailag releváns baktérium kimutatására fejlesztettek specifikus tesztet, beleértve egyes rezisztencia típusokat is, mint például 2000 óta az methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) vagy 2007 óta extended spectrum beta-lactamase (ESBL) Enterobacteriaceae. Az egyes baktériumokra specifikus enzimeknek a szubsztrátjaihoz kötött kromogén felszabadulása jellegzetes színreakciót eredményez és ennek megfelelően a kimutatni kívánt baktérium típusos, színes telepet képez. A kromogén táptalaj használata jellemzően költségkímélő és gyorsabb megoldás, mint a konvencionális tesztek. Elsődlegesen a betegeket kolonizáló patogének kimutatására és ezáltal kórházi szűrőtenyésztéseként alkalmazhatóak. A specificitása és szenzitivitása az egyes teszteknek különböző, így

egyes esetekben további megerősítő vizsgálatok szükségesek lehetnek. ^(10, 20)

A kolorimetrián alapuló eljárás is egy fenotípusos módszer, mely az élő baktérium környezetében enzimatis folyamatok eredményeként megváltozott pH érték hatására indikátor, mint például fenolvörös színváltozását mutatja ki. Az identifikált baktériumot a kérdéses antibiotikummal pár órán keresztül inkubálva a rezisztencia kvalitatív eredményét kaphatjuk meg. Előnye a gyorsasága, hátránya, hogy kvantitatív eredményre nem alkalmas.

1.2.5. Automatizált rezisztencia meghatározó rendszerek

Az AMR meghatározása iránti növekvő igény magával hozta automata rendszerek megalkotásának igényét, annak érdekében, hogy minimális emberi beavatkozással nagy mennyiségű minta gyors, párhuzamos feldolgozása valósulhasson meg. A zsinórmértékül szolgáló amerikai Food and Drug Administration (FDA) engedéllyel bíró legfontosabb automatizált rendszerek a MicroScan WalkAway™ (gyártó: Beckman Coulter, Inc. Atlanta, Georgia, USA – FDA engedély éve: 1980), a Micronaut™ (Merlin, Berlin, Németország - 1990), az Advantage™ (Abbott Laboratories, Irving, Texas, USA - 1980), a Vitek 2™ (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Franciaország - 1997), a Phoenix™ (BD Diagnostics, Franklin Lakes, New Jersey, USA - 2001), és a Sensititre ARIS 2X™ (Trek Diagnostic Systems, Oakwood Village, Ohio, USA - 2004). ⁽²¹⁾

Az automatizált módszerek lényege, hogy regulárisan vizsgálják a mintát és detektálják valamilyen módon a baktériumok osztódásának valamely fizikai következményét. A detektáláshoz fotometriát, fluorometriát, turbidimetriát vagy kolorimetriát alkalmaznak. Fluorometria esetén baktériumokat fluoreszcenciára alkalmas szubsztrátot tartalmazó táptalajra oltják, mely szubsztrát bizonyos, gerjesztésre alkalmas fény hatására a bejövőtől eltérő, jellemzően alacsonyabb hullámhosszú fényt bocsát ki, mely detektálható. ⁽²²⁾ Turbidimetria esetén a zavarosságot mérjük és számszerűsítjük, ennek során a fotometriától eltérően nem csak a fény elnyelése befolyásolja a detektálást, hanem a szolid részecskék okozta szórás is. Hasonlóan fontos faktor lehet, hogy összességében a minta mekkora részét éri a beeső fény, hiszen a minták várhatólag inhomogenitást mutatnak, ebből adódóan alacsony partikulum szám esetén a mérésünk bizonytalanra válhat. Emellett a detektálást befolyásolja a szolid részecskék általi fényszórás miatt a minta-detektor távolság is, távoli elhelyezkedés esetén az oldalra szórt fény egy része „elveszhet”. ⁽²³⁾

A Microscan Walkaway™ rendszer képes párhuzamosan 40-96 mikrodilúciós lemezt inkubálni és értékelni. A detektálás során fotometriával vagy fluorometriával határozzák meg a baktériumok osztódását. A Gram pozitív és negatív baktériumok számára különböző előregyártott panelek érhetőek el, melyeket hidrálás és beoltást követően a gép rendszeres időközönként megvizsgál. A Gram negatív baktérium számára gyártott, fluorogén szubsztrátot tartalmazó panelek alkalmazásakor már akár 3,5-7 órával az inkubálás megkezdése után eredményt kaphatunk. Turbidimetrián alapuló értékelés esetén 4,5-18 órás inkubálást követően várható érzékenységi profil meghatározás. ⁽¹⁸⁾

A Phoenix™ rendszer 99 párhuzamos minta vizsgálatára képes. 20 percenként történik analízis turbidimetriával és oxidáció-redukció érzékelésére képes indikátor segítségével kolorimetriával. Gram-negatív, Gram-pozitív, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), illetve beta-hemolizáló és viridans csoportú streptococcusok vizsgálatára érhetőek panelek. A rendszer 6-16 óra után ad MIC eredményt. ⁽¹⁸⁾

A Vitek 2™ rendszer egy bankkártya méretű, 64 lyukú kártyát használ gyorsan növő Gram pozitív és negatív baktériumok, illetve *S. pneumoniae* vizsgálatára. MIC eredményt 4-10 óra után ad reguláris, turbidimetriával történő detektálást követően.

Az automatizált rendszerek előnye a nagy kapacitás és a relatív gyors eredmény. Jelentős hátrányuk azonban, hogy a tradicionális módszerekkel összevetve reprodukálhatóság, szenzitivitás és megbízhatóság tekintetében rosszabbul teljesítenek. ⁽²¹⁾ Erre a problémára többek között egy 2018-ban megjelent kínai tanulmány is felhívta a figyelmet, melynek során 851 kórházban 5 automatizált rendszer eredményeit hasonlították össze. A legtöbb kórházban a Vitek 2™ rendszert használták (392 kórház – 46,1%), majd sorban a Phoenix™ (146 – 17,2%), a Microscan Walkaway™ (133 – 15,6%), a Mindray TianDiRen™ (130 – 15,3%) és Zhuhai DL™ (50 – 5,9%) rendszerek következtek. A vizsgálatban az automata rendszerek eredményeit a gold standard BMD-vel vetették össze egy ESBL *E. coli* és egy karbapenem-rezisztens *Klebsiella* törzs vizsgálata során. A konklúziójuk szerint az egyes tesztelt módszerek lényegesen különböző eredményeket adtak függően az egyes antibiotikumoktól, az alkalmazott lemezekről és a gépeken aktuálisan futó szoftverektől. Megállapításuk szerint minden automatizált rendszer mellett szükséges lehet BMD alkalmazása problémás esetekben. ⁽²⁴⁾

1.2.6. Rezisztencia meghatározás molekuláris diagnosztikai módszerekkel

A molekuláris antibiotikum rezisztencia meghatározással képesek vagyunk specifikus rezisztencia géneket detektálni, mind a mutáció alapú változásokat, mind pedig az adott gén expresszióján alapuló rezisztencia mechanizmusokat. Mára ezek a molekuláris módszerek pár órán belül eredményt adva alternatívát, vagy legalábbis kiegészítő vizsgáló eljárást jelentenek a hagyományos AST mellett. A molekuláris technikák három csoportba sorolhatók: amplifikáció alapúak, hibridizációt alkalmazó DNS-csipek és a teljes genom szekvenáló eljárások.

1.2.6.1. Polimeráz láncreakció

A leggyakrabban használt molekuláris diagnosztikai eljárás az amplifikáció alapú polimeráz láncreakció (PCR) specifikus génszakasz meghatározására, mely eredményezheti a kórokozó identifikációját és ismert rezisztencia gén kimutatását is. Figyelembe véve, hogy a PCR technika során a DNS duplázódása kb. 40-szer gyorsabb, mint a baktériumok átlagos osztódása, így alkalmazásával jelentősen gyorsíthatjuk a diagnosztikai folyamatot.⁽²⁵⁾

A polimeráz láncreakciót először Saiki és munkatársai írták le 1985-ben sarlósejtes anémia diagnosztikájában.⁽²⁶⁾ A technika alapja, hogy a kettős szálú DNS melegítés hatására az úgynevezett olvadási hőmérsékleten szétválik, ezt követően egy-egy rövid DNS szakasz, a primerek kijelölik a másolandó szakasz elejét és végét. Majd a DNS-polimeráz lemásolja a sokszorosítandó szakaszt. A ciklus ismétlésével a cél DNS-szakasz minden alkalommal duplázódik. Az eredeti közleményben használt technika során az elegyhez minden egyes melegítési ciklus után ismét hozzá kellett adni a DNS-polimerázt annak denaturációja kapcsán. 1988-ban Saiki és munkatársai publikálták a hőforrásokban élő *Thermus aquaticus* extremofil baktériumból izolált, hőstabil DNS-polimeráz alkalmazásával módosított technikát, mely nagyban egyszerűsítette a folyamatot.⁽²⁷⁾ A kvantitatív PCR (qPCR) lehetőséget teremt arra, hogy a DNS sokszorosítást mennyiségi meghatározással tudjuk végezni, így a kiinduló DNS mennyisége és ezáltal a kórokozók kópiaszáma is meghatározható. Ennek során egy harmadik oligonukleotidot is alkalmaznak, mely a két primer közötti szakaszra köt be. Amennyiben a DNS-polimeráz ezen a szakaszon áthalad, akkor az ide bekötött oligonukleotid elbomlik, ezáltal az oligonukleotid két végére kapcsolt két fluoreszcens csoport, a riporter és a kioltó (quencher) távol kerül egymástól. Amíg egymáshoz közel helyezkednek el, addig

a kioltó megakadályozza a riporter emisszióját, távol kerülve azonban az emisszió megjelenésével képesek vagyunk detektálni az újonnan szintetizálódó DNS mennyiségét, az ugyanis egyenesen arányos lesz fluoreszcens jel erősségével. A technikát gyakran real-time PCR néven találjuk, ennek rövidítése azonban összekeverhető a következőkben tárgyalt reverz transzkriptáz PCR technikával. Ezért a 2009-ben publikált Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments ajánlás csak az utóbbira javasolja az RT-PCR rövidítést alkalmazni.⁽²⁸⁾

A reverz transzkriptáz PCR (RT-PCR) technika során mRNS visszafejtését követően alkalmazzák a DNS amplifikációját. Első alkalmazására 1989-ben került sor.⁽²⁹⁾ Kombinálható kvantitatív PCR technikával (RT-qPCR), így meghatározható a kiinduló mRNS mennyisége.

A mikrobiológiában lehetőségünk van multiplex PCR vizsgálattal párhuzamosan több kórokozót és rezisztencia gént is kimutatni.

A PCR technika előnye, hogy a hagyományos technikáknál gyorsabban ad igen specifikus eredményt, amihez azonban ismernünk kell egy adott fajra vagy rezisztencia génre jellemző DNS vagy mRNS szakaszt. Hátránya, a magas költségigénye, különösen, ha szűrőként multiplex PCR-t alkalmazunk. Emellett a detektált genotípus nem feltétlen egyezik meg a kórokozó fenotípusával, hiszen egy rezisztencia gén kimutatása nem jelenti azt, hogy az valóban a kórokozóhoz tartozik és expresszálódik is. A kulcsgének mutációja esetén kimutatásuk elmaradhat. A minta kontaminációja szintén fals pozitív eredményhez vezethet. Nem ismert rezisztencia mechanizmusok figyelmen kívül hagyásával pedig téves rezisztencia-profilhoz juthatunk. Mindezek alapján a módszer önmagában nem, csak fenotípusos rezisztencia vizsgálattal együtt alkalmazható a mindennapi klinikumban. Megoldás lehetne a RT-qPCR alkalmazása, mely nem egy gén kimutatását teszi lehetővé, hanem annak eredményeként megjelenő fehérje szintéziséhez vezető mRNS kvantitatív kimutatását, ami akár rezisztencia génről transzkriptált mRNS is lehet. Természetesen ez a módszer is csak akkor működhet, ha pontosan ismerjük a keresett szekvenciát és indukálható gének esetén szükséges az adott antibiotikum jelenléte is.⁽²¹⁾

1.2.6.2. Teljes genom szekvenálás

A teljes genom szekvenálás forradalmasította a molekuláris diagnosztikát és mára egy gyors és megfizethető módszer lett. Egy adott kórokozó teljes genomjának szekvenálása

megteremti annak a lehetőségét, hogy az összes, antibiotikum rezisztenciában szerepet játszó gént detektálhassuk. Ezek azonosításához a genom szekvenálása mellett szükség van online, szabadon hozzáférhető adatbázisokra, melyekből napjainkig legalább 47 adatbázis áll rendelkezésre.⁽³⁰⁾ Kutatás igazolta már teljes genom szekvenálásával nyert adatok korrelációját a fenotípusos rezisztenciával, például multidrog és extenzív drog rezisztens (MDR és XDR) tuberkulózis esetén.⁽³¹⁾

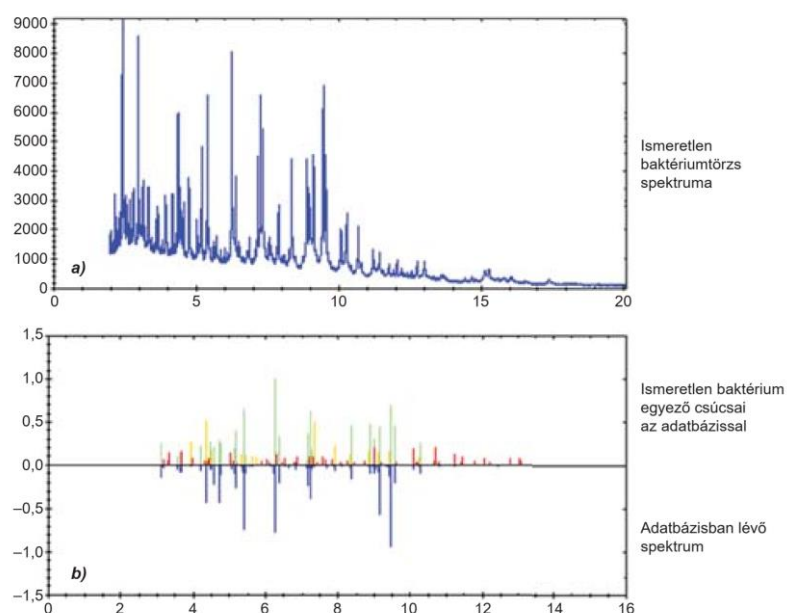
Az előnyök ellenére a teljes genom szekvenálás nem vált még a klinikai gyakorlat részévé. Ennek oka egyrészt a szekvenálás átfutási ideje, ami még napokban mérhető, másrészt a számos nem ismert rezisztencia mechanizmus létezése, harmadrészt a költségei is lényegesen magasabbak a tradicionális eljárásoknál.⁽¹⁰⁾

1.2.7. Tömegspektrometriai módszer

A mátrix asszisztált lézer deszorpciós ionizáció egy tömegspektrometriai elven működő eljárás (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry - MALDI-TOF MS). A vizsgálni kívánt mintát egy mátrixba ágyazzuk, majd lézer fénnnyel gerjesztve a mátrixot, a minta ionizálódik és gázfázisba jut. A gázfázisba jutott ionok elektromos térben felgyorsulnak, majd a detektort tömegüknek és töltésüknek megfelelő sebességgel érik el. Mindeközben a „repülési idő” (Time of Flight – TOF) mérhető és ez alapján az adott minta fehérjeprofil spektruma ujjlenyomat-szerűen elemezhető.⁽³²⁾ A kapott tömegspektrometriai képet a gép összeveti a referencia adatbázisában tárolt 6900 fajra jellemző képpel és ez alapján pontos patogén identifikációt tesz lehetővé.

Bizonyos fajokon belül a klasszikus módon meghatározott rezisztenciákhoz rendelve, meghatározásra kerültek úgynevezett „resistance peak pattern” mintázatok is, melyek észlelése igazolhat rezisztenciát is. Ilyen módon elkülöníthető a methicillin-rezisztens és -szenzitív *Staphylococcus aureus* (MRSA és MSSA), a vancomycin rezisztens *Enterococcus faecium* (VRE), megváltozott porin csatornájú Klebsiella törzsek és a karbapenem rezisztens *Bacteroides fragilis*.⁽³³⁾

A MALDI-TOF MS által meghatározott spektrumot és ennek a tárolt adatbázissal történő összevetésére egy példát a 4. ábra mutat be.



4. ábra MALDI-TOF MS által meghatározott spektrum (a) ábra) és ennek összevetése az adatbázisban tárolt spektrummal (b) ábra)

Nagy E, Ábrók M, Bartha N, Bereczki L, Juhász E, Kardos G, Kristóf K, Miszti C, Urbán E: *Mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria speciális alkalmazása a klinikai mikrobiológiai diagnosztika területén* című cikkéből változtatás nélkül átvett ábra⁽³⁴⁾

Lehetőségünk van enzimátikus rezisztencia kimutatására is. A mintához adott antibiotikum mennyisége, amennyiben enzimátikus bontásnak kitett, csökken és ez kimutatható MALDI-TOF segítségével. Ilyen enzimátikus bontás érinthet béta-laktám (MALDI Biotyper-Selective Testing of Antibiotic Resistance Beta-Lactamase Assay – MBT-STAR-BL Assay) és aminoglikozid antibiotikumokat is.^(33, 35)

A rezisztencia a baktériumok életképességével is meghatározható. Adott antibiotikum koncentráció mellett, bizonyos inkubációs idő után a baktériumok lízise utáni protein mennyiség meghatározásával is felállítható rezisztencia profil: MALDI Biotyper – Antibiotic Susceptibility Test Rapid Assay (MBT-ASTRA). Emellett stabil, nem-radioaktív izotóppal jelölt aminosavakkal dúsított táptalajon, adott antibiotikum meghatározott koncentrációjával együtt inkubált baktérium vizsgálatánál az izotópot felvett fehérjék mennyisége, mely meghatározható MALDI-val, arányos az életképes baktériumok osztódásával. Ezen a módszeren alapul a MALDI Biotyper - Resistance Test with Stable Isotope Assay (MBT-RESIST).⁽³³⁾

A MALDI-TOF technológia tehát a BMD-hez hasonlóan fenotípusos meghatározást is lehetővé tesz, az alkalmazott technológiától függően 30 perc – néhány óra időtartamú

vizsgálatot követően. Hátránya azonban a gyenge áteresztőképessége, magas költség- és szakember igénye, mely hátrányok megmagyarázzák, miért nem tudott általános áttörést elérni az AST módszereken belül.

1.2.8. Összefoglalás az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokról

Az ideális antibiotikum érzékenységi teszt megbízható, gyors, olcsó, automatizálható, magas áteresztőképességgel bír és egyszerű adatkezelése biztosított.^(5, 36) Sajnálatos módon ilyen ideális teszt egyelőre nem áll rendelkezésünkre. Ahogy a fentiekben részletesen bemutattam, a jelenleg alkalmazott módszerek a kritériumokat nem tudják maradéktalanul teljesíteni.

Bár a genotípusos módszerek töretlen fejlődése ígéretes, azonban a rezisztencia mechanizmusok sokfélesége és a tudásunk hiányosságai kapcsán a mai klinikai gyakorlatnak mindenképp szükséges a gyors, fenotípusos eredmény. A mikrobiológiai gyakorlat pedig mind a mai napig diffúziós technikákat vagy konkrét MIC érték szükségessége esetén mikrodilúciós tesztet alkalmaz. Ehhez számos osztódási ciklus eredményeként, hosszú ideig tartó folyamatot követően megjelenő zavarosodás vagy telepképződés szemmel történő értékelése szükséges.

A táptalajban lag fázisból log fázisba váltó baktériumok számának változása érzékenyebb módszerrel lényegesen korábban detektálható. Ilyen érzékeny módszer lehet az áramlási citométer, melynek segítségével másodpercenként akár százezer sejtet is vizsgálhatunk. Segítségével nem csak számszerűsíthetjük az áthaladó partikulumokat, de sejtleletani folyamatok vizsgálatára is lehetőséget ad a módszer különböző fluoreszcens festékek alkalmazásával. Mindemellett fontos figyelembe vennünk, hogy a jelenleg forgalomban lévő citométereket eukarióta sejtek vizsgálatára optimalizálták, így kérdésként fel kell, hogy merüljön, hogy az egy nagyságrenddel kisebb, 0,5-5 µm mérettartományban mozgó baktériumok vizsgálata megoldható-e az elérhető citométerek segítségével.

A következő fejezetben az áramlási citométer működésének bemutatása mellett a baktériumok detektálásának és antibiotikum érzékenységének eddigi, áramlási citométer alapú eljárásait is sorra veszem.

1.3. Korábbi, áramlási citometrián alapuló antibiotikum érzékenységi vizsgálati módszerek

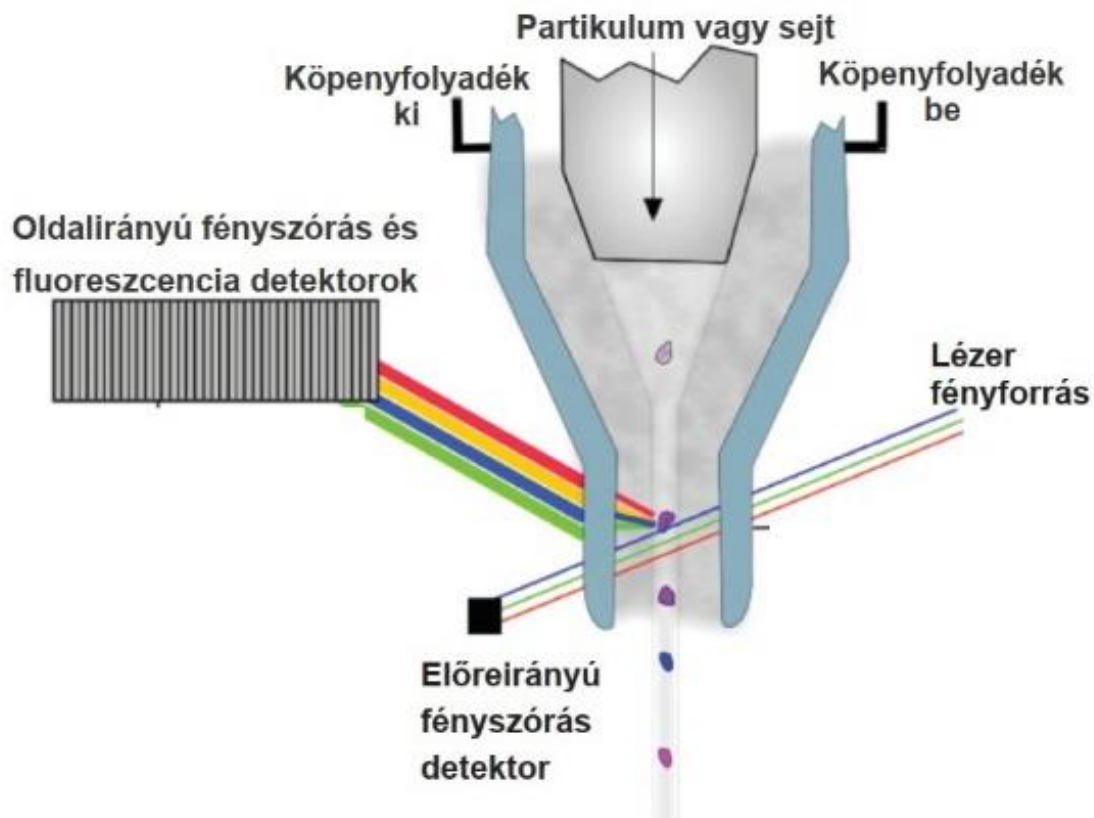
1.3.1. Az áramlási citométer története és működése

Az áramlási citometria módszere több évtizedes múltat tekint vissza és mára az élettan, immunológia, hematológia és onkológia területén alapvető kutatási és diagnosztikai eszközzé vált. Olyannyira, hogy ma már magas színvonalú rutin klinikai laboratórium el sem képzelhető áramlási citométer nélkül.⁽³⁷⁾

Az áramlási citométer kifejlesztését számos jelentős technikai újítás előzte meg, melyek nélkül a mai, modern citométerek elképzelhetetlenek lennének. A mikroszkópikus sejtek számolásának foto-elektromos technikáját Moldavan 1934-ben publikálta.⁽³⁸⁾ Gucker és O'Konski 1949-ben jelentette meg a második világháború alatt végzett kísérleteik eredményét: fotoelektron-sokszorozó alapú módszerükkel aeroszol részecskéit számszerűsítették.⁽³⁹⁾ 1956-ban a villamosmérnök Wallace H. Coulter részecskeszámláló és analízáló készülék elvi alapjait mutatta be Chicagóban egy elektronikai konferencián.⁽⁴⁰⁾ A módszerének lényege, hogy a sejtek vagy egyéb partikulumok elektrolit oldatban kis nyíláson keresztül egy kapillárisban haladnak, melynek elektromos vezetőképességét detektáljuk. Egy részecske áthaladtában térfogatának függvényében változtatja meg a kapilláris vezetőképességét, így a készülék nem csak számlálni képes a sejteket, de térfogatuk meghatározására is alkalmas. Ezt az elvet követik a mai modern hematológiai automaták is.⁽³⁷⁾

1965-ben Kamensky több-paraméteres sejtanalízisre alkalmas gépet fejlesztett, mely optikai módszerekkel, spektrofotométerrel ultrarapid módszert jelentett szuszpenzióban lévő sejtek vizsgálatára.⁽⁴¹⁾ 1969-ben Van Dilla és munkatársai első alkalommal alkalmazták az áramló folyadékot, a fényforrást és a fluoreszcens detektálást egymásra merőlegesen.^(37, 42)

Az áramlási citométer összetett működéséhez számos fizikai elvre és technikai megoldásra szükség van. A jelen doktori munka szempontjából a fontosabbakat az alábbiakban ismertetem. Az áramlási citométer egyszerűsített felépítését az 5. ábra mutatja be. Az áramlási citometrián alapuló sejtseparálási eljárásról nem ejtek szót, tekintve, hogy a baktériumok antibiotikum érzékenységi tesztjének általunk kidolgozott formájában nem játszik szerepet.



5. ábra Az áramlási citométer működési elve

A mintát tartalmazó folyadékszuszpenziót a hidrodinamikai fókuszálás során a körülötte áramló köpenyfolyadék vékony sugárrá alakítja, melynek köszönhetően a vizsgálandó sejtek egyesével haladnak át a fénynyalábon. A sejtek okozta előre és oldalra irányuló fényszórást, illetve a fluoreszcenciát detektáljuk és számszerűsítjük. Részleteket lásd a szövegben.

J.P. Robinson Flow cytometry: past and future című cikk ábrája módosítva (43)

1.3.1.1. Az áramlás szabályozása: a hidrodinamikai fókuszálás

Az áramlási citométerekben a mérendő mintát, mely oldatban lévő sejteket, részecskéket jelent, jellemzően túlnyomás segítségével egy fejhez juttatják. A fej egy olyan folyadékkamra, melybe a minta egy apró, kerek nyíláson keresztül centrálisan érkezik. A folyadékkamra kialakítása lehetővé teszi, hogy stabilan lamináris áramlás alakuljon ki, mind a mintát szállító oldatunk, mind pedig az azt körülvevő köpenyfolyadék tekintetében is. A folyadékoszlopban lévő, lamináris áramlás egyrészt megakadályozza a mintánk és a köpenyfolyadék keveredését, másrészt pedig a mérendő sejteket a mintánkat szállító oldat közepére terelik. Ezt a jelenséget nevezünk hidrodinamikai fókuszálásnak, mely lehetővé teszi, hogy a mintában a sejtek egyesével haladjanak át a fénynyalábon. Az

általunk a kísérleteink során használt BD FACSCalibur készülék a környezetétől gumigyűrűvel izolált mintatartót túlnyomás alá helyezve szállítja a mintát a fejhez. A fejben a mintánk körül a köpenyfolyadék lényegesen magasabb nyomás mentén, magasabb áramlási sebességgel mozog. A magasabb áramlási sebességgel mozgó köpenyfolyadék arányaiban nagyobb keresztmetszetét foglalja el a rendelkezésre álló csatornának, így a mintánkat tartalmazó szuszpenziónk vékony sugárban középre „szorul”.^(44, 45) Újabb áramlási citométerek a hidrodinamikai fókuszálást akusztikus úton is kiegészítik, ebben az esetben ultrahang (>2 MHz) segítségével a partikulumokat még pontosabban középre rendezik. Ennek segítségével a pontosabb detektálás rövidebb mérési időt vagy alacsonyabb kiindulási koncentrációt tesz lehetővé.⁽⁴⁶⁾

A köpenyfolyadék fluoreszcencia és partikulum mentes folyadék kell legyen. A különböző készülékek gyártói ajánlást adnak az alkalmazható köpenyfolyadékok tekintetében. Teoretikusan a köpenyfolyadék akár részecskeszűrt, desztillált víz is lehetne, hiszen a köpenyfolyadék és a minta keveredése a citométer felépítéséből adódóan az áramlási celláig kizárt. Amennyiben azonban sejtszeparálást is végzünk, mindenképpen izotóniás pufferoldatot kell alkalmaznunk a hidrolízis elkerülése érdekében.⁽⁴⁵⁾

1.3.1.2. Fényforrások és megvilágítás

Az áramlási citométerek fényforrása vagy lámpa, vagy lézer lehet. A higanygőz- vagy a xenonlámpák előnye, hogy olcsóbbak, mint a lézerek, nincs hűtési és speciális elektronika igényük. Mindkét lámpa több emissziós csúccsal is rendelkezik, melyek ismerete a mérés tervezésekor fontos és figyelembe veendő a fluoreszcens festék választásakor. Lehetőség szerint emissziós csúcsra eső abszorpciós maximummal bíró festék választandó. Hátrányuk, hogy a fókuszálásuk körülményes, speciális optikai elrendezést igényel.⁽⁴⁵⁾

A legtöbb áramlási citométer fényforrásként egy vagy több lézert alkalmaz, melyek fényintenzitása visszacsatolási mechanizmusokkal stabilan tartható és nagyon jól fókuszálható. A leggyakrabban alkalmazott lézerek emissziójának hullámhosszai a következők: 488 nm (kék), 405 nm (ibolya), 532 nm (zöld), 552 nm (zöld), 561 nm (zöld-sárga), 640 nm (vörös) és 355 nm (ultraviola).⁽⁴⁷⁾

A modern, multiparaméteres készülékek egynél több fényforrást használnak. Az egyik általában egy argonion lézer 488 nm-es kék fénnel. A másik lehet vörös fényt emittáló kripton-vagy hélium-neon lézer vagy akár argon-ion lézerrel gerjesztett festéklézer, mely

utóbbiakkal akár a teljes látható spektrum átfogható.⁽⁴⁵⁾

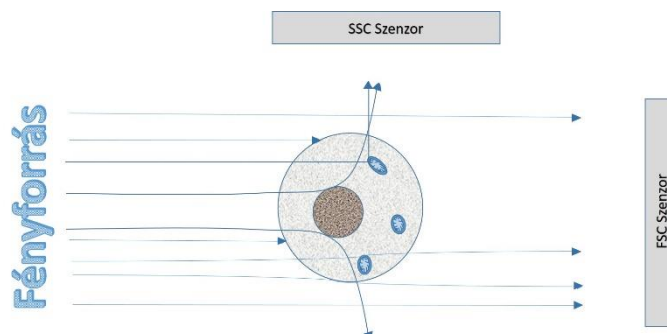
A megvilágításra a hidrodinamikailag fókuszált mintán néhány milliméterrel a fej alatt kerül sor. A mintafolyadék átmérője jellemzően 15-20 μm , melyet 50-200 μm átmérőjű köpenyfolyadék vesz körbe. A detektálás az áramlási cellán áthaladó mintán történik. A fókuszált fénynyalábunk alakja szintén meghatározott, melyet gömbi és hengeres lencsékkel végez a készülék. Kör keresztmetszet esetén összességében nagyobb teljesítmény juttatható a mintára, így az érzékenység növelhető, azonban a legkisebb elmozdulás is a széli részek alacsonyabb intenzitása kapcsán rontja a pontosságot. Amennyiben a nagyobb pontosság a cél, akkor ellipszis alakú fénynyaláb választandó, mert annak közepén a fényintenzitás stabilan tartható. Cserébe viszont az érzékenység csökken, ami például sejtfelszíni antigének vizsgálata esetén lehet kritikus.⁽⁴⁵⁾

1.3.1.3. A fényszórás

A megvilágító fényt a mintán áthaladó részecskék szórják a tér minden irányába. Ennek detektálása legegyszerűbben a fény irányába eső érzékelővel történhet. A fény jelentős része zavartalanul halad tovább, egy része azonban a sejtmembránnal találkozva elnyelődik vagy enyhén divergál, elhajlik. Ezt nevezzük előre irányú fényszórásnak (Forward Angle Light Scattering – FALS vagy még gyakrabban Forward Scattering – FSC). A FSC szenzora gyakran fotódióda, mellyel a nagyobb fényintenzitás is detektálható és a fényforrással ellentétes oldalon helyezkedik el. A fénynyalábon áthaladó részecske mérete befolyásolja az FSC szenzor által detektált jelet, így relatív méretmeghatározást is lehetővé tesz.^(45, 48)

A sejtek organellumaival (endoplazmatikus retikulum, mitokondrium, sejtmag stb.) találkozó, az elhajlás jelenségénél nagyobb szögben megtörő fényszórást oldalirányú szóródásnak nevezzük (Wide Angle Light Scattering – WALs vagy gyakrabban Side Scattering – SSC). Az SSC-t a fénynyaláb útjára merőlegesen detektálhatjuk, ehhez a jellemzően a részecskék határfelületeiről oldal irányba szórt, fókuszált és szűrővel gyengített fényt fotoelektron-sokszorozóval érzékeljük. Az oldalirányú szóródás mértéke a sejtek vagy részecskék komplexitásától függő paraméter.^(45, 48)

A fényszórás jelenségét a 6. ábra mutatja be.



6. ábra A fényszórás jelensége

A fényen áthaladó részecskén a fény egy része elnyelődik, egy része pedig a tér minden irányába szóródik. A szóródás (és elnyelődés) mértékét detektálhatjuk a fény útjába eső előre irányuló szóródás detektorral (FSC Szenzor az ábrán), illetve az oldalirányú szóródást a fény útjára merőlegesen elhelyezett oldalirányú szóródás detektorral (SSC Szenzor az ábrán). A direkt fény intenzitása lényegesen nagyobb, mint a szóródott nyalábé. (Saját ábra.)

1.3.1.4. Fluoreszcencia detektálása

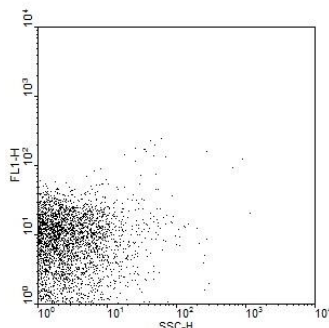
Fluoreszcenciás mérések az áramlási citometria centrális dogmáján alapulnak, mely szerint a mért emissziós intenzitás egyenesen arányos a sejtekhez, illetve azok alkotóelemeihez kötött fluorofór mennyiségével. A mintához adott, fluoreszcens festékek segítségével többek között DNS-tartalom mérés, így sejtciklus vagy apoptózis meghatározás, illetve immunofluoreszcencia segítségével, sejtfelszíni fehérjék meghatározásával sejtek fenotipizálása is lehetséges. ^(45, 49)

A fluoreszcencia detektálására használt fotoelektron-sokszorozók mind a fénynyalábhoz, mind a folyadékoszlophoz képest merőlegesen helyezkednek el. Többcsatornás készülékek esetén a lézerrel gerjesztett fluorofórok által emittált fényt hullámhossz szerint szétválasztják és különböző detektorokhoz irányítják. A szétválasztást és irányítást dikroikus tükrökkel és sávszűrőkkel oldják meg. A dikroikus tükrök bizonyos hullámhossztartományban visszaverik (pl. a gerjesztő fény hullámhosszát), más tartományban (pl. az emittált fény hullámhosszában) átengedik a beeső fényt. ^(45, 50)

1.3.1.5. Mérési eredmények feldolgozása

Az érzékelt jelet erősítést követően analóg-digitális átalakítók segítségével számokká alakítjuk. A számszerűsített eredmények feldolgozására és bemutatására több lehetőségünk van, de általában kétparaméteres adatábrázolást alkalmazunk, felhőkép (dot

plot) formában. Ebben az esetben a koordináta rendszerben minden pont egy eseményt jelöl, a két tengelyen található paraméter által meghatározott helyen. Egy reprezentatív dot plot látható az 7. ábrán. ⁽⁵¹⁾



7. ábra Példa a dot plot ábrázolásra

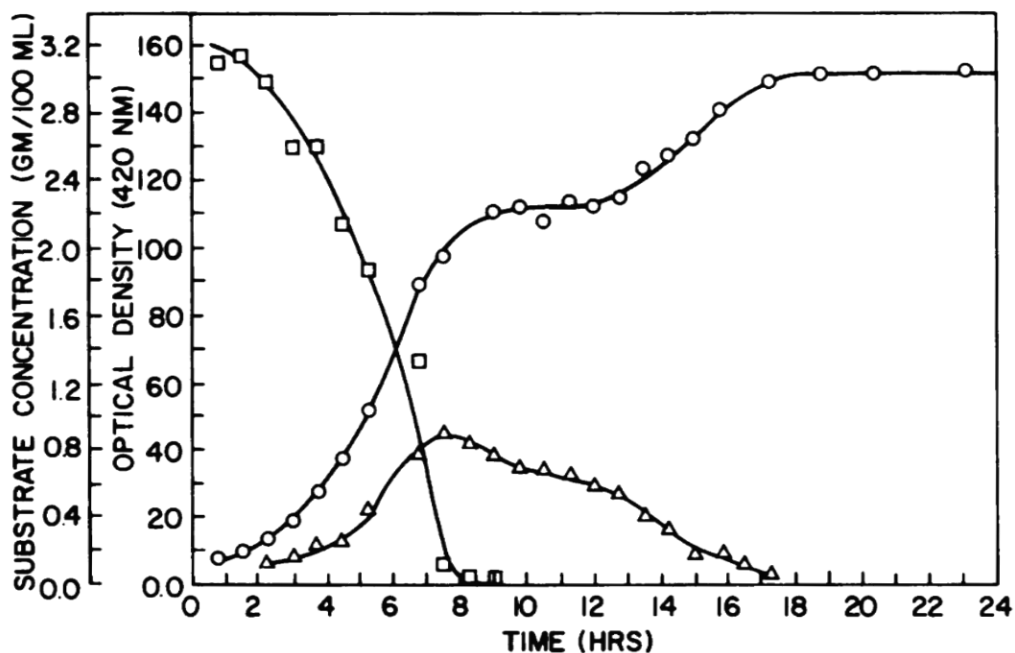
Az ábra minden pontja egy eseményt jelöl. Abszcisszán az oldalirányú fényszórás mértéke, ordinátáján pedig fluoreszcens intenzitás látható 530 nm-en detektált zöld fény tekintetében, logaritmus skálán. (Saját ábra.)

Igen gyakran az összes esemény közül csak bizonyos paraméterekkel bírót szeretnénk elemezni. Ebben az esetben egy vagy akár több kétdimenziós ábrázoláson tudjuk az úgynevezett kapuzással a kívánt esemény populációt kiválasztani. Ezt követően az adatok részletes analízisét már csak ezen az alpopuláción végezzük majd. ⁽⁵¹⁾

A kapuzásra példát a 4.1. fejezetben mutatok be.

1.3.2. Baktériumok detektálása áramlási citométer segítségével

Bailey és munkatársai már 1977-ben igazolták, hogy az áramlási citométer alkalmas eszköz baktériumok vizsgálatára. Méréseik során nem csupán számszerűsítették a baktériumokat, de azok protein és nukleinsav eloszlását is vizsgálták. Mindezt a különböző életciklusok vizsgálatára, vegetatív sejtek és endospórák elkülönítésére is alkalmas eszköznek találták. ⁽⁵²⁾ Kutatócsoportjuk következő, 1978-ban publikált vizsgálatában a másodlagosan, többsejtű ősből egysejtűvé egyszerűsödött, 5-10 µm átmérőjű élesztőgomba (*Saccharomyces cerevisiae*) kétfázisú osztódását igazolták áramlási citométerrel. Eredményeik egy részét a 8. ábrán mutatom be. ⁽⁵³⁾



8. ábra Élesztőgomba (*Saccharomyces cerevisiae*) populáció vizsgálata és számszerűsítése áramlási citométerrel

Az ábrán körökkel jelölt az élesztőgomba osztódással növekvő populációja, mely kétfázisú növekedést mutat. Négyzettel jelölt az elsődleges tápanyagként funkcionáló glükózkoncentráció és háromszög jelöli a másodlagos tápanyag, az etanol koncentrációját. Leolvasható, hogy a glükóz koncentráció csökkenése a log fázisból lag fázisba viszi át a populációt, amíg az élesztőgomba fel nem készül a másodlagos tápanyag felhasználására. Annak párhuzamos csökkenése mellett ezután ismét osztódni kezd, átmenetileg újabb, bár kevésbé meredek log fázisba jutva.

Feltűnő emellett, hogy a populáció számszerűsíthető változása már rövid időn belül egyértelműen detektálható áramlási citométerrel. A két log fázis összehasonlítása alapján a meredekség erősen tápanyag, azaz környezet függő.

Engedéllyel, módosítás nélkül átvéve M. F. Gilbert, D. N. McQuitty és J. E. Bailey Flow microfluorometry study of diauxic batch growth of *Saccharomyces cerevisiae* című cikkéből⁽⁵³⁾

Steen és Boye 1981-ben párhuzamosan számszerűsítette a vizsgált *Escherichia coli* populációt és detektálta az egyedi sejtek DNS tartalmát.⁽⁵⁴⁾

1996-ra Davey és Kell már részletes, 30 oldalas összefoglalót jelentetett meg a Microbiological Reviews című folyóiratban, mely áramlási citométer segítségével a mikrobák heterogenitásának megfelelő szétválogatási lehetősége mellett az addig ismert sejtleletani, életképességi vizsgálatokon túl antibiotikum rezisztencia vizsgálati lehetőségeket is taglalt.⁽⁵⁵⁾

1.3.3. Az áramlási citométer alkalmazása antibiotikum érzékenységi profil vizsgálatára

Az elmúlt évtizedekben számos kutatást publikáltak áramlási citométerrel történt antibiotikum érzékenységi vizsgálatokról. Bizonyított, hogy az áramlási citométer a

baktériumok morfológiájának, metabolikus aktivitásának és életképességének vizsgálatára is alkalmas. Legtöbbször a baktériumok vizsgálatára különböző fluoreszcens jelöléseket használnak. Ezek képesek az antibiotikum hatására károsodott membránon keresztül intracelluláris alkotóelemekhez kötődni vagy érzékenyek akár a membránpotenciál változására, ezáltal a sejt károsodását és életképességét is vizsgálhatjuk a segítségükkel. ⁽⁵⁵⁻⁶²⁾

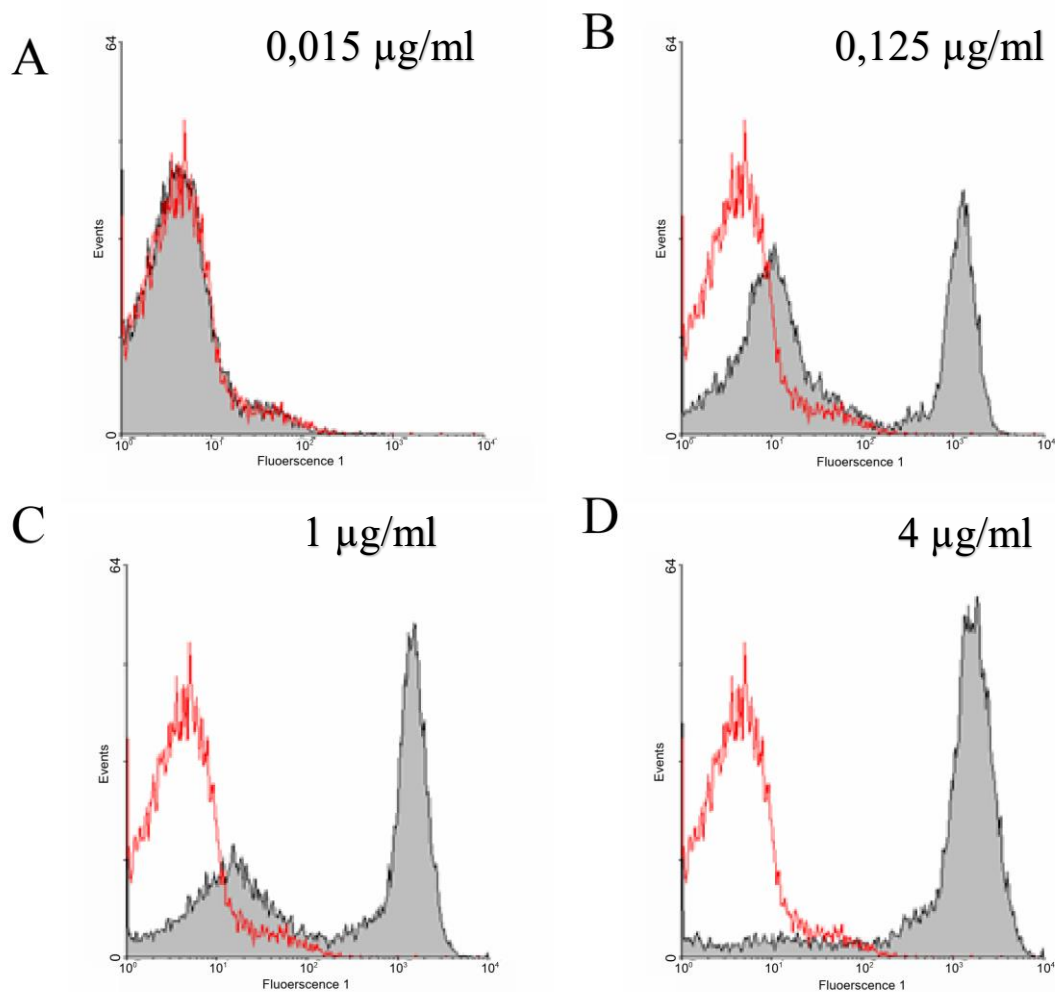
Az egyes módszereket Nuding és Zabel 2013-ban megjelent publikációja alapján mutatom be. Vizsgálatukban többféle detektálási eljárást kombináltak: a baktériumok Gram szerinti identifikálását, AST meghatározást és MRSA kimutatást. ⁽⁵⁹⁾

A Gram identifikálás során a SYTO® 9 és hexidium jódid fluoreszcens festékeket egyszerre alkalmazták. A SYTO® 9 minden baktériumot megfest, a hexidium jódid ezzel szemben a Gram-negatív baktériumok lipopoliszacharid rétegén nem jut át, így csak az ép Gram-pozitív baktériumok festi és szorítja ki a másik festéket. Ezek után a Gram-negatív baktérium zöld színtartományban esően, a Gram-pozitív baktériumok pedig sárgás-vörös tartományban emittálnak. ⁽⁵⁹⁾

A Gram szerinti identifikálás után AST-t végeztek a baktérium Gram-státuszának függvényében az 1. táblázatban felsorolt antibiotikumok segítségével. Az antibiotikum érzékenység meghatározásához a baktériumokat antibiotikum és membránpotenciálra érzékeny Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol (DiBAC₄(3)) fluoreszcens festék jelenlétében 120 percig nem szelektív, tápanyagban gazdag Schaedler táptalajon inkubálták 37 °C-on. Az inkubálást követően a baktériumokat 10 perc centrifugálás után foszfáttal puffertelt sóoldatban reszuszpendálták. Ezt követően mérték az elegyet áramlási citométerrel, reprezentatív eredményüket a 9. ábrán mutatom be. ⁽⁵⁹⁾

1. táblázat Nuding és Zabel vizsgálatában alkalmazott antibiotikumok a Gram státusz függvényében ⁽⁵⁹⁾

Gram-negatív baktériumok	Gram-pozitív baktériumok
Minta 1: antibiotikum mentes kontroll	Minta 1: antibiotikum mentes kontroll
Minta 2: mezlocillin 128 µg/ml	Minta 2: oxacillin 0.25 µg/ml
Minta 3: piperacillin 128 µg/ml	Minta 3: piperacillin 1 µg/ml+tazobactam 0.1 µg/ml
Minta 4: cefazolin 8 µg/ml	Minta 4: cefazolin 1 µg/ml
Minta 5: cefuroxime 8 µg/ml	Minta 5: cefuroxime 1 µg/ml
Minta 6: ciprofloxacín 2 µg/ml	Minta 6: ciprofloxacín 1 µg/ml
Minta 7: gentamicin 6 µg/ml	Minta 7: gentamicin 2 µg/ml

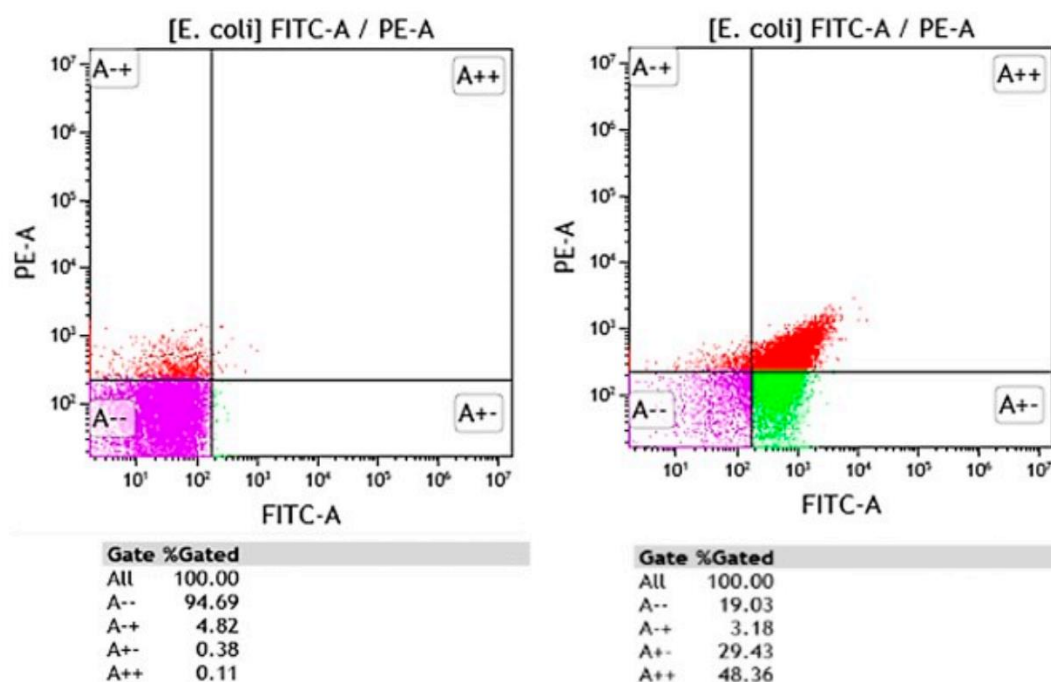


9. ábra Ciprofloxacin emelkedő koncentrációjának hatása *S. pneumoniae* membránpotenciáljának változására

A ciprofloxacin emelkedő koncentrációja a sejtek pusztulását és depolarizációjukat okozza, ennek megfelelően a membránpotenciálra érzékeny DiBAC₄(3) festék egyre nagyobb mértékben kötődik intracelluláris fehérjékhez a citoplazmában. Ennek jele az egyre intenzívebb fluoreszcencia, melyet a szürkén kitöltött, növekvő antibiotikum koncentráció mellett magasabb intenzitás irányába tolódó hisztogram mutat. A vörös vonal a kontrollt jelentő, antibiotikum mentes baktériumra jellemző hisztogramot mutatja.

Nuding és Zabel *Detection, Identification and Susceptibility Testing of Bacteria by Flow Cytometry* című cikkéből változtatás nélkül átvett ábra ⁽⁵⁹⁾

Több festék alkalmazásával nemcsak az élő és elhalt baktériumok között tehetünk különbséget, de adott esetben azonosíthatjuk a még élő, de valamely kezelés, például antibiotikum vagy akár fertőtlenítő szer hatására sérült baktériumok populációját is. Ehhez olyan festékeket érdemes használni, mely a membránpotenciál változása mellett a membrán permeabilitás változására érzékeny. Erre példát a 10. ábrán láthatunk.



10. ábra Áramlási citométerrel végzett vizsgálat FITC-A/PE-A dot ploton ábrázolt eredménye natív (bal oldal) és felület-fertőtlenítővel kezelt (jobb oldal) *E. coli* esetén

A baktériumokat propidium jodiddal (PI) és DiBAC₄(3) festékekkel jelölték. A PI 615 nm maximális emisszióját a PE-A csatornán, a DiBAC₄(3) 516 nm maximális emisszióját a FITC-A csatornán detektálták. A PI a membrán permeabilitás növekedésével festi a sejteket, a DiBAC₄(3) pedig a membránpotenciál változására érzékeny. A két festék segítségével elkülöníthető az élő sejtek populációja (A--, lila események: ezek esetén sem a membránpotenciál nem változott, sem permeabilitás nem váltak) a károsodott (A+-, zöld színnel jelölt események: membránpotenciál változott, de a plazmamembrán intakt maradt) és az elpusztult baktériumoktól (A++ és A-+, piros színnel jelölt események: mind a membránpotenciált elvesztették, mind membrán permeabilitás megnőtt).

Marutescu LG *Current and Future Flow Cytometry Applications Contributing to Antimicrobial Resistance Control* című cikkéből változtatás nélkül átvett ábra ⁽⁶³⁾

Filbrun és munkatársai 2022. áprilisában publikálták módszerüket, mely során direkt módon, jelölésmentesen meghatározták az AMR-t pozitív hemokultúrákból a baktériumok számának változása alapján, mindössze 5 órával a hemokultúra pozitívvá válása után 4 órás inkubációs periódussal. Vizsgálatukban *Pseudomonas aeruginosa* esetén előfordult, hogy a négy órás inkubáció kevésnek bizonyult és nem tapasztaltak kellő felnövekedést. ⁽⁶⁴⁾

Néhány válogatott tanulmányt, amely az áramlási citométer AST célú felhasználást vizsgálja, a 2. táblázatban mutatok be. Kiemelendő, hogy mindezidáig kereskedelmi forgalomban csak a portugál Fastinov[®] rendszer érhető el Európában Conformité Européenne (CE) tanúsítvány birtokában, FDA engedélyt mindezidáig nem kapott.

2. táblázat Válogatott közlemények áramlási citométer segítségével történő AST meghatározás módszereiről

Publikáció éve	Detektálás elve	Detektálás módszere	Tesztelt baktériumok	Tesztelt antibiotikumok	Eredmény és a szükséges idő	Referencia
2013	FCM • Gram identifikálás fluoreszcens festékekkel • AST membránpotenciál érzékeny festékekkel • MRSA kimutatása sejtfelszíni protein elleni antitesthez kötött fluoreszcens festékekkel	DiBAC ₄ (3) SYTO® 9 hexidium jodid	számos Gram pozitív és negatív baktérium	Gr -: mezlocillin, piperacillin, cefazolin, cefuroxime, ciprofloxacin, gentamicin Gr +: oxacillin, piperacillin-tazobactam, cefazolin, cefuroxime, ciprofloxacin, gentamicin	2h	(59)
2017	Akusztikus fókuszálású FCM	SYTO® 9 Propodium jodid	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	meropenem	S/R és MIC 2,5 óra	(65)
2019	FCM (Fastinov®) Károsodott membrán kimutatása	Meg nem nevezett fluoreszcens festékek	Enterobacterales, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Acinetobacter baumannii</i>	Colistin (2 és 4 mg/L koncentráció)	S/R 2h	(66)
2020	FCM (Fastinov®) Károsodott membrán kimutatása és membránpotenciál érzékeny festék	Propodium jodid és DiBAC ₄ (3)	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia marcescens</i> , <i>Providencia</i> spp., <i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus</i> spp.	Ceftolozane–tazobactam (1/4, 2/4, 4/4 és 8/4 mg/L)	S/I/R 2h	(62)
2020	FCM Membránpotenciál érzékeny festék	Fluoreszcens festék DiBAC ₄ (3)	<i>Escherichia coli</i>	Ceftriaxone, ciprofloxacin, nitrofurantoin, trimethoprim–sulfamethoxazole	S/R 4h	(67)
2021	FCM (Fastinov®) A közleményben nem szerepel a detektálás elve	Meg nem nevezett fluoreszcens festékek	Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok	Gram-negatív panel: 13 antibiotikum Gram-pozitív panel: 7 antibiotikum	S/I/R 2h	(61)
2022	Pozitív hemokultúra saponin előkezelés után, sucrose-ba visszanyerve kerülnek inkubálásra, majd FCM	Festés nélkül	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram negatív: ceftazidim, meropenem, tobramycin <i>Staphylococcus aureus</i> : oxacillin	S/I/R 5h	(64)
2022	FCM, majd MALDI-TOF (identifikálás) + VITEK2 (AST)	FCM: Csak baktérium szám detektálás	<i>Escherichia coli</i>	VITEK2	Nem valódi áramlási citométer alapú módszer	(68)

A több évtized, számos vizsgálat és biztató eredmények ellenére az áramlási citometria mind a mai napig nem hódított teret magának az AMR-t meghatározó módszerek között. Ennek oka gazdasági megfontolások mellett legvalószínűbben abban keresendő, hogy a klinikai mikrobiológusok által nem ismert módszer nyelvezete is eltér a megszokottól. A klasszikus módszerek mellett nehezen értelmezhetőek az áramlási citométer alapú módszerek által használt életképesség, sejtkárosodás, membránpotenciál változás kifejezések. Ráadásul az eddigi vizsgálatok jellemzően nem is törekedtek kvantitatív érzékenységi profil megállapításra, MIC meghatározásra, megelégedtek a szenzitív vagy rezisztens kvalitatív eredménnyel. A kutatócsoportunk által fejlesztett módszer ezt az űrt kívánja többek között betölteni a következő fejezetekben részletezett módon.

2. Célkitűzések

Doktori munkám célkitűzései:

1. A rutin klinikai laboratóriumban elérhető BD FACSCalibur™ áramlási citométer baktériumok megbízható detektálására való alkalmasságának igazolása: a nem baktériumok detektálására konstruált áramlási citométer megfelelő beállítások mellett megbízhatóan detektálni képes a baktériumok számának változását.
2. A megbízható, diszkriminatív változáshoz szükséges inkubálási idő hosszának, vagy még pontosabban, a szükséges baktérium szám változás mértékének (osztódási ciklusok számának) meghatározása.
3. Az áramlási citométerrel meghatározott MIC értékek validálása a hagyományos gold standard MIC meghatározására szolgáló vizsgálatokkal (ennek keretében az új eljárással kapott MIC értékekből az EUCAST adatbázis alapján meghatározott antibiotikum érzékenységi profilokat is összevetettük a hagyományos mikrodilúciós eljárással kapott profilokkal).
4. A 3. pontban meghatározott validálási eljárás keretében a gyakorlati alkalmazás számára egyszerűen alkalmazható képlet vagy eljárási szabály megalkotása, melynek segítségével a hagyományos gold standard módszerhez hasonlóan eldönthetjük, hogy az adott antibiotikum koncentráció mellett a baktérium osztódásra, növekedésre képes-e.
5. Áramlási citométer segítségével MIC meghatározáson alapuló antibiotikum érzékenységi teszt kidolgozása, mely a gold standard mikrobiológiai módszerekhez hasonló megbízhatósággal, de lényegesen rövidebb idő alatt elvégezhető.

3. Módszerek

Méréseinket a Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet Központi Laboratóriumában FACSCalibur™ (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) áramlási citométerrel végeztük. A mérések során az elsődleges analízis a citométerhez csatlakoztatott Macintosh számítógépen BD CellQuest™ Pro programmal történt, majd az eredmények kiértékelését WinMDI 2.9 (The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility) programmal végeztük el.

Kísérleteink során a Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet Mikrobiológiai Laboratóriumának segítségével, az általuk biztosított hat különböző laboratóriumi baktériumtörzsszel dolgoztunk: *Escherichia coli* (ATCC:25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC:700603), *Enterococcus faecalis* (ATCC:29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC:27855), *Streptococcus pyogenes* (HNCMB 80003) és *Staphylococcus aureus* (ATCC:29213).

Az egyes baktériumok kapcsán optikai denzitás méréssel standardizált törzsoldatot készítettünk, steril, 0,9%-os NaCl oldatba (Teva Gyógyszergyár, Debrecen, Magyarország) transzferált baktériumok 0,5 McFarland oldatának 10-szeres hígításával. A törzsoldatból 10 µl-t oltottunk 90 µl táptalajra. Módszerünket mind Mueller-Hinton (MH), mind Luria-Bertoni (vagy másnéven Lisogeny broth, LB) táptalajokkal vizsgáltuk (mindkettő: Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A mintákat 37 °C-on, aerofil körülmények között inkubáltuk. Az inkubálás optimális hosszának meghatározását a 3.2. fejezetben részletezem. Az inkubálásra 96-lyukú lemezekben (Tomtec, Budapest, Magyarország) került sor, 12-féle antibiotikum (vancomycin, ciprofloxacin, levofloxacin, ceftriaxon, cefepim, amoxicillin-klavulánsav, piperacillin-tazobactam, trimethoprim-sulfamethoxazole, cefazolin, colistin, imipenem, gentamicin) felező hígítással előállított különböző koncentrációi mellett a 3.3. fejezetben részletezett módon.

Az inkubálást követően a 3.1. fejezetben leírtaknak megfelelően a mintánkat fixáltuk és fluoreszcens festékekkel jelöltük, majd áramlási citométer segítségével a baktériumokat számszerűsítettük.

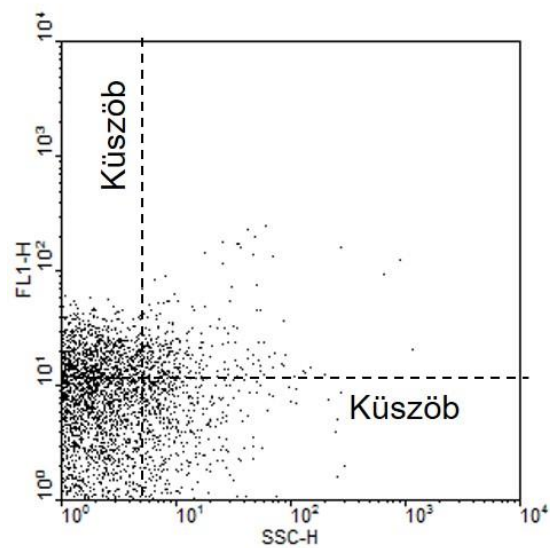
3.1. Az áramlási citométer detektálási képességének maximalizálása és a minta fixálása fluoreszcens festék segítségével

A legtöbb baktérium mérete 500 és 3000 nm közé esik⁽⁶⁹⁾, így a hagyományos áramlási citométerek detektálási tartományának alsó határán helyezkednek el, mely 300 nm környékére esik. Ezért a kisebb mérettartomány megbízható detektálása érdekében fluoreszcens jelölést alkalmaztunk Acridine orange (AO, *N,N,N',N'-Tetramethylacridine-3,6-diamine*) festékkel (Serva-Feinbiochemica, Heidelberg, Németország)⁽⁷⁰⁾.

Az AO szelektív DNS-RNS jelölést tesz lehetővé. A festék emissziója attól függ, hogy DNS-hez vagy RNS-hez kötött. A kettős-szálú nukleinsavhoz kötődve 525 nm-en, zöld színű fluoreszcens fényt, egyszálú nukleinsavhoz kötődve 650 nm-en, a vörös tartományban emittál gerjesztés esetén.⁽⁴⁹⁾

A fixáló oldatunk alapja Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (GE Healthcare, South Logan, UT, USA) volt, melyet hidrogén-klorid segítségével pH 3-ra titráltunk és 2 µg/ml végkoncentrációig AO-t adagoltunk hozzá. A mérések előkészülete során 500 µl fixáló oldathoz a beoltott tápoldatból inkubációt követően 90 µl-t pipettáztunk és 5 perc behatási időt követően mértünk az áramlási citométerrel. A fluoreszcens festék DNS-hez és RNS-hez kötődése és az alacsony pH hatására várákozásaink szerint a baktériumok károsodása következik be, mely további osztódási képességük elvesztésével jár. Emellett a klinikai gyakorlatban előfordulhat, hogy az előkészített minta mérése a citométer foglaltsága vagy más technikai okból nem tud azonnal megvalósulni. Annak igazolására, hogy a fixált minta szobahőmérsékleten várákozva már nem mutat érdemi baktérium szám változást, méréseket végeztünk, melyek eredményét a 4.1. fejezetben tárgyalom.

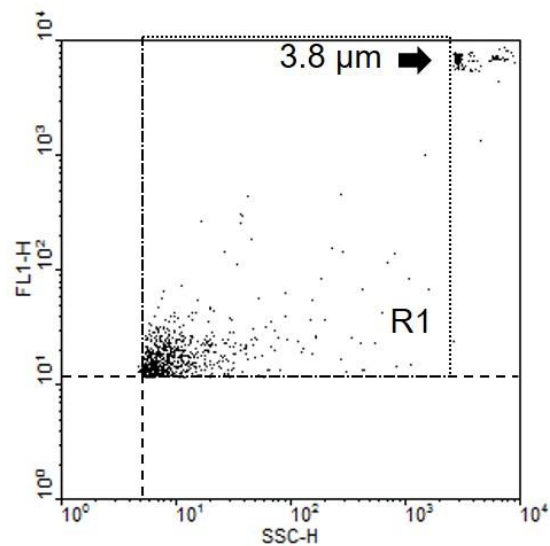
A citométerrel való mérés során alapvető, hogy azokra az eseményekre fókuszáljunk, melyek a mérendő populációba tartoznak. Ennek eszköze a kapuzás, mely nagyban növeli a citométer detektálási és differenciálási képességét. A kapuzási eljárásunk során célunk, hogy kizárjuk a készülék elektromos zajából és a fluoreszcens festéket tartalmazó fixáló és tápoldatunk keverékéből adódó háttérzajt. A kapuzás során elsőként az üres, fixált tápoldatot mértük le. A küszöb alsó határát a 11. ábrán látható módon úgy állítottuk be, hogy a háttérzaj legalább 90%-át kizárjuk.



11. ábra A detektálási küszöb beállítása

A fixáló és tápoldat együttes zaját mind a SSC, mind a fluoreszcens csatornán megfelelő küszöb beállításával kizárjuk. (saját ábra)

A detektálási kapu felső mérethatárát standard méretű, 3,8 μm -es, fluoreszcens gyöngyök (SPHERO™ Rainbow Alignment Particles, Spherotech Inc., USA) alkalmazásával állítottuk be. Ennek eredményét lásd 12. ábrán.

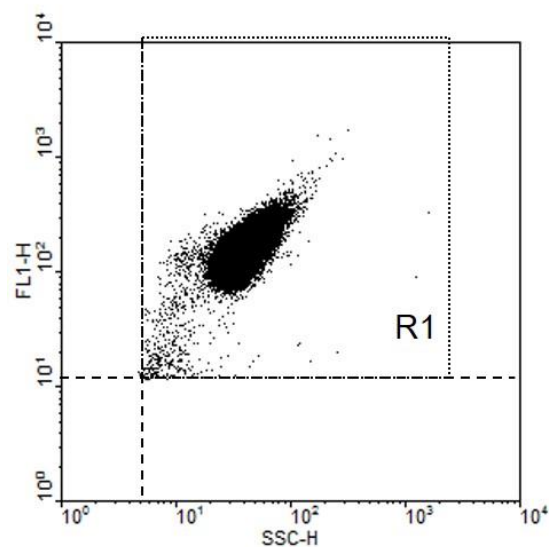


12. ábra A detektálási kapu beállítása

Az „R1” négyzetes detektálási kapu alsó határát 7. ábrán jelölt módon a háttérzaj kizárása adja, felső határát pedig a nyíllal jelölt, ismert méretű gyöngyök. (saját ábra)

Az így meghatározott detektálási kapuban megjelenő eseményeket, melyek megfelelő méret és összetettség mellett DNS-hez kötődő fluoreszcens festék eredményeként fluoreszcens csatornán vizsgálva is jelet adtak, baktériumokként azonosítottuk és az R1 kapun belül számszerűsítettük az áramlási citométer segítségével.

Reprezentatív példaként a 13. ábrán lévő dot ploton az MH táptalajon 4 óra inkubáció után megjelenő *E. coli* populációja látható.



13. ábra *E. coli* populáció az "R1" detektálási kapuban

12. ábra szerint meghatározott detektálási kapuban, 4 órás, 37 °C-on történt inkubáció után megjelenő *E. coli* populáció reprezentatív dot plot ábrázolása SSC és FL1-H fluoreszcens csatornán. (saját ábra)

3.2. Az optimális inkubációs idő meghatározása

Korábbi áramlási citométerrel történt vizsgálatok akár 2 órás inkubációs periódus után eredményt adtak. Ezek a korábbi vizsgálatok azonban a sejtek életképessége, membrán károsodása vagy membránpotenciál változása alapján diagnosztizáltak. Pilot méréseink során azt találtuk, hogy a módszerünkkel, a MICy-vel, 2 órás inkubációs idő után gyakran nem tapasztaltunk oly mértékű változást a baktériumok számában, hogy valóban diszkriminatív lehetett volna a mérés. Ezekben az esetekben felmerült a kérdés, hogy az antibiotikum akadályozta meg a baktériumokat az osztódásban vagy pedig csak még nem került át lag fázisból log fázisba a populáció. A túl rövid inkubációs idő az érzékenységi profil meghatározása során tévedéshez vezethet.

Az optimális inkubációs idő meghatározására ezért antibiotikummentes közegben hat órán keresztül óránként három-három mérést végeztünk mind a hat általunk vizsgált baktériummal, mind MH, mind LB táptalajon. A két táptalaj eltérő tápanyag összetétele kapcsán megválaszolandó kérdés, hogy különböző sebességgel képesek-e osztódni a baktériumok. Az EUCAST ajánlás általánosságban mikrodilúció vizsgálatához MH táptalaj alkalmazását javasolja egyes baktériumok kivételével⁽¹⁵⁾, de az új módszerünket más táptalaj tekintetében is vizsgálni kívántuk.

3.3. Antibiotikum kiosztás

A 96-lyukú lemez 12 oszlopába antibiotikumok felező hígítással előállított, meghatározott koncentrációi kerültek, oly módon, hogy az antibiotikumot is tartalmazó tápoldat össztérfogata befertőzés előtt 90 µl legyen. Az 12-féle antibiotikum a következőkből állt össze: vancomycin, ciprofloxacin, levofloxacin, ceftriaxon, cefepim, amoxicillin-klavulánsav, piperacillin-tazobactam, trimethoprim-sulfamethoxazole, cefazolin, colistin, imipenem, gentamicin.

A lemezünk nyolcadik sorában mérés technikailag elengedhetlen oldatokat helyeztünk el. 3 lyukban a baktériummentes tápoldat volt, melyből 90 µl-t szintén fixáló oldatba pipettáztunk a háttérzaj meghatározása céljából. Ennek kapuzott értékét minden mérési eredményünkben ki kell vonnunk, hogy megkaphassuk a baktériumok valódi számát.

Következő fontos paraméter a törzsoldat kiindulási baktériumszáma. Ennek meghatározásához 3 lyukat az inkubálási periódus végeztével fertőztünk be a mindeddig az osztódást megakadályozandó 0,9%-os NaCl oldatban, 4 °C-on tartott törzsoldat

felhasználásával. A továbbiakban az osztódás megindulását a rövid időn belül alkalmazott fixálási és jelölési eljárásunk akadályozta meg.

A maximális felnövekedés vizsgálatára szintén három lyuk szolgált, melyek antibiotikum mentes tápoldatát a törzsoldat 10 µl-ével fertőztünk be inkubálás előtt.

Az univerzális, minden vizsgált kórokozó esetén alkalmazott antibiotikum kiosztásunkat a 14. ábra mutatja be.

	1. oszl. van	2. oszl. cip	3. oszl. lvx	4. oszl. cor	5. oszl. fep	6. oszl. amc	7. oszl. tzip	8. oszl. sxt	9. oszl. cfz	10. oszl. cst	11. oszl. ipm	12. oszl. gen
1. sor	8	8	8	8	8	32	32	8	8	8	16	8
2. sor	4	4	4	4	4	16	16	4	4	4	8	4
3. sor	2	2	2	2	2	8	8	2	2	2	4	2
4. sor	1	1	1	1	1	4	4	1	1	1	2	1
5. sor	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2	2	0,5	0,5	0,5	1	0,5
6. sor	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	1	1	0,25	0,25	0,25	0,5	0,25
7. sor	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,5	0,5	0,125	0,125	0,125	0,25	0,125
8. sor	MH+ bakt	MH+ bakt	MH+ bakt	MH	MH	MH	MH+ bakt 0'	MH+ bakt 0'	MH+ bakt 0'	üres	üres	üres

14. ábra Az antibiotikum kiosztás sematikus ábrázolása

A 96-lyukú lemezen a 12 oszlopban 12-féle antibiotikum hét különböző, felező hígítással elért koncentrációját mértük ki, a jelzett koncentrációk mértékegysége µg/ml. Az utolsó sorba az áramlási citométeres technikánk követelte kontrol oldatok kerültek.

Jelmagyarázat:

Antibiotikumok: van: vancomycin, cip: ciprofloxacin, lvx: levofloxacin, cro: ceftriaxon, fep: cefepim, amc: amoxicillin-klavulánsav, tzip: piperacillin-tazobactam, stx: trimethoprim-sulfamethoxazole, cfz: cefazolin, cst: colistin, imp: imipenem, gen: gentamicin.

Alsó sor:

MH: Mueller-Hinton tápoldat és a fixáló oldat elegye, a háttérzaj meghatározáshoz

MH+bakt: MH oldatban 4 órát keresztül inkubált, antibiotikum mentes baktérium a maximális felnövekedés meghatározásához,

MH+bakt 0': inkubációt követően, addig hűtőben tartott törzsoldattal befertőzött tápoldat, melyet azonnal fixáltunk a kezdeti baktériumszám meghatározása érdekében.

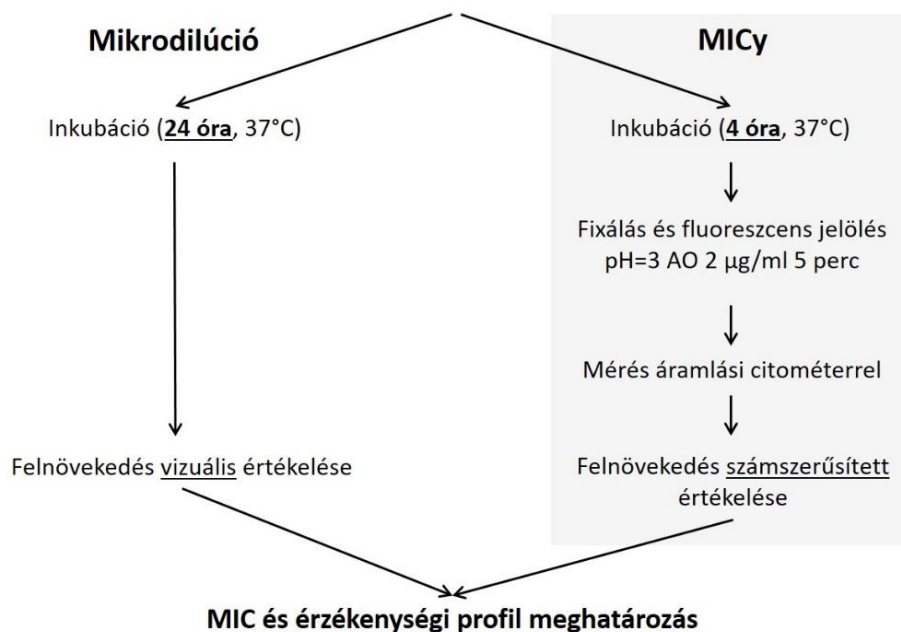
3.4. MIC meghatározáshoz a baktérium populáció számszerűsítése áramlási citométer segítségével

A MIC értékek összehasonlítására párhuzamosan indítottunk kettő, azonos módon készített, tápoldatot és az előző fejezetben leírtak szerinti antibiotikum koncentrációkat tartalmazó, 96-lyukú lemezt.

Az egyiket, a mikrodilúciós lemezt 24 órás inkubáció után mikrobiológus vizuálisan értékelt. Az EUCAST eljárásrend minimum 16-20 órás inkubációt ír elő, melytől a mikrobiológiai labor működési rendje miatt tértünk el: annak érdekében, hogy a munkaidőben indított inkubáció után a lemez leolvasása mindig azonos idő után történhessen. Az értékelés az EUCAST eljárásrendje szerint akkor tehető meg, ha kellő növekedés (zavarosodás) észlelhető a pozitív kontroll (beoltott, antibiotikummentes tápoldat) helyen és nem észlelhető növekedés a negatív kontroll (be nem oltott tápoldat) helyen. ⁽¹⁵⁾

A másik lemezt MICy módszerrel értékeltük. Mérési összeállításunk folyamatábráját a 15. ábra tartalmazza.

Baktériumok beoltása 96-lyukú, felező hígításban antibiotikumokat tartalmazó lemezre



15. ábra MIC és érzékenységi profil meghatározás folyamatábrája

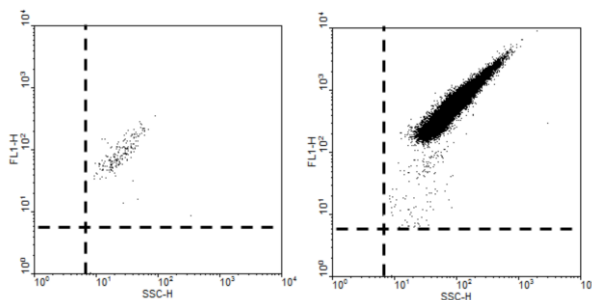
A gold standard mikrodilúció és az újonnan fejlesztett MICy módszer összehasonlító folyamatábrája. Mikrodilúció esetén 24 óra elteltével mikrobiológus szemmel értékeli az lemezt, ezzel szemben a MICy módszer során négy óra inkubációt követően, fixálás és fluoreszcens jelölés után megtörténik a baktériumok számszerűsítése.

AO: acridine orange (saját ábra)

Az áramlási citométerrel való méréseinket mindig a legalacsonyabb áramlási sebesség mellett végeztük, elkerülendő a tömegdetektálás jelenségét, vagyis azt, amikor a lézerfényen egy adott pillanatban egynél több részecske vagy sejt halad át, ami azonban a detektorok számára egy eseményként jelenik meg.

A méréseket mintánként 20 másodpercig végeztük, alacsony áramlási sebesség mellett az áramlási citométert gyártó cég adatai alapján ez körülbelül 5,3 μl mintát jelent.

Mérési eljárásunk első lépéseinek eredményét a 16. ábra mutatja be. Az áramlási citométerrel történő mérés során elsőként ellenőriztük és szükség szerint adjusztáltuk a maximális felnövekedést mutató, antibiotikum mentes oldat vizsgálatával az előre beállított detektálási kaput. Ezt követően meghatároztuk azonos kapuban a baktérium mentes oldat segítségével a háttérzaj értékét és az inkubálást követően befertőzött lyukakból a kiindulási baktériumszámot. A nyers adatok segítségével ellenőriztük, hogy az elvárt, legalább két osztódás, vagyis négyszeres sejtszám változás megtörtént-e. Ha igen, akkor mértük le a mintánkat.



16. ábra A kiindulási baktériumszám és a maximális felnövekedés meghatározása a detektálási kapuban

A bal oldali ábrán látható kiindulási baktériumszámot az inkubálás végén, addig tápanyagmentes oldatban, 4 °C-on tartott törzsoldattal befertőzött, majd azonnal fixált oldatból határoztuk meg. A jobb oldali ábrán látható maximális felnövekedést a lemez készítésekor befertőzött, majd 4 órán keresztül antibiotikummentes tápoldatban inkubált minták segítségével határoztuk meg. (saját ábra)

Miután a különböző antibiotikum koncentrációk melletti baktérium számokat meghatároztuk, ezen adatokból MIC értéket állapítottunk meg. Ennek megvalósítási módját a következő fejezetben tárgyalom.

3.5. Az áramlási citométerrel történő MIC meghatározás empirikus megközelítése

A MICy mérés során minden baktérium esetén a 12-féle, összesen 84 lyuk felezőhígítású antibiotikum koncentráció melletti adat áll rendelkezésre. Ezenfelül ismerjük a kiindulási baktériumszámot és a maximális növekedés számértékeit. Ezen utóbbi kettő arányáról tudjuk, hogy négy felett kell lennie ahhoz, hogy kellően diszkriminatív legyen a mérésünk. A kérdés az, hogy mely számérték mellett mondhatjuk azt, hogy az adott antibiotikum koncentráció gátolta a növekedést.

Erre a kérdésre válaszul a következő empirikus szabályt találtuk:

Ad 1. Küszöbérték a kiindulási baktériumszám abban az esetben, ha

Ad 2. a következő felezőhígításban a baktériumszám meghaladja a kiindulási baktériumszám kétszeresét.

A MIC érték a mikrodilúció esetén a lemezről került leolvasásra mikrobiológus által. Ha egy adott antibiotikum koncentráció mellett a minta zavarossá vált, akkor ott volt baktérium osztódás. A legkisebb koncentráció, mely mellett az adott antibiotikum gátolta baktérium osztódását, definíció szerint megadja a MIC értékét.

A 17. ábra bemutatja a MIC meghatározás lépéseit.

A												
van	cip	lvx	cro	fep	amc	tzp	sxt	cfz	cst	imp	gen	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1

B												
van	cip	lvx	cro	fep	amc	tzp	sxt	cfz	cst	imp	gen	
17206	456	281	266	714	247	449	887	459	639	416	661	
22650	435	190	291	548	302	280	1074	399	881	5202	565	
24045	318	236	311	352	385	326	785	462	1929	13532	794	
24303	622	409	334	285	867	376	987	7433	9158	18121	2191	
26283	610	443	310	337	9336	462	1169	22046	11402	18641	4841	
22406	694	628	209	339	12965	5416	1071	18031	14652	22079	11752	
21598	562	644	327	452	17061	11675	1081	16973	11898	22916	20265	
21869	18015	20263	19551					1170	1094	916	1189	
Maximális növekedés átlaga:				19924,5					A kezdeti baktérium szám átlaga:			
Változás mértéke				18,24					2x kezdeti baktériumszám:			
									2184,5			

17. ábra MIC meghatározás *E. coli* esetén MH táptalajon

Az ábra „A” része mutatja a mikrodilúció eredményét. „0” jelöli azokat a cellákat, ahol a mikrobiológus nem észlelt növekedést, „1” pedig a zavarosodás, osztódás jelzője.

Az ábra „B” részén láthatóak a párhuzamosan indított, 4 órán át inkubált MICy mérés eredményei. A változás mértéke a maximális növekedés és a kezdeti baktérium szám átlagának arányát jelenti, mely példánkban 18,24, így jelentősen meghaladja a diszkriminációhoz szükséges négyszeres változást.

Példaként nézve a gentamicin oszlopát, azt láthatjuk, hogy a 4 felező hígításnál haladja meg a baktérium száma a kiindulási értéket és a következő felező hígításnál mért baktériumszám is jócskán meghaladja a kiindulási baktériumszám kétszeresét. Az antibiotikum kiosztást a 12. ábrán ellenőrizve megállapítható, hogy gentamicin esetén mindkét módszerrel 1 µg/ml a MIC érték. Az ábráról leolvasható az is, hogy imipenem és amoxicillin-klavulánsav esetén észlelhető a két módszer között egy felezőhígításnyi eltérés.

3.6. A módszer módosítása és pontosítása *Staphylococcus aureus* esetén

Az áramlási citométer mérési elve, miszerint a sejtek a hidrodinamikai fókuszálás eredményeként egyesével haladnak át az áramlási cellán és a rendszer fénynyalábján, nem minden esetben valósul meg. Nagyon sejtgazdag szuszpenzió, túl gyors áramlás vagy egymásba kapaszkodó sejtek esetén előfordulhat, hogy az egyszerre áthaladó több sejtet a rendszer egyszeri eseményként regisztrálja az FSC csatornán. Ez a tömegdetektálás jelensége.

Ez jelentős probléma a baktérium számon alapuló MIC meghatározó eljárásunk tekintetében. Különösen, ha figyelembe vesszük, hogy a *Staphylococcus aureus* ismert módon kifejezetten hajlamos „szőlőfürtszerű” alakot felvenni.

Az áramlási citométer szerencsére erre a helyzetre is kínál megoldást. Bár az FSC csatorna az egymáshoz tapadó baktériumokat egyszeri eseményként regisztrálhatja, az SSC csatornán, mely a komplexitásra, granulációra kifejezetten érzékeny, magasabb értéket regisztrálunk. A detektálási kapuba eső események, adott esetben összekapaszkodó *Staphylococcus*ok SSC csatornán felvett hisztogramja ennek megfelelően magasabb értékek felé tolódik el, melyet jól jelez a hisztogram geometrikus átlag értéke (képletesen ez a Gauss eloszlást mutató események medián értékének feleltethető meg).

A probléma megoldására éppen ezért minden mérési pontra egy képletes számot képeztünk az események száma és az adott mérés SSC-n rögzített geometrikus átlagának szorzataként. Minél több esemény minél összetettebb formát (magasabb geometrikus átlagot) mutatva regisztrálható, annál több *Staphylococcus* haladt át az áramlási cellán. Az így képzett számokra alkalmaztuk aztán a 3.5. fejezetben ismertetett szabály módosított formáját:

Ad 1. Küszöbérték a kiindulási kombinált paraméter

(eseményszám x geometrikus átlag) abban az esetben, ha

Ad 2. a következő felezőhígításban mért kombinált paraméter értéke meghaladja a kiindulási kombinált paraméter kétszeresét.

A mérési eredmény reprezentatív mintáját a 18. ábrán mutatom be.

Staphylococcus aureus MH táptalajon

Mikrodilúció	van	cip	lvx	cro	fep	amc	tzp	sxt	cfz	cst	imp	gen
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1
	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1

Események száma	van	cip	lvx	cro	fep	amc	tzp	sxt	cfz	cst	imp	gen
	450	150	465	433	722	422	419	417	343	227	298	320
	362	163	218	390	381	395	516	161	356	285	294	375
	504	120	89	278	290	363	387	141	346	207	106	309
	400	205	49	82	152	246	355	66	346	197	28	322
	480	283	50	46	178	346	418	50	164	217	42	268
	483	313	51	137	153	411	286	95	73	251	64	260
	482	312	299	145	127	132	249	64	61	381	154	405
	586	728	565	649					261	254	227	267

SSC Geometrikus átlag	van	cip	lvx	cro	fep	amc	tzp	sxt	cfz	cst	imp	gen
	176	500	451	265	206	225	229	383	226	877	339	225
	175	568	517	219	202	214	209	315	220	840	413	216
	182	1441	441	250	314	206	220	373	235	881	785	237
	190	1477	437	860	748	204	195	292	261	728	231	219
	335	1039	286	1963	1400	228	223	352	353	672	1351	297
	718	777	688	1435	874	278	248	664	1761	830	1590	497
	695	926	926	1148	672	565	403	744	2508	765	1780	798
	604	740	625	652					140	145	137	149

Események száma x SSC Geometrikus átlaggal	van	cip	lvx	cro	fep	amc	tzp	sxt	cfz	cst	imp	gen
	79200	75000	209715	114745	148732	94950	95951	159711	77518	199079	101022	72000
	63350	92584	112706	85410	76962	84530	107844	50715	78320	239400	121422	81000
	91728	172920	39249	69500	91060	74778	85140	52593	81310	182367	83210	73233
	76000	302785	21413	70520	113696	50184	69225	19272	90306	143416	6468	70518
	160800	294037	14300	90298	249200	78888	93214	17600	57892	145824	56742	79596
	346794	243201	35088	196595	133722	114258	70928	63080	128553	208330	101760	129220
	334990	288912	276874	166460	105647	74580	100347	47616	152988	291465	274120	323190
	353944	538720	353125	423148					104139	101346	90573	106533
Komb. paraméter maximális felnövekedésre:					417234,25	Komb. paraméter kezdeti baktériumra					100647,75	
Változás mértéke					4,145490088	2x a kezdeti kombinált paraméternek					201295,5	

18. ábra *Staphylococcus aureus* esetén módosított szabály szerinti MIC meghatározás MICy-vel

A mérést követően a kiértékeléskor nem csak az események számát vesszük alapul, mert az a szőlőfürtszerű megjelenésre hajlamos *Staphylococcus* esetén nem diszkriminatív, hanem a SSC csatornán az áthaladó sejtek komplexitását alapul véve, geometrikus átlagot képzünk az adott populációra és ennek eseményszámmal történő szorzata alapján határozzuk meg a MIC értékét. A cellákat kitöltő színek jelölik a szabálynak megfelelő mérési pontokat.

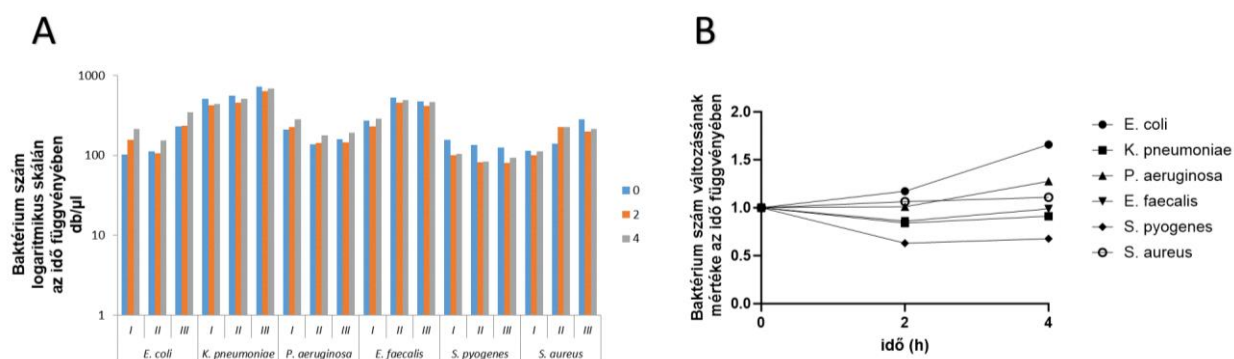
3.7. Statisztikai módszerek

A vizsgálatunk során a statisztikai analízist a GraphPad Prism (GraphPad Software LLC, Boston, USA, (dba Dotmatics)) online verziójával végeztük 2020. január 7-ei eléréssel (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/>), illetve a későbbiekben a GraphPad Prism 10.1.1. asztali verziójával (GraphPad Software LLC, Boston, USA, (dba Dotmatics)). Egyutas, ismételt méréses varianciaanalízissel (one way, repeated measures ANOVA) vizsgáltuk az AO-val jelölt, fixált mintákban a baktériumok számának változását a várakozási idő függvényében. A MICy és a mikrodilúció közötti egyezés vizsgálatára Fleiss' kappa módszert alkalmaztunk az adatokat a „Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test – Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices against reference broth micro-dilution” című ISO/DIS 20776-2 (2007) standardnek megfelelően elemezve.

4. Eredmények

4.1. A fixálás és fluoreszcens jelölés hatása a baktériumok osztódási képességére

A pH 3-ra titrált fixáló oldat a DNS-hez és RNS-hez kötődő fluoreszcens festék hatását antibiotikum mentes tápoldatra oltott baktériumok háromszor ismételt mérésével vizsgáltuk. A klinikailag releváns MH tápoldaton meghatározott eredményeinket a 19. ábrán mutatom be.



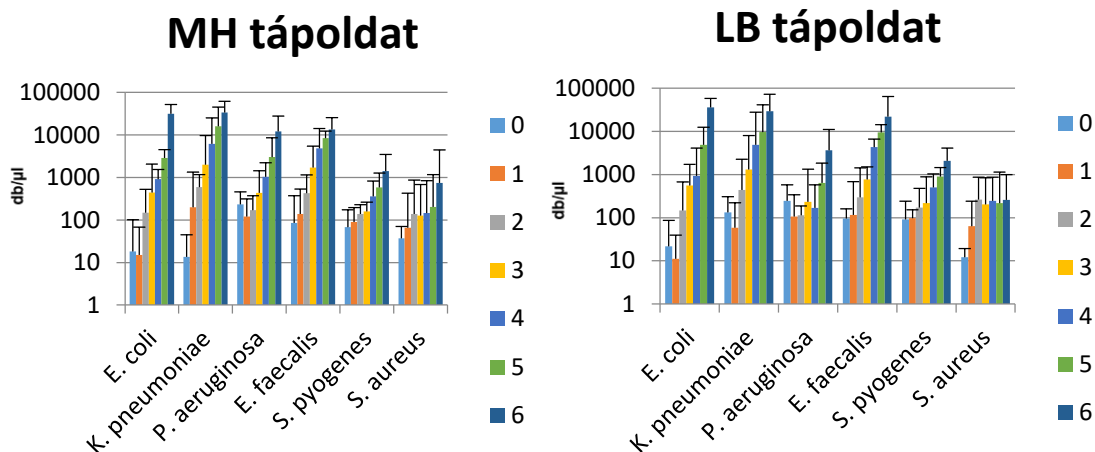
19. ábra A fixálás és fluoreszcens jelölés hatása a baktériumok osztódási képességére MH táptalajon

Az ábra „A” részén az egyes baktériumokat tartalmazó tápoldat fixálását és jelölését követően azonnal elvégzett, majd 2 és 4 óra után megismételt mérési eredményeket láthatjuk. Minden baktériumot háromszor mértünk meg, az egyes mérések eredményeit az ábrán a római számok jelölik. A baktériumok számát logaritmikus skálán jelenítettem meg. Az ábra „B” részén a három mérés átlagértékei változásának mértékét jelenítettem meg.

A fixálás után 2 és 4 órával érdemi változást a baktériumok számában nem látunk, egyedül az *E. coli* tekintetében látható csekély mértékű osztódásnak megfelelő számváltozás. Az adatokat egyutas, ismételt méréses varianciaanalízissel vizsgálva a változások nem szignifikáns mértékűek.

4.2. A baktériumok számának növekedése az inkubációs idő függvényében

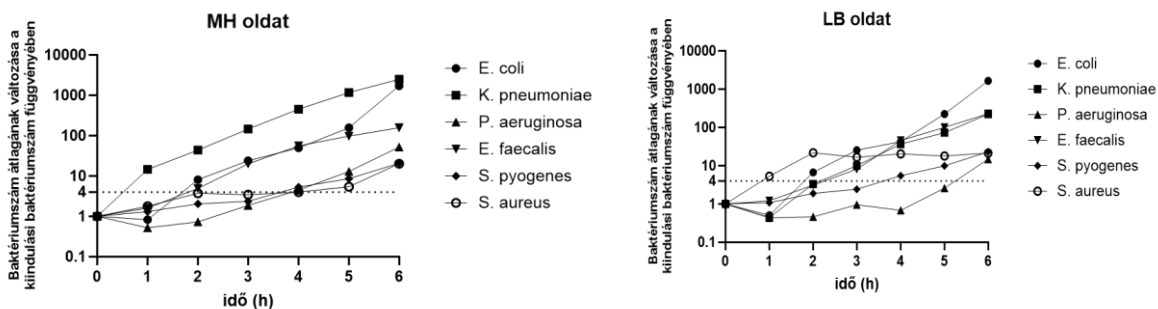
Az antibiotikum mentes táptalajokon végzett óránkénti méréssel, mind MH, mind LB táptalajon hat órán keresztül vizsgáltuk a baktériumok számának változását. A 20. ábrán jelenítettük meg az óránkénti mérések eredményét.



20. ábra A baktériumok számának változása különböző táptalajokon az idő függvényében, óránként áramlási citométerrel meghatározva

Az ábra bal oldalán MH tápoldatban, a jobb oldalán LB tápoldatban ábrázoltuk a baktériumok számának változását óránként mérve, három mérés átlagából és a hibát is jelölve. A baktériumok számát logaritmusos skálán ábrázoltuk. Feltűnő, hogy a *Staphylococcus aureus* számának változása eltér a többi baktériumétól

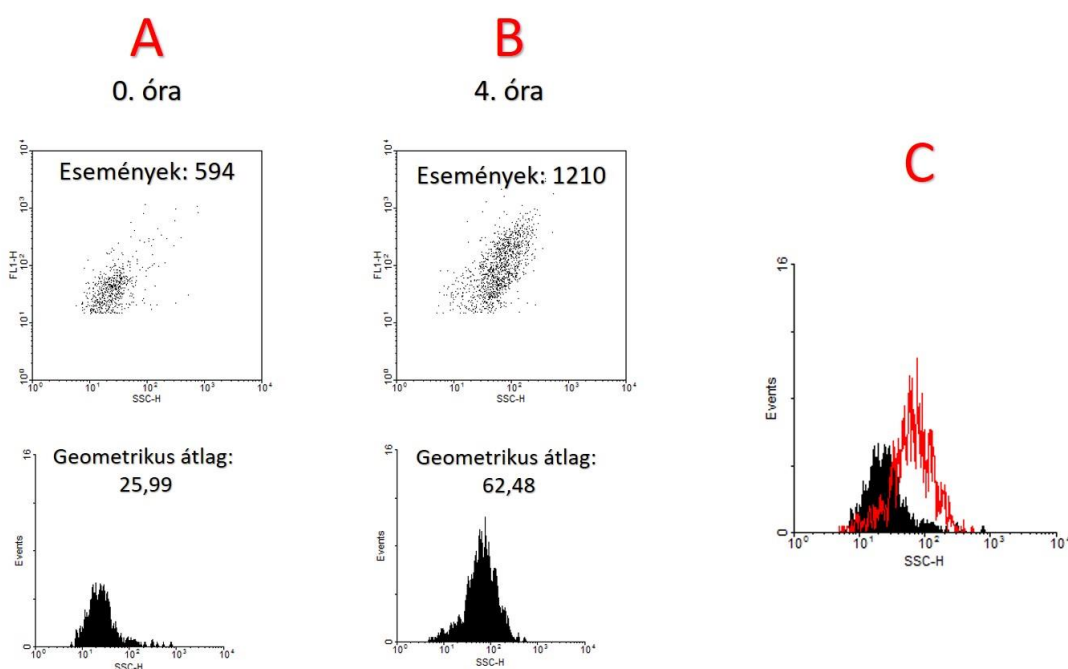
A pilot méréseink alapján megállapítottuk, hogy a módszerünk kellően diszkriminatív voltához legalább két osztódási ciklusra szükség van, vagyis a baktériumok számának négyszeres változása esetén várható, hogy a méréseinket megfelelően tudjuk majd értékelni. Az 21. ábrán jelenítettük meg a kiindulási baktériumszám arányában a változást.



21. ábra A baktériumok számának változása különböző táptalajokon az idő függvényében a kiindulási baktériumszám arányában

A kiindulási baktériumszám arányában ábrázolva azt láthatjuk, hogy a pilot méréseink során megállapított kiindulási baktérium szám négyszeresét (az ábrákon szaggatott vonallal jelölve) minden baktériumot figyelembe véve, 4 órás inkubáció után érik el a baktériumok. Ez alól csak LB oldatban a *Pseudomonas aeruginosa* a kivétel, itt viszont az átlagérték mellett az összes méréseinket tekintve a legnagyobb szórás látható az előző ábrán. Feltűnő, hogy a *Staphylococcus aureus* számának változása eltér a többi baktériumétól

A 21. ábrán feltűnő, hogy a *Staphylococcus aureus* esetén a mért események száma alig változik, alig nő. Ennek kapcsán megvizsgáltuk, hogy a baktériumok számának mérsékelt növekedése mellett az oldalirányú fényszórás, vagyis az SSC csatornán miként változik a mérhető paraméter, mely a mért események összetettségére, granuláltságára utal. A kiindulási és a 4 óra inkubáció után kapott baktérium populációkat jellemző eredményeket a 22. ábra mutatja be.



22. ábra *Staphylococcus aureus* esetén az eseményszám és az SSC csatornán mért geometrikus átlag kiinduláskor és 4 óra inkubációt követően

Az ábra „A” részén a kiinduláskor detektált eseményszám látható az SSC-FL1 dot ploton, illetve alatta az SSC csatornán a detektált eseményekhez tartozó hisztogram, annak geometrikus átlagával.

Az ábra „B” részén a 4 óra inkubációt követően detektált eseményszám látható az SSC-FL1 dot ploton, illetve alatta az SSC csatornán a detektált eseményekhez tartozó hisztogram, annak geometrikus átlagával.

Az ábra „C” részén a kiindulási és 4 óra inkubálás utáni hisztogramok átfedő ábrája látható, mely alapján a hisztogram a nagyobb értékek, azaz magasabb összetettség, granuláltság irányában mozdul el. Ennek hátterében vélhetőleg az összetapadó, összekapaszkodó *Staphylococcus aureus* baktériumok által magasabb arányban oldalra szórt fény állhat. Bár a kiindulási eseményszám alig duplájára változott 4 óra inkubáció után ($1210/594=2,03$), miután a geometrikus átlag változása szintén meghaladja a kétszeres értéket ($62,48/25,99=2,40$), így az ezek összeszorozásával a 3.6. fejezetben leírtaknak megfelelően nyert kombinált paraméter arányában már több mint négyszeresére változik ($2,03 \cdot 2,40=4,88$).

4.3. A mikrodilúcióval és a MICy-vel meghatározott MIC értékek összehasonlítása

Az áramlási citométerrel mért adatokat a 3.5. és 3.6. fejezetben leírt szabálynak megfelelően bináris adattá alakítottuk, hogy megállapítsuk, hogy az adott ponton felnövekedés vagy gátlás történt.

A hat vizsgált baktérium kapcsán tizenkét antibiotikum esetén határoztunk meg hét felező hígítási mérési ponton, hogy történt-e felnövekedés, minden mérést háromszor ismételve, két különböző táptalajon, két különböző módszerrel. Ennek eredményeként összesen 3024, összehasonlításra alkalmas adatpárt kaptunk. Az adatpárok pontról pontra történő egyezésének mértékét Fleiss' kappa analízissel vizsgáltuk. Az analízis eredményét a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat A mikrodilúcióval és a MICy-vel kapott eredmények összehasonlítása pontról pontra

Az összehasonlítás első tagja (a „/” jel előtt) a mikrodilúcióval kapott eredmény, a második tag MICy-vel kapott eredmény. „+” jel esetén felnövekedést tapasztaltuk az adott ponton, „-” jel esetén gátlást.

Táptalaj	Gram szerint	Mérések száma	+/+	-/-	Egyezés %	-/+	+/-	Eltérés %	Fleiss' kappa +/- SE
LB	Gram pozitív	756	234	413	85,60%	103 (13,6%)	6 (0,8%)	14,40%	0,700 +/- 0,026
	Gram negatív	756	394	277	88,80%	36 (4,8%)	49 (6,5%)	11,20%	0,770 +/- 0,024
LB össz	Mind	1512	628	690	87,20%	139 (9,2%)	55 (3,6%)	12,80%	0,744 +/- 0,017
MH	Gram pozitív	756	249	397	85,40%	98 (12,9%)	12 (1,6%)	14,60%	0,701 +/- 0,026
	Gram negatív	756	394	284	89,70%	49 (6,5%)	29 (3,8%)	10,30%	0,789 +/- 0,023
MH össz	Mind	1512	643	681	87,60%	147 (9,7%)	41 (2,7%)	12,40%	0,752 +/- 0,017
Összes	Mind	3024	1271	1371	87,40%	286 (9,6%)	96 (3,2%)	12,60%	0,748 +/- 0,012

A táblázatból kiolvasható, hogy méréseink során 85% feletti egyezést találtunk a mikrodilúció és a MICy módszer között abban a kérdésben, hogy az adott antibiotikum koncentráció mellett felnövekedés vagy gátlás történt-e. A Fleiss' kappa analízis eredményét Landis és Koch szerint értékelve, minden, általunk felállított kategóriában erős összefüggés (kappa értéke: 0,6-0,8 közötti) mutatható ki a két módszer eredménye között. ⁽⁷¹⁾

Ezt követően a MIC meghatározás a definíciójának megfelelően történt: az a legalacsonyabb antibiotikum koncentráció, mely gátolja a baktérium felnövekedését.

A hat vizsgált baktérium kapcsán tizenkét antibiotikum esetén határoztunk meg MIC értéket, minden mérést háromszor ismételve, két különböző táptalajon, két különböző módszerrel. Ennek eredményeként összesen táptalajonként 216, összehasonlításra alkalmas MIC adatpárt kaptunk. Ezeket az adatpárokat aszerint elemeztük, hogy hány felező hígításnyi eltérést mutatnak. Az eredmények összefoglaló értékelését az 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat A két módszerrel megállapított MIC értékek felező hígítás szerint vizsgált eltérésének összefoglaló táblázata tápoldatonként

LB

	A MIC érték a mikrodilúció esetén magasabb							Egyezés	A MIC érték a MICy esetén magasabb						
Eltérés mértéke (felezőhígítás)	7	6	5	4	3	2	1	0	1	2	3	4	5	6	7
Eltérés összesen (darabszám)	0	0	0	1	6	5	23	110	34	20	7	8	1	1	0
Eltérés összesen (százalék)	0	0	0	0,5	2,8	2,3	10,6	50,90%	15,7	9,3	3,2	3,7	0,5	0,5	0
								77,20%							

MH

	A MIC érték a mikrodilúció esetén magasabb							Egyezés	A MIC érték a MICy esetén magasabb						
Eltérés mértéke (felezőhígítás)	7	6	5	4	3	2	1	0	1	2	3	4	5	6	7
Eltérés összesen (darabszám)	0	0	1	1	4	9	19	118	36	15	3	5	1	2	2
Eltérés összesen (százalék)	0	0	0,5	0,5	1,8	4,2	8,8	54,60%	16,6	6,9	1,4	2,3	0,5	1	1
								80,10%							

LB tápoldatban az esetek 50,9%-ában teljes egyezést találtunk és 77,2%-ában maximum egy felezőhígításnyi eltérést. MH tápoldatban teljes egyezést 54,6%-ban találtunk, maximum egy felezőhígításnyi eltérést pedig az esetek 80,1%-ában.

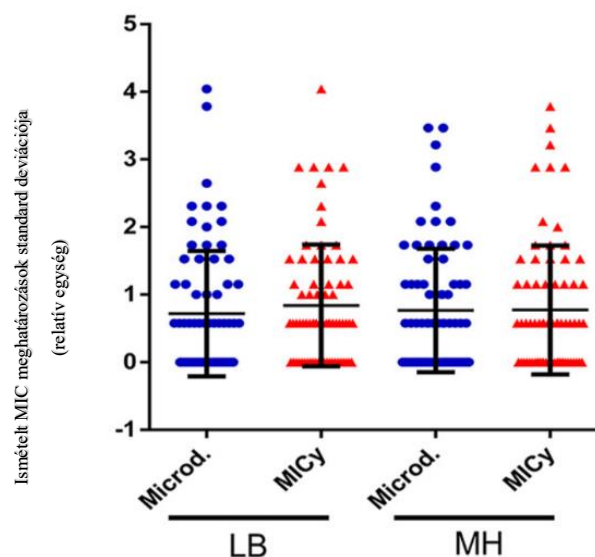
Adatainkat a ISO/DIS 20776-2 (2007) standardnek megfelelően is elemeztük.⁽⁷²⁾ Az alapvető egyezés (essential agreement - EA) (MIC adatpár +/- 1 felezőhígításnyi eltérést mutat) MH esetén 80,1%-nak adódott és a súlyozott kappa érték is erős összefüggést mutatott. Elvégeztük a standard szerinti eltérés feloldására szolgáló (discrepancy resolution) tesztet is az EA valódi értékének megállapítás céljából. Ez alapján MH táptalajon Gram negatív baktériumok esetén az EA 94%, Gram pozitív baktériumok

esetén 83%, míg az összesített érték közel 89%-nak adódott. Az adatok elemzését az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat A két módszer által meghatározott MIC értékek összehasonlítása az ISO/DIS 20776-2:2007 szerint

Táptalaj	Gram szerint	Mérések száma	Essential agreement - EA (%)	Eltérés feloldása (Discrepancy resolution testing) - EA (%)	Súlyozott Fleiss' kapp
LB	Gram pozitív	108	88 (81,5%)	69,40%	0,66
	Gram negatív	108	79 (73,1%)	86,10%	0,731
LB össz	Mind	216	167 (77,3%)	77,80%	0,706
MH	Gram pozitív	108	83 (76,9%)	83,30%	0,662
	Gram negatív	108	90 (83,3%)	94,40%	0,76
MH össz	Mind	216	173 (80,1%)	88,90%	0,72
Összes	Mind	432	340 (78,7%)	83,30%	0,714

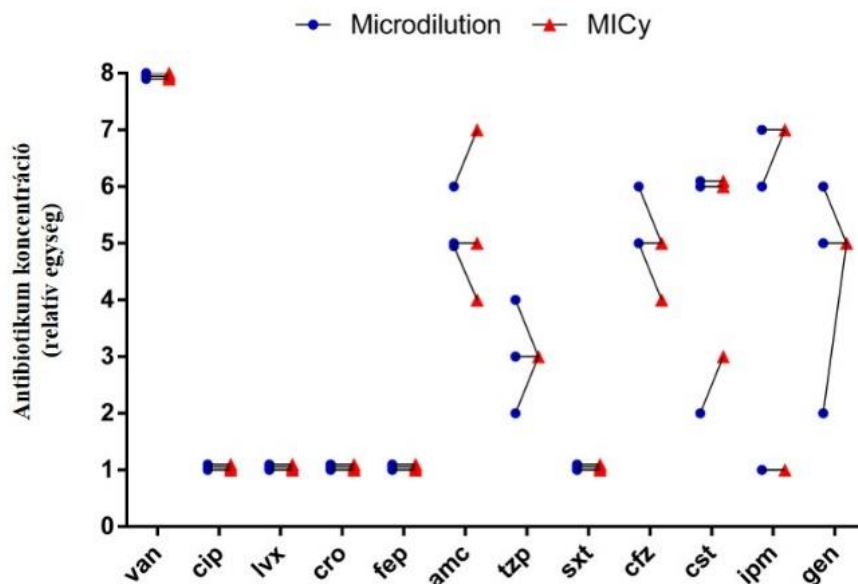
A standard szerint elemeztük a bias értékét is: a MICY 39,9%-ban mért magasabb MIC értéket és 22,7%-ban alacsonyabbat, a kettő különbségeként a bias 17,2%-nak adódott.⁽⁷²⁾ Megvizsgáltuk a MICy reprodukálhatóságát is összehasonlítva a mikrodilúcióval. Ennek vizsgálatára minden antibiotikum tekintetében a háromszor ismételt mérés relatív MIC értékének standard deviációját képezve, annak eloszlását vettük alapul. Relatív MIC érték alatt az antibiotikum kiosztás táblázat sorának számát értjük, ahol MIC értéket találtuk. A standard deviációk eloszlása a 23. ábrán látható.



23. ábra Reprodukálhatóság összehasonlítása a két módszer között két különböző táptalajon

Az ábra y tengelyén lévő relatív értékek az adott módszerrel végzett, ismételt mérések között fellépő standard deviáció mértékét mutatja, ahol a „1” érték egy felezőhígításnyi eltérésnek felel meg. A két módszer között nincs reprodukálhatóság tekintetében érdemi eltérés.

24. ábrán a módszerek természetes szórását mutatjuk be MH táptalajon háromszor ismételt *E. coli* mérések segítségével, ismét csak relatív MIC értékeket ábrázolva.



24. ábra Az ismételt mérések során nyert MIC értékek összehasonlítása MH táptalajon *E. coli* esetén

A vörös háromszögek jelölik a MICy-vel, kék pontok pedig a mikrodilúcióval meghatározott MIC értékeket. Az azonos mérésből származó összetartozó értékeket fekete vonal köti össze. Az y tengelyen az antibiotikumok felező hígításának relatív értékei vannak: az „1” érték felel meg annak, ha az adott antibiotikum legalacsonyabb értéke is gátlást mutatott, a „8” érték pedig annak, ha a legmagasabb antibiotikum koncentráció mellett is növekedést tapasztaltunk. Látható, hogy az azonos baktériummal végzett kísérletek ellenére mindkét módszer mutat szórást, akár több felezőhígításnyi eltéréssel, mint például a mikrodilúció gentamicin esetén.

Antibiotikumok: van: vancomycin, cip: ciprofloxacin, lvx: levofloxacin, cro: ceftriaxon, fep: cefepim, amc: amoxicillin-klavulánsav, tzp: piperacillin-tazobactam, stx: trimethoprim-sulfamethoxazole, cfz: cefazolin, cst: colistin, ipm: imipenem, gen: gentamicin

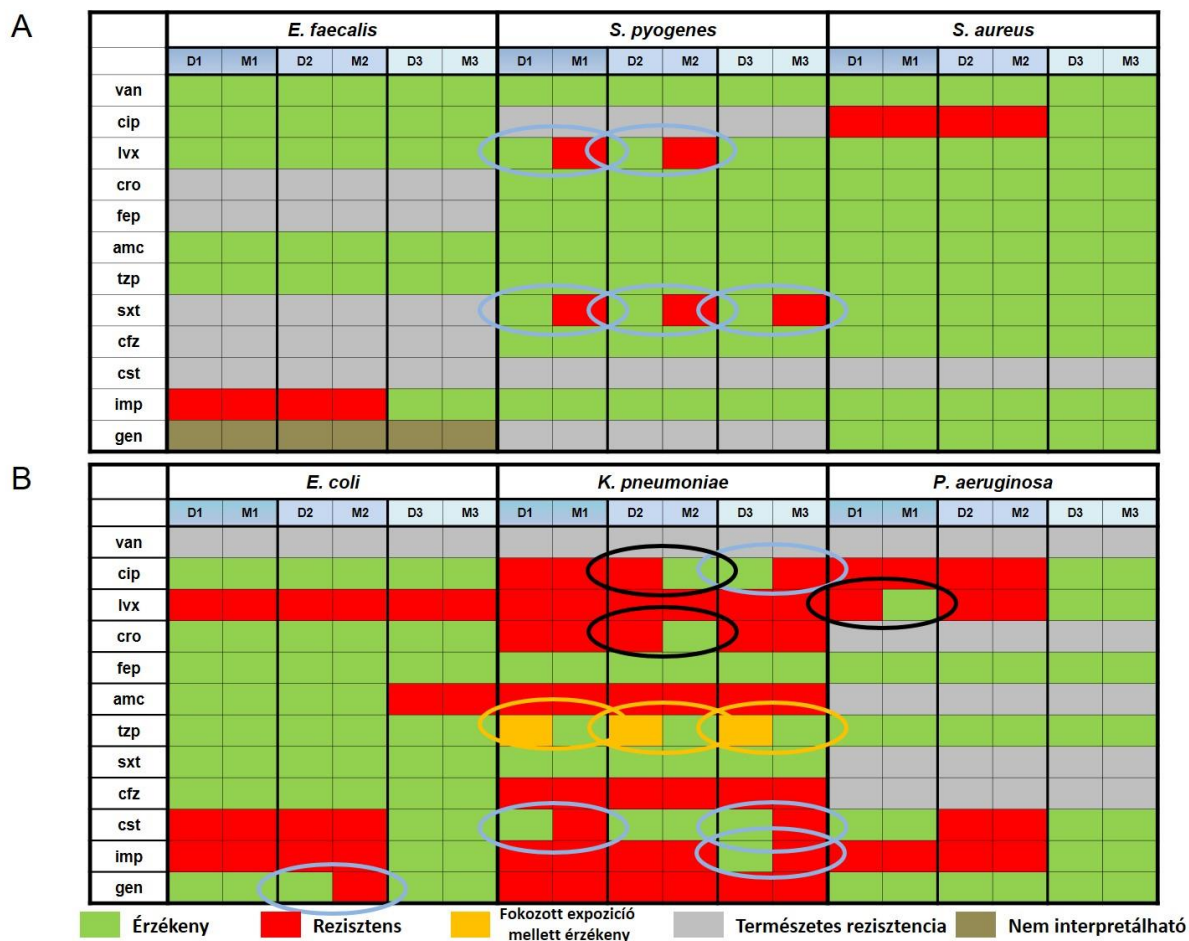
4.4. A két módszerrel kapott érzékenységi profilok összevetése

A módszerek összehasonlítása céljából a meghatározott MIC értékek alapján kapott érzékenységi profilokat is összehasonlítottuk. Az érzékenységi profil megállapításához az EUCAST adatbázisban szereplő, méréseink során érvényes, 2019-es Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters 9.0 verziójának MIC referencia határértékeit vettük alapul. ⁽⁷³⁾ Ha a mért MIC érték a szenzitivitás töréspont értékkel egyenlő vagy annál alacsonyabb, akkor érzékenynek, ha pedig a rezisztencia határértéknél magasabb, rezisztensnek tekintjük a baktériumot. Némely antibiotikum-mikróba viszonylatban előfordul, hogy a szenzitivitás és rezisztencia határérték nem azonos. Ebben az esetben a köztes intervallumba eső MIC érték esetén „fokozott expozíció mellett érzékeny” kategória állapítandó meg.

Az EUCAST ajánlás MIC meghatározásra MH táptalaj alkalmazását javasolja, így az érzékenységi profil összehasonlításokat csak MH táptalajon nyert adatokkal végeztük el. Az eredményeket összefoglalóan a 25. ábra tartalmazza. Nem interpretálható antibiotikum-mikróba kombináció (*Enterococcus faecalis* és gentamicin) esetén nem végeztük el az összevetést.

A két módszerrel meghatározott rezisztencia profilok összevetése során 92,5%-ban egyezést találtunk. Két AST összevetésekor három féle hibát tapasztalhatunk. Minor hibának nevezzük, ha a referencia módszerrel mérsékelt érzékenységet, a vizsgált módszerrel pedig érzékenységet találunk. Súlyos hiba, ha az új módszer rezisztenciát állapít meg, míg a referencia módszer érzékenységet. Nagyon súlyos hiba, ha a vizsgálati módszer érzékenynek találja a baktériumot egy adott antibiotikumra, míg a referencia módszer rezisztensnek. Ebben az utóbbi esetben egy fals antibiotikum választás akár veszélyes is lehet egy súlyos állapotú, intenzíven kezelt beteg számára.

A minor, súlyos és nagyon súlyos eltérések gyakoriságának elemzésére ismét az ISO/DIS 20776-2 (2007) standardet vettük alapul. Az elemzés eredményét a 6. táblázat tartalmazza.



25. ábra A mikrodilúcióval és a MICy-vel meghatározott érzékenységi profilok összehasonlítása

Nem interpretálható antibiotikum-mikróba kombináció esetén nem végeztük el az összevetést. Az ellipszisek a diszkrétan emelik ki. Narancssárgával jelöltük a minor hibát (minor discrepancy, referencia módszer szerint fokozott expozíció mellett érzékeny, vizsgált módszer szerint érzékeny), kézzel a súlyos hibát (major discrepancy, referencia módszer érzékenységet, a vizsgált rezisztenciát határoz meg) és feketével a nagyon súlyos hibát (very major discrepancy, a referencia módszer rezisztens, a vizsgált módszer érzékenységet állapít meg).

Jelmagyarázat: D: Mikrodilúció M: MICy, az arab számok az ismételt méréseket jelölik. A kitöltő színek magyarázatát lásd az ábra alatt.

Antibiotikumok: van: vancomycin, cip: ciprofloxacín, lvx: levofloxacín, cro: ceftriaxon, fep: cefepim, amc: amoxicillin-klavulánsav, tzp: piperacillin-tazobactam, stx: trimetoprim-sulfamethoxazole, cfz: cefazolin, cst: colistin, imp: imipenem, gen: gentamicin

Kállai és munkatársai MICy: a Novel Flow Cytometric Method for Rapid Determination of Minimal Inhibitory Concentration című cikke alapján, az eredeti ábrát módosítva (CC BY 4. DEED).⁽⁷⁴⁾

6. táblázat A mikrodilúcióval és a MICy-vel meghatározott érzékenységi profilok összehasonlító elemzése

„R” rezisztenciát, „S” érzékenységet jelent. A minor, súlyos és nagyon súlyos eltérések arányát az ISO/DIS 20776-2 (2007) standard szerint kalkuláltuk.

Gram szerint	Mérések száma	R/R	S/S	Egyezés %	Minor eltérés	Súlyos eltérés	Nagyon súlyos eltérés	Fleiss' kappa +/- SE
Gram pozitív	105	40	60	95,20%	0 (0%)	5 (7,7%)	0 (0%)	0,865 +/- 0,049
Gram negatív	108	52	45	89,80%	3 (2,8%)	5 (10%)	3 (5,5%)	0,795 +/- 0,058
Mind	213	92	105	92,50%	3 (1,4%)	10 (8,7%)	3 (3,2%)	0,849 +/- 0,036

A Fleiss'kappa analízis 0,849 kappa értékét Landis és Koch szerint értékelve, „majdnem tökéletes” egyezés (kappa érték: 0,8-1 között) van a két módszer döntéshozatala között.⁽⁷¹⁾ Megjegyzendő azonban, hogy a nemzetközi standard által az új módszertől elvárt 3% alatti súlyos és nagyon súlyos eltérési gyakoriságot súlyos eltérések tekintetében jelentősen (8,7%) és nagyon súlyos eltérések tekintetében enyhén (3,2%) meghaladtuk.

5. Megbeszélés

Az értekezésben egy új, MIC meghatározáson alapuló, áramlási citométer segítségével végzett antibiotikum érzékenységi vizsgálatot ismertetek, mely biztató eredményeket mutat a hagyományos mikrodilúciós módszerrel meghatározott rezisztencia profillal való egyezés tekintetében, miközben lényegesen gyorsabban ad eredményt.

5.1. Antibiotikum rezisztencia meghatározás áramlási citométerrel

Az áramlási citométer, mint nagy áteresztőképességű, igen pontos, sejt-szintű vizsgáló eljárás, az elmúlt évtizedekben számos kutatási és klinikai területen, az élettan mellett az immunológiában, hematológiában és az onkológiában is széles körben alkalmazott eszközzé vált. Több alkalommal is felmerült alkalmazása a mikrobiológia területén is, elsősorban a baktériumok antibiotikum érzékenységi profiljának meghatározása kapcsán. A fluoreszcens festékek és az antitest alapú vizsgálatok párhuzamos fejlődésével többféle AST módszert leírtak már, melyek jellemzően az antibiotikum kiváltotta károsodást, életképességet vagy sejtpusztulást vizsgálták. Ezek jellemzően a hagyományos módszereknél lényegesen rövidebb időn belül adtak kvalitatív eredményt.

Az 1.3.3. fejezetben bemutattam Nuding és Zabel 2013-ban megjelent publikációja nyomán áramlási citométerrel végzett antibiotikum érzékenységi vizsgálatuk eredményét. A tanulmány szerzői külön kiemelik, hogy módszerük nem tesz különbséget a klasszikus mikrodilúció által némely antibiotikum/baktérium viszonylatában definiált szenzitív és intermedier érzékenység (2019 óta használt nomenklátúra szerint fokozott expozíció mellett érzékeny) tekintetében. Felvetik, hogy további kutatások eredményeként esetleg megfogalmazható lesz, hogy mérsékelt érzékenységről beszéljünk, ha a baktériumok 10-20%-a pusztul csak el magasabb antibiotikum koncentráció mellett is. Hasonlóan megfogalmazható azonban a kérdés, hogy ha a sejtek harmada, fele vagy háromnegyede pusztul el egy adott antibiotikum koncentráció mellett, fluoreszcenciával igazolható módon, akkor vajon hova helyezzük a küszöbértéket, ami felett már antibiotikum okozta gátlást feltételezünk? Erre a vizsgálat egyértelmű választ nem ad. ⁽⁵⁹⁾

Más vizsgálatok nem csak életképességet határoztak meg áramlási citométerrel, de sérült baktérium populációt is azonosítottak többféle fluoreszcens festék egyszerre történő alkalmazásával. ⁽⁶³⁾

Ennek ellenére az áramlási citométer nem tudott átütő eredményt felmutatni és elterjedni

a mikrobiológiai diagnosztikában.

Ennek számos oka lehet, szakmai és gazdasági egyaránt. Egyrészt az élettan és laboratóriumi medicina felől induló új eljárások, melyek a baktériumok életképességét vizsgálták, nem honosodtak meg a mikrobiológiában. Mindazonáltal, amikor a klinikai mikrobiológus MIC értéket határoz meg egy mikrodilúciós lemezt vizsgálva, akkor az egyes lyukakban megjelenő zavarosodás hátterében nem tudja, hogy a felnövekvő baktérium populáció hány százaléka él még a vizsgálat pillanatában. Továbbá kérdésként merül fel az is, hogy ha az antibiotikummal együtt inkubált baktériumnál életképességet vizsgálunk áramlási citométerrel, hány százalékos pusztulási aránynál mondhatjuk, hogy a baktérium teljes populációja érzékeny az adott szerre. Ha egy heterogén baktériumpopulációból indulunk ki, akkor adott esetben a kis százalékban jelen lévő, rezisztenciára hajlamos, képességet mutató populáció szelekciójához időre van szükség. Lassabban érik el az érzékeny populáció pusztulása mellett a tovább élő, osztódó baktériumok a detektálási határt. Ez az elvi megfontolás figyelmeztet minket arra, hogy sem a felnövekedésen alapuló módszerek, sem az életképességet vizsgáló módszerek nem rövidíthetők a végtelenségig, mert a hibás mérések aránya is növekedni fog, különösen klinikai minták vizsgálata esetében. Másrészt gazdasági megfontolások is hátráltathatták az áramlási citométeren alapuló módszerek elterjedését. A korábbi vizsgálatokban életképesség, sejtpusztulás vizsgálatára alkalmazott fluoreszcens festékek ára jelenleg is kifejezetten magas, különösen, ha a módszer valamely specifikus antitesthez kötött festéket igényel. A klinikai gyakorlatban olyan eljárásra van szükség, amely megfizethető, racionális költségnövekedést jelent a hagyományos módszerekhez képest, miközben a korai eredmény a beteg és az őt ellátó egészségügyi ellátórendszer számára előnyt jelent. Gyorsabb mikrobiológiai eredmények esetén statisztikailag ugyan nem szignifikánsan, de javuló mortalitást, szignifikánsan rövidebb kórházi tartózkodást és egyértelmű költségcsökkenést igazolt Barenfanger, Drake és Kacich vizsgálata már 1999-ben.⁽⁷⁵⁾ Mindezen megfontolások mentén állítottuk össze új, áramlási citométerrel történő antibiotikum érzékenységi vizsgálatunk protokollját. Egyrészt a célunk egy olyan, fenotípusos vizsgáló eljárás volt, melynek eredményeként MIC értéket tudunk meghatározni lényegesen gyorsabban, mint a hagyományos mikrobiológiai diagnosztika, másrészt a költségeket is igyekeztünk racionális szinten tartani.

5.2. Az áramlási citométer detektálási képességének maximalizálása

Irodalmi adatok alapján a konvencionális áramlási citométerekkel a 200 és 300 nm közötti átmérővel bíró polisztién gyöngyök már detektálhatóak.⁽⁷⁶⁾ Mindemellett az áramlási citométer detektálási képessége nem pusztán a méretfüggő, hanem a partikulumok refraktív indexe is befolyásolja. Egy adott anyag refraktív indexe definíció szerint a lézer fény haladási sebességének aránya vákumban és az adott anyagban. Baktériumok esetén a refraktív indexüket számos körülmény befolyásolja, többek között a környezetük tápanyaggazdagsága. Emellett a sejtek exponenciális osztódás szakában is más metabolikus stádiumban vannak, mely szintén befolyásolja a refraktív indexüket.⁽⁷⁷⁾

A mindezekből adódó bizonytalansági tényezők kiküszöbölése céljából döntöttünk fluoreszcens festék alkalmazása mellett. Részben gazdasági, részben szakmai megfontolásból esett választásunk az acridine orange festékre, mely nukleinsav kötődésén keresztül jelöli az élő és a halott baktériumokat is.⁽⁷⁸⁾ Így javíthatja az áramlási citométer alsó detektálási mérettartományában a DNS tartalmú partikulumok, azaz a baktériumok észlelését. Emellett az AO a többi, AST meghatározáshoz használt fluoreszcens festékhez képest kifejezetten olcsó, összehasonlításként a 7. táblázatban feltüntettünk reprezentatív adatokat a festékek áráról. Egy mérési pontra jutó 500 µl fixáló oldat 1 µg AO-t tartalmaz, így a fluoreszcens festék használata mérési pontonként, 2023. decemberi árakon számolva 0,0463 Ft költségnövekedést jelent.

7. táblázat AST eljárásokban használt fluoreszcens festékek árának összehasonlítása

Az árak a www.sigmaaldrich.com honlapról származó adatok (2023.12.14.)

Fluoreszcens festék	ár (HUF/ 1g)
Acridine orange	46.300
Propidium iodide	469.000
Rhodamin-123	2.420.000
DiBAC ₄ (3)	5.560.000

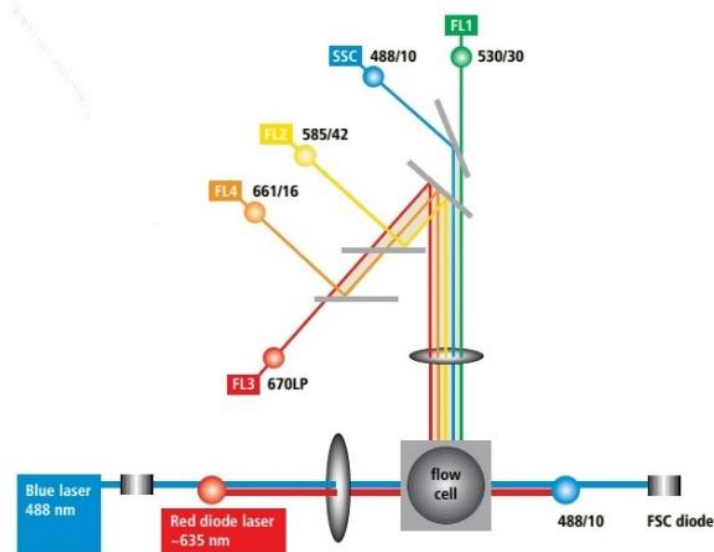
Az inkubálás végeztével egy lépésben elvégezhető a minta fixálása és az AO-val végzett fluoreszcens jelölés. Vizsgálatunkban ellenőriztük a 3-as pH-val bíró, AO tartalmú oldatunk hatását a baktérium populáció osztódási képességére. Megállapítottuk, hogy a fixálást követően 2 és 4 órával később ismét ellenőrizve a mintákat, érdemi osztódásra

már nem képesek a baktériumok, ahogy az a 4.1. fejezetben bemutatásra került és a 19. ábráról leolvasható. Fixálás után 2 és 4 órával érdemi változást a baktériumok számában nem látunk, egyedül az *E. coli* tekintetében látható csekély mértékű osztódásnak megfelelő számváltozás. Érdekes azonban ennek mértékét összevetni az 4.2. fejezetben, az optimális inkubációs idő meghatározása érdekében szintén antibiotikummentes tápoldaton inkubált, óránként mért *E. coli* populáció átlagos változásával, melyet a 21. ábrán találunk. Ez alapján a fixálás utáni csekély, 1,65-szörös változás egy közel 50-szeres változással állítható párba, mely utóbbira képes lenne méréseink alapján az *E. coli* 4 óra alatt antibiotikummentes MH táptalajon.

További előnye az osztódási képesség elvesztésének, hogy csökkenti az esélyét, hogy az áramlási citométert kontamináljuk egy – akár polirezisztens – kórokozóval. Ezt elkerülendő egyébiránt minden mérés után alkalmaztuk a gyártó ajánlása szerinti fertőtlenítési eljárást is. A laboratórium munkatársai méréseink után több alkalommal végeztek szűrőtenyésztést is, melyek rendre negatív eredménnyel zárultak.

5.3. Az áramlási citométer felépítése

Az általunk használt BD FACSCalibur™ áramlási citométer összetett optikai rendszerre, melyet a 26. ábra mutat be, lényegesen többre képes, mint amit MICy módszer igényel. Mindebből méréseink során az FSC, SSC és 1-es számú fluoreszcens (FL1) csatornákat használtuk. Ennek megfelelően, amennyiben a MICy céljára új áramlási citométer megalkotása merülne fel, annak optikai rendszere egyszerűbb és ilyen módon olcsóbb is lehetne. Az elmúlt évek áramlási citométer fejlesztései ezzel ellentétes vonalon, minél több lézer és több fluoreszcens csatorna irányába történtek.



26. ábra BD FACSCalibur™ optikai rendszerének sematikus ábrája

Az FSC és SSC csatorna mellett a készülék dikroikus tükrök és sávszűrők segítségével, 4 különböző fluoreszcens csatorna alkalmazásával, különböző színtartományokba eső hullámhosszokon képes detektálni.

A BD engedélyével a BD FACSCalibur™ brosúrájából átvett ábra.

5.4. Megfontolások az optimális inkubációs időt illetően

A gyorsabb AST eljárások klinikai haszna széles körben kutatott és mind szakmai, mind gazdasági érvek szólnak mellette ^(75, 79-81), másrésztől azonban a túlzottan lerövidített inkubációs periódus téves érzékenységi profilhoz és ezáltal hibás klinikai döntéshez vezethet. Korábbi áramlási citométeren alapuló eljárások akár 90 perc utáni eredménnyel bíztattak. A kellő inkubációs idő meghatározásához a saját protokollunk szerint antibiotikum mentes táptalajon vizsgáltuk óránként a baktériumok számának változását. Azt találtuk, hogy a vizsgált 6 laboratóriumi baktériumtörzs esetén legalább négy óras inkubációs idő kell ahhoz, hogy a baktériumok száma négyszeresére növekedjen.

Az áramlási citométerrel történő mérés során a 3.4. és 3.6. fejezetekben említetteknek megfelelően reális veszély a tömegdetektálás. Tekintve, hogy az áramlási citométereket alapvetően eukarióta sejtek vizsgálatára optimalizálták, a sokkal kisebb baktériumok esetén a tömegdetektálás veszélye még nagyobb. Az optimális méréshez épp ezért sejtekben nem túl gazdag oldatra van szükségünk. Az *Escherichia coli* és *Klebsiella*

pneumoniae esetében 6 óra alatt MH táptalajon észlelt több mint ezerszeres növekedés alapján gyorsan osztódó baktériumokat vélhetőleg nem érdemes 5 óránál tovább, a lassabban növekvőket pedig nem érdemes 4 óránál rövidebb ideig inkubálni. Mindezek alapján méréseinkhez a 4 órás inkubációs időt választottuk. Igaz ugyan, hogy ezen idő alatt LB táptalajon a *Pseudomonas aeruginosa* esetén nem láttunk kellő arányú növekedést, azonban adatainkat három mérés átlagából kaptuk és pont a négy órás mérésnél mutatták a nyers adatok a legnagyobb szórást. Magas szórás hátterében felmerülhet, hogy mérési hiba eredményezte ezt a kiugró értéket, bár a korábbiakban említett Filbrun tanulmány szintén *Pseudomonas aeruginosa* esetében talált négy óra inkubáció alatt nem kielégítő növekedést. ⁽⁶⁴⁾

Emellett feltűnő, hogy a *Staphylococcus aureus* számának változása eltérést mutat mindkét táptalajon a többi baktériumnál látott mintázathoz képest. Úgy tűnik, mintha az idő előrehaladtával nem változna érdemben a baktériumok száma. Ez azonban csak látszólagos, az eltérés hátterében a *Staphylococcus* azon tulajdonsága áll, hogy hajlamosak osztódás után is szőlőfürtszerűen összeállni. Ekképpen az alig változó számok hátterében ismét csak a tömegdetektálás jelensége állhat. Ennek a problémának a megoldására vezettük be a 3.6. fejezetben részletezett, módosított protokollt. Ennek során az SSC csatornán, mely a partikulumok összetettségére, granuláltságára érzékeny, nem csupán az események számát mérjük meg, ha a geometrikus átlag változását is. Ha több baktérium összetapadva halad át a lézerfényen, akkor ez az esemény az SSC csatornán jobbra tolódva jelenik meg. Miközben a mért események száma *Staphylococcus aureus* esetén kevésbé változott, populáció szinten a geometrikus átlag növekedését észleltük. Ez a felismerés vezetett oda, hogy erre a fenoménre reagálva, az események és a geometrikus átlag szorzataként adódó kombinált paramétert vegyük alapul.

5.5. Megfontolások az alkalmazott antibiotikumok kapcsán

Az antibiotikum kiosztásunkat 3.3. fejezetben, a 14. ábra mutatja be. Az egyes antibiotikumok tekintetében a kiindulási koncentrációkat mikrobiológussal egyeztetve állítottuk össze, annak érdekében, hogy a várható MIC értékek az alkalmazott hétszeri, felező hígítással lefedett tartományban legyenek. MIC meghatározáshoz az EUCAST ajánlása általában 12 különböző koncentráció vizsgálatát javasolja, azonban megengedi 5-8 koncentráció alkalmazását is, amennyiben az lefedi a terápiás tartományt és az adott

antibiotikum kórokozó függő MIC értékét is magában foglalja. ⁽¹⁵⁾

Jelen vizsgálatunk során minden baktériumot ugyanazzal az antibiotikum kiosztással vizsgáltunk, függetlenül attól, hogy egyes vizsgált baktériumaink bizonyos antibiotikumokra genetikus rezisztenciával bírnak. Meglátásunk szerint kontroll eredményként azt is vizsgálnunk érdemes, hogy ezen baktérium-antibiotikum kombinációk azonos eredményt adnak a kontrollként végzett mikrodilúciós technikával. A természetes rezisztenciával jellemezhető baktérium-antibiotikum kombinációkat, mint például a Gram negatív baktériumok és a vancomycin, a MIC értékekből adódó rezisztencia profil összehasonlításakor figyelmen kívül hagytuk.

A 12-féle antibiotikum mindegyike baktericid hatással bír, beleértve a timidin szintézishez szükséges folsav előállításának két lépését is blokkoló sulfomethoxazole-trimethoptim kombinációt is. ⁽⁸²⁾

5.6. A mikrodilúció és MICy módszer összehasonlítása

Az új eljárásunkat megbízhatóság és reprodukálhatóság tekintetében is összehasonlítottuk a gold standard mikrodilúcióval és azt találtuk, hogy nincs szignifikáns különbség a reprodukálhatóság szempontjából. A pontról-pontra végzett összehasonlítás során 87%-os egyezést találtunk a mikrodilúció és a MICy egyes adatpontokról szóló döntését tekintve (lásd a 3. táblázatot). A kalkulált MIC értékek tekintetében az alapvető egyezés (essential agreement – EA), vagyis a maximum 1 felezőhígításnyi eltérés, MH táptalajon 80%-os eredményt adott. Az ISO/DIS 20776-2:2007 standard szerint elvégzett, eltérés feloldására szolgáló tesztelés után az EA érték 88,9%-nak adódott. A kalkulált bias értéke 17,2 volt.

A MIC értékek alapján az EUCAST 2019-ben érvényes irányelve szerint meghatároztuk a rezisztencia profilt. 2019-ben az Enterobacteralesok és a piperacillin-tazobactam viszonylatában még szerepelt fokozott expozíció mellett érzékeny kategória. Az akkor érvényes irányelv szerint az adott baktériumot szenzitívnek 8 mg/l vagy az alatti, rezisztensnek 16 mg feletti MIC értéknél tekintettük, így pontosan 16 mg/l érték esetén fokozott expozíció mellett érzékenynek interpretáltuk. 2021-re, a cikkünk megjelenésének időpontjára, a fokozott expozíció mellett érzékeny kategória már eltűnt az akkor érvényes adatbázisból. A 16 mg/l érték azonban piperacillin-tazobactam tekintetében továbbra is az Area of Technical Uncertainty (ATU) kategóriában szerepel

Enterobacterales esetén.⁽⁷³⁾ Tekintve azt is, hogy az eredeti közleményünk a mai ajánlás terminológia szerint „fokozott expozíció mellett érzékeny” kategória helyett az ezzel egyenértékű mérsékelt érzékeny kategóriával jelent meg, a doktori értekezés írásakor nem változtattam az eredeti értékelésünkön.

A MIC értékek alapján, az EUCAST eljárásrendje szerint meghatározott érzékenységi profilok összehasonlításakor 8,7% súlyos és 3,2% nagyon súlyos eltérést találtunk. Mindezek alapján tesztünk még nem minden pontban éri el a nemzetközi szabvány által megkövetelt értékeket ($EA \geq 90\%$, $bias \leq \pm 30\%$, súlyos és nagyon súlyos eltérés $\leq 3\%$), de biztató eredményt jelent további vizsgálatok tervezéséhez.

5.7. A vizsgálatunk limitációi

Vizsgálatunk egyik limitációját jelenti, hogy csak laboratóriumi törzseket vizsgáltunk. Felmerül, hogy egyes klinikai baktériumok lassabb növekedést mutathatnak, így előfordulhat, hogy klinikai minták, egyes specíesek esetén hosszabb inkubációs időre lesz szükség.

További limitációt jelent, hogy az általunk választott antibiotikumok mindegyike baktericid hatással bír, így a későbbiekben felmerül bakteriosztatikus antibiotikumokkal történő megbízhatósági vizsgálat szükségessége is.

Mindezek alapján a módszert további, lehetőleg klinikai mintákból származó baktériumokkal és az általunk használt 12 antibiotikumon kívül más antibiotikumokkal is tesztelni szükséges.

5.8. A MICy extra költségei, előnyös tulajdonságai és továbbfejlesztési lehetőségei

Az új eljárásunk kezdeti lépései megegyeznek mikrodilúcióhoz szükségesekkel, extra költségként a következők merülnek fel: 0,5 ml HBSS oldat/mérési pontonként (kb. 10 Ft), HCl oldat pH 3-ra titráláshoz, 1 µg AO mérési pontonként (kb. 0,0046 Ft), 1 áramlási citométer cső (kb. 50 Ft) és néhány pipettahegy. Természetesen a mérési eljárás egyszerűsíthető, amennyiben az áramlási citométer direkt a lemezről mérne, nem lenne szükség áramlási citométer csövekre és pipettázásra sem. De erre a célra konstruált gép nélkül is, a legtöbb kórházban áramlási citométer elérhető, így MICy céljára való használata érdemi extra költséget nem jelent. Mindezek alapján a MICy jelentős időnyereség mellett minimális extra költségigénnyel bír.

A MICy további előnyös tulajdonsága, hogy MIC meghatározáson alapul, így minden további nélkül interpretálható az EUCAST eljárásrend szerint, nincs szükség új klinikai standardek megalkotására.

Nem példa nélküli, hogy áramlási citométer alapú megoldást gépi tanulással segítik ⁽⁸³⁾, hasonlóan a mi módszerünk is magában hordozza az automatizálhatóság ígéretét is. Megalkotható egy olyan áramlási citométer, mely egyben inkubálásra is képes, és miután a baktérium populáció vizsgálata algoritmizálható, egy erre konstruált gép reguláris időszakonként automatikusan ellenőrizheti a baktériumok számának változását. Amennyiben eléri az osztódó baktériumok az előre beállított küszöbértéket, az automatánk az inkubációt terminálja, fixálja, fluoreszcensen jelöli és leméri a mintát. Ebben az esetben előre definiált inkubálási időre sem lenne szükség, a mikrobiológus szakorvos pedig a konkrét MIC értékek ismeretében interpretálhatná a klinikus felé az érzékenységi profilt.

6. Következtetések

A doktori munkám során levont következtetések:

1. A BD FACSCalibur™, annak ellenére, hogy nem kifejezetten baktériumok detektálására konstruált áramlási citométer, képes megbízhatóan detektálni a baktériumok számának változását.
2. A megbízható, diszkriminatív döntéshozatalhoz legalább négyszeres baktériumszám változás szükséges, ami az általunk vizsgált laboratóriumi baktériumok esetében 4 órás inkubáció jelent.
3. A felnövekedés küszöbértékének a kiindulási baktériumszám adódott abban az esetben, ha következő felező hígításnál legalább a kétszeresét találtuk a küszöbértéknek.
4. A MICy megbízhatósága és reprodukálhatósága MIC érték meghatározás tekintetében hasonló a gold standard eljáráshoz, lényegesen gyorsabb idő alatt ad érzékenységi profilt a MIC értékeket az EUCAST adatbázissal összevetve, azonban a laboratóriumi ISO szabvány által elvárt határértékeket nem minden ponton teljesíti.

7. Összefoglalás

Bevezetés: A korai, adekvát antibiotikum terápia kritikus jelentőséggel bír az infektív állapot kapcsán intenzív ellátásra szoruló betegek esetén. Az antibiotikum érzékenységi profil megállapításához szükséges idő lerövidítése javíthat a klinikai döntéshozatal és a kimenetel szempontjából. Munkacsoportunk ennek megfelelően egy megbízható, pár órán belül eredményül MIC értéket adó, áramlási citométer alapú eljárás kifejlesztését tűzte ki célul, melynek pontosítását és validálását is elvégeztük.

Módszerek: Az általunk fejlesztett, MICy-nek nevezett eljárást hat különböző laboratóriumi baktériummal (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*) teszteltük. Elsőként a növekedésük ütemét vizsgáltuk. Az új módszert a gold standard mikrodilúcióval hasonlítottuk össze. A baktériumokat 4 órán keresztül 12 féle antibiotikum 7 felező hígítási koncentrációjával inkubáltuk, Mueller-Hinton és Luria-Bertoni tápoldatban, minden mérést háromszor ismételve. Az inkubálás után a mintákat pH 3-as, acridine orange festéket tartalmazó HBSS oldattal fixáltuk és festettük. A felnövekedés vagy gátlás diszkriminatív döntése érdekében szabályt alkottunk, miszerint a felnövekedés küszöbértéke a kezdeti baktériumszám, amennyiben a következő felezőhígítás mellett legalább a kezdeti baktériumszám kétszeresét detektáljuk. A megállapított MIC értékekből az EUCAST adatbázisa alapján érzékenységi profilt állítottunk össze. Az eredmények értékelésénél az ISO/DIS 20776-2:2007 szabványt vettük alapul, a módszereket Fleiss' kappa számítással hasonlítottuk össze.

Eredmények: A MICy és a mikrodilúció az egyes adatpontok tekintetében 87%-os egyezést mutatott, a MIC értékek tekintetében 89%-os alapvető egyezést találtunk. Az érzékenységi profilok tekintetében 92% egyezés mellett 8,7% súlyos eltérést és 3,2% nagyon súlyos eltérést találtunk az adatokat a fenti ISO szabvány szerint elemezve. A Fleiss' kappa analízisek az adatpontok és MIC tekintetében erős, az érzékenységi profilok tekintetében majdnem tökéletes összefüggést igazoltak a vizsgált és a kontroll eljárás között.

Következtetések: A MICy, mint egy új, áramlási citométer alapú antibiotikum érzékenységi vizsgáló eljárás a klasszikus mikrobiológiai módszerrel összevetve hasonló megbízhatóság mellett egy munkanappal korábban szolgáltat eredményül antibiotikum rezisztencia profilt.

8. Summary

Introduction: Early initiation of adequate antibiotic therapy is crucial for patients requiring intensive care due to bacterial infections. Shortening the time needed to establish an antibiotic susceptibility profile can enhance clinical decision-making and outcomes. Accordingly, we aimed to develop, refine, and validate a reliable flow cytometer-based method to determine MIC (Minimum Inhibitory Concentration) values within a few hours.

Methods: Initially, we monitored the growth rate of six different bacterial strains (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*) using the flow cytometry-based method called MICy. The new method was compared to the gold standard microdilution. Bacteria were incubated for 4 hours with two-fold serial dilutions of 12 antibiotics in Mueller-Hinton and Luria-Bertoni culture media on a 96-well format standard microplate; each measurement was repeated three times. After incubation, the samples were fixed and stained with HBSS medium containing acridine orange dye adjusted to pH 3. To discriminate between growth and inhibition, a rule was established: the threshold for growth is the initial bacterial count, if in the next two-fold dilution the detected bacterial count is at least double the initial bacterial count. Susceptibility profile was constructed from the MIC values, based on the EUCAST database. Bias and discrepancy resolution testing of essential agreement were performed according to the ISO/DIS 20776-2:2007 standard and the two methods were compared with Fleiss' kappa inter-observer test.

Results: The point-by-point inter-observer agreement between MICy and the gold standard method was 87% and the essential agreement ratio of the MIC values was 89%. Analyzing the data according to the ISO standard we found that the susceptibility profile was identical in 92%, the rate was 8.7% for major discrepancy and 3.2% for very major discrepancies. Fleiss' kappa analyses showed substantial agreement regarding the MIC values and the summarized susceptibility agreement was referred as almost perfect regarding the MICy and the microdilution method.

Conclusions: The new flow cytometer-based antibiotic susceptibility testing method, MICy, provides antibiotic resistance profiles with similar reliability compared to the classical microbiological method but one day earlier.

9. Irodalomjegyzék

1. WHO. Antibiotic resistance. Online elérhető: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (20230529-én letöltve). 2020.07.31.
2. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, Gray A, Han C, Bisignano C, Rao P, Wool E, Johnson SC, Browne AJ, Chipeta MG, Fell F, Hackett S, Haines-Woodhouse G, Kashef Hamadani BH, Kumaran EAP, McManigal B, Achalapong S, Agarwal R, Akech S, Albertson S, Amuasi J, Andrews J, Aravkin A, Ashley E, Babin F-X, Bailey F, Baker S, Basnyat B, Bekker A, Bender R, Berkley JA, Bethou A, Bielicki J, Boonkasidecha S, Bukosia J, Carvalho C, Castañeda-Orjuela C, Chansamouth V, Chaurasia S, Chiurchiù S, Chowdhury F, Clotaire Donatien R, Cook AJ, Cooper B, Cressey TR, Criollo-Mora E, Cunningham M, Darboe S, Day NPJ, De Luca M, Dokova K, Dramowski A, Dunachie SJ, Duong Bich T, Eckmanns T, Eibach D, Emami A, Feasey N, Fisher-Pearson N, Forrest K, Garcia C, Garrett D, Gastmeier P, Giref AZ, Greer RC, Gupta V, Haller S, Haselbeck A, Hay SI, Holm M, Hopkins S, Hsia Y, Iregbu KC, Jacobs J, Jarovsky D, Javanmardi F, Jenney AWJ, Khorana M, Khusuwan S, Kissoon N, Kobeissi E, Kostyanov T, Krapp F, Krumkamp R, Kumar A, Kyu HH, Lim C, Lim K, Limmathurotsakul D, Loftus MJ, Lunn M, Ma J, Manoharan A, Marks F, May J, Mayxay M, Mturi N, Munera-Huertas T, Musicha P, Musila LA, Mussi-Pinhata MM, Naidu RN, Nakamura T, Nanavati R, Nangia S, Newton P, Ngoun C, Novotney A, Nwakanma D, Obiero CW, Ochoa TJ, Olivas-Martinez A, Olliaro P, Ooko E, Ortiz-Brizuela E, Ounchanum P, Pak GD, Paredes JL, Peleg AY, Perrone C, Phe T, Phommasone K, Plakkal N, Ponce-de-Leon A, Raad M, Ramdin T, Rattanaovong S, Riddell A, Roberts T, Robotham JV, Roca A, Rosenthal VD, Rudd KE, Russell N, Sader HS, Saengchan W, Schnall J, Scott JAG, Seekaew S, Sharland M, Shivamallappa M, Sifuentes-Osornio J, Simpson AJ, Steenkeste N, Stewardson AJ, Stoeva T, Tasak N, Thaiprakong A, Thwaites G, Tigoi C, Turner C, Turner P, van Doorn HR, Velaphi S, Vongpradith A, Vongsouvath M, Vu H, Walsh T, Walson JL, Waner S, Wangrangsimakul T, Wannapinij P, Wozniak T, Young Sharma TEMW, Yu KC, Zheng P, Sartorius B, Lopez AD, Stergachis A, Moore C, Dolecek C, Naghavi M. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. 2022;399(10325):629-55.

3. CDC. COVID-19: U.S. Impact on Antimicrobial Resistance, Special Report 2022. 2022.
4. Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*. 2017;10(4):369-78.
5. van Belkum A, Burnham C-AD, Rossen JWA, Mallard F, Rochas O, Dunne WM. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2020;18(5):299-311.
6. Mokrani D, Chommeloux J, Pineton de Chambrun M, Hékimian G, Luyt C-E. Antibiotic stewardship in the ICU: time to shift into overdrive. *Annals of Intensive Care*. 2023;13(1):39.
7. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, Machado FR, McIntyre L, Ostermann M, Prescott HC, Schorr C, Simpson S, Wiersinga WJ, Alshamsi F, Angus DC, Arabi Y, Azevedo L, Beale R, Beilman G, Belley-Cote E, Burry L, Cecconi M, Centofanti J, Coz Yataco A, De Waele J, Dellinger RP, Doi K, Du B, Estenssoro E, Ferrer R, Gomersall C, Hodgson C, Hylander Møller M, Iwashyna T, Jacob S, Kleinpell R, Klompas M, Koh Y, Kumar A, Kwizera A, Lobo S, Masur H, McGloughlin S, Mehta S, Mehta Y, Mer M, Nunnally M, Oczkowski S, Osborn T, Papathanassoglou E, Perner A, Puskarich M, Roberts J, Schweickert W, Seckel M, Sevransky J, Sprung CL, Welte T, Zimmerman J, Levy M. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med*. 2021;49(11):e1063-e143.
8. Britannica TEOE. polymerase chain reaction *Encyclopedia Britannica* [updated 17 Oct. 2023. Available from: <https://www.britannica.com/science/polymerase-chain-reaction>.
9. Elbehiry A, Aldubaib M, Abalkhail A, Marzouk E, ALbeloushi A, Moussa I, Ibrahim M, Albazie H, Alqarni A, Anagreyah S, Alghamdi S, Rawway M. How MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology Contributes to Microbial Infection Control in Healthcare Settings. *Vaccines*. 2022;10(11):1881.

10. Gajic I, Kabic J, Kekic D, Jovicevic M, Milenkovic M, Mitic Culafic D, Trudic A, Ranin L, Opavski N. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(4).
11. Salipante SJ, Sengupta DJ, Cummings LA, Robinson A, Kurosawa K, Hoogestraat DR, Cookson BT. Whole genome sequencing indicates *Corynebacterium jeikeium* comprises 4 separate genomospecies and identifies a dominant genomospecies among clinical isolates. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(8):1001-10.
12. Ahmad M, Prensky H, Balestrieri J, ElNaggar S, Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC, Traxler B, Singh A, Lopatkin AJ. Tradeoff between lag time and growth rate drives the plasmid acquisition cost. *Nat Commun*. 2023;14(1):2343.
13. Bertrand RL, Margolin W. Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division. *Journal of Bacteriology*. 2019;201(7):e00697-18.
14. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;49(11):1749-55.
15. Microbiology ECfASTotESoC, Diseases I. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*. 2003;9(8):ix-xv.
16. Pál T. Klinikai mikrobiológiai vizsgálatok. In: Pál T, editor. *Az orvosi mikrobiológia tankönyve*: Medicina Könykiadó Zrt. ; 2012. p. 114-28.
17. Gajic I, Ranin L, Kekic D, Opavski N, Smitran A, Mijac V, Jovanovic S, Hadnadjev M, Travar M, Mijovic G. Tigecycline susceptibility of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from intensive care units in the western Balkans. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2020;67(3):176-81.

18. Reller LB, Weinstein M, Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;49(11):1749-55.
19. Shanmugakani RK, Srinivasan B, Glesby MJ, Westblade LF, Cárdenas WB, Raj T, Erickson D, Mehta S. Current state of the art in rapid diagnostics for antimicrobial resistance. *Lab Chip*. 2020;20(15):2607-25.
20. Perry JD. A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(2):449-79.
21. Khan ZA, Siddiqui MF, Park S. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics (Basel)*. 2019;9(2).
22. Karki G. Fluorometry - Principle and Applications Online Biology Notes...2020 [updated August 16. 2020. Available from: <https://www.onlinebiologynotes.com/fluorimetry-principle-and-applications/>.
23. Scientific T. Technical note: Properties of Absorbance and Turbidimetric Scattering Measurements in Photometry [Available from: <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/cell-analysis-resource-library/cell-analysis-application-notes/absorbance-turbidimetric-scattering-photometry.html>.
24. Zhou M, Wang Y, Liu C, Kudinha T, Liu X, Luo Y, Yang Q, Sun H, Hu J, Xu YC. Comparison of five commonly used automated susceptibility testing methods for accuracy in the China Antimicrobial Resistance Surveillance System (CARSS) hospitals. *Infect Drug Resist*. 2018;11:1347-58.
25. Rolain JM, Mallet MN, Fournier PE, Raoult D. Real-time PCR for universal antibiotic susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(2):538-41.

26. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science*. 1985;230(4732):1350-4.
27. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-91.
28. Adams G. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*. 2020;42(3):48-53.
29. Becker-André M, Hahlbrock K. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res*. 1989;17(22):9437-46.
30. Hendriksen RS, Bortolaia V, Tate H, Tyson GH, Aarestrup FM, McDermott PF. Using Genomics to Track Global Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Public Health*. 2019;7.
31. Faksri K, Kaewprasert O, Ong RT-H, Suriyaphol P, Prammananan T, Teo Y-Y, Srilohasin P, Chaiprasert A. Comparisons of whole-genome sequencing and phenotypic drug susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* causing MDR-TB and XDR-TB in Thailand. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2019;54(2):109-16.
32. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6.
33. Vrioni G, Tsiamis C, Oikonomidis G, Theodoridou K, Kapsimali V, Tsakris A. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Ann Transl Med*. 2018;6(12):240.
34. Nagy E, Ábrók M, Bartha N, Bereczki L, Juhász E, Kardos G, Kristóf K, Misztó C,

Urbán E. Special application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical microbiological diagnostics. *Orvosi Hetilap*. 2014;155(38):1495-503.

35. Hrabák J, Chudáčková E, Walková R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013;26(1):103-14.

36. Antibiotic susceptibility diagnostics for the future. *Nature Microbiology*. 2019;4(10):1603-.

37. Mátyus L. Áramlási citometria és sejtszeparálás. In: S. D, J. F, J. S, editors. *Orvosi biofizika*. Második kiadás ed. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2006. p. 422-34.

38. Moldavan A. PHOTO-ELECTRIC TECHNIQUE FOR THE COUNTING OF MICROSCOPICAL CELLS. *Science*. 1934;80(2069):188-9.

39. Gucker FT, Jr., O'Konski CT. Electronic methods of counting aerosol particles. *Chem Rev*. 1949;44(2):373-88.

40. Coulter W. National Electronics Conference. Chicago, Oct. 1956;3.

41. Kamensky LA, Melamed MR, Derman H. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science*. 1965;150(3696):630-1.

42. Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science*. 1969;163(3872):1213-4.

43. Robinson JP. Flow cytometry: past and future. *BioTechniques*. 2022;72(4):159-69.

44. Golden JP, Justin GA, Nasir M, Ligler FS. Hydrodynamic focusing--a versatile tool. *Anal Bioanal Chem*. 2012;402(1):325-35.

45. Mátyus L. Az áramlási citométerek működésének általános elvei. In: ; DS, ; FJ, J. S, editors. Orvosi biofizika. Második kiadás ed. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2006. p. 428-30.
46. Ward MD, Kaduchak G. Fundamentals of Acoustic Cytometry. Curr Protoc Cytom. 2018;84(1):e36.
47. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. Curr Protoc Immunol. 2018;120:5.1.-5.1.11.
48. Facilities BRC. LESSON 1: FLOW CYTOMETRY SIGNALS (SCATTER AND FLUORESCENT): University of Michigan Medical School; [Available from: <https://brcf.medicine.umich.edu/cores/flow-cytometry/training-education/lessons/lesson-one-flow-cytometry-signals-scatter-and-fluorescent/>].
49. Mátyus L. Az áramlási citometria néhány alkalmazása. In: S. D, J. F, J. S, editors. Orvosi biofizika. Második kiadás ed. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2006. p. 431-4.
50. Herényi L., Kis-Petik K., Módos K., Gy. V. Speciális mikroszkópok. In: S. D, J. F, J. S, editors. Orvosi biofizika. Második kiadás ed. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2006. p. 393-7.
51. Mátyus L. A mérési eredmények feldolgozása, adattárolás. In: ; DS, ; FJ, J. S, editors. Orvosi biofizika. Második kiadás ed. Budapest: Medicina Könyvkiadó Zrt.; 2006. p. 428-30.
52. Bailey JE, Fazel-Makjlessi J, McQuitty DN, Lee YN, Allred JC, Oro JA. Characterization of Bacterial Growth by Means of Flow Microfluorometry. Science. 1977;198(4322):1175-6.
53. Gilbert MF, McQuitty DN, Bailey JE. Flow microfluorometry study of diauxic batch growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology.

1978;36(4):615-7.

54. Steen HB, Boye E. *Escherichia coli* growth studied by dual-parameter flow cytophotometry. *Journal of Bacteriology*. 1981;145(2):1091-4.

55. Davey HM, Kell DB. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev*. 1996;60(4):641-96.

56. Dessus-Babus S, Belloc F, Bébéar CM, Poutiers F, Lacombe F, Bébéar C, de Barbeyrac B. Antibiotic susceptibility testing for *Chlamydia trachomatis* using flow cytometry. *Cytometry*. 1998;31(1):37-44.

57. Saint-Ruf C, Crussard S, Franceschi C, Orenge S, Ouattara J, Ramjeet M, Surre J, Matic I. Antibiotic Susceptibility Testing of the Gram-Negative Bacteria Based on Flow Cytometry. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7.

58. Roth BL, Poot M, Yue ST, Millard PJ. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;63(6):2421-31.

59. Nuding S, Zabel LT. Detection, Identification and Susceptibility Testing of Bacteria by Flow Cytometry. *Journal of Bacteriology & Parasitology*. 2013;2013:1-9.

60. Sawada T, Katayama M, Takatani S, Ohiro Y. Early detection of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by quantitative flow cytometry. *Scientific Reports*. 2021;11(1):2873.

61. Silva-Dias A, Pérez-Viso B, Martins-Oliveira I, Gomes R, Rodrigues AG, Cantón R, Pina-Vaz C. Evaluation of FASTinov Ultrarapid Flow Cytometry Antimicrobial Susceptibility Testing Directly from Positive Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 2021;59(10):10.1128/jcm.00544-21.

62. Martins-Oliveira I, Pérez-Viso B, Quintas S, Silva-Dias A, Gomes R, Rodrigues AG,

Cantón R, Pina-Vaz C. Evaluation of ultra-rapid susceptibility testing of ceftolozane-tazobactam by a flow cytometry assay directly from positive blood cultures. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2020;39(10):1907-14.

63. Marutescu LG. Current and Future Flow Cytometry Applications Contributing to Antimicrobial Resistance Control. *Microorganisms*. 2023;11(5):1300.

64. Filbrun AB, Richardson JC, Khanal PC, Tzeng Y-L, Dickson RM. Rapid, label-free antibiotic susceptibility determined directly from positive blood culture. *Cytometry Part A*. 2022;101(7):564-76.

65. Mulroney KT, Hall JM, Huang X, Turnbull E, Bzdyl NM, Chakera A, Naseer U, Corea EM, Ellington MJ, Hopkins KL, Wester AL, Ekelund O, Woodford N, Inglis TJJ. Rapid susceptibility profiling of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep*. 2017;7(1):1903.

66. Fonseca e Silva D, Silva-Dias A, Gomes R, Martins-Oliveira I, Ramos MH, Rodrigues AG, Cantón R, Pina-Vaz C. Evaluation of rapid colistin susceptibility directly from positive blood cultures using a flow cytometry assay. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2019;54(6):820-3.

67. Velican AM, Măruțescu L, Kamerzan C, Cristea VC, Banu O, Borcan E, Chifiriuc M-C. Rapid Detection and Antibiotic Susceptibility of Uropathogenic *Escherichia coli* by Flow Cytometry. *Microorganisms*. 2020;8(8):1233.

68. Torres-Sangiao E, Lamas Rodriguez B, Cea Pájaro M, Carracedo Montero R, Parajó Pazos N, García-Riestra C. Direct Urine Resistance Detection Using VITEK 2. *Antibiotics*. 2022;11(5):663.

69. Levin PA, Angert ER. Small but Mighty: Cell Size and Bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(7):a019216.

70. Traganos F, Darzynkiewicz Z, Sharpless T, Melamed MR. Simultaneous staining of

ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1977;25(1):46-56.

71. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.

72. ISO/DIS. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test – Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices against reference broth micro-dilution; ISO/DIS 20776-2:2007; Letöltve: 2021.10.10.

73. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.

Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org> [Internet]. 2019. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf.

74. Kállai A, Kelemen M, Molnár N, Tropotei A, Hauser B, Iványi Z, Gál J, Ligeti E, Kristóf K, Lőrincz ÁM. MICy: a Novel Flow Cytometric Method for Rapid Determination of Minimal Inhibitory Concentration. *Microbiology Spectrum*. 2021;9(3):e00901-21.

75. Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and Financial Benefits of Rapid Bacterial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(5):1415-8.

76. Van Der Pol E, Van Gemert MJC, Sturk A, Nieuwland R, Van Leeuwen TG. Single vs. swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2012;10(5):919-30.

77. Foladori P, Quaranta A, Ziglio G. Use of silica microspheres having refractive index similar to bacteria for conversion of flow cytometric forward light scatter into biovolume.

Water Research. 2008;42(14):3757-66.

78. Kepner RL, Jr., Pratt JR. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol Rev.* 1994;58(4):603-15.

79. Bonine NG, Berger A, Altincatal A, Wang R, Bhagnani T, Gillard P, Lodise T. Impact of Delayed Appropriate Antibiotic Therapy on Patient Outcomes by Antibiotic Resistance Status From Serious Gram-negative Bacterial Infections. *Am J Med Sci.* 2019;357(2):103-10.

80. Banerjee R, Humphries R. Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Blood Cultures and Their Clinical Impact. *Frontiers in Medicine.* 2021;8.

81. Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *Journal of Clinical Microbiology.* 1994;32(7):1757-62.

82. Kemnic TR CM. Trimethoprim Sulfamethoxazole. *StatPearls [Internet] Treasure Island (FL).* [Internet]: StatPearls Publishing; Updated 2022 Nov 28.

83. Inglis TJJ, Paton TF, Kopczyk MK, Mulroney KT, Carson CF. Same-day antimicrobial susceptibility test using acoustic-enhanced flow cytometry visualized with supervised machine learning. *Journal of Medical Microbiology.* 2020;69(5):657-69.

10. Publikációk jegyzéke

I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

Kállai A, Kelemen M, Molnár N, Tropotei A, Hauser B, Iványi Zs, Gál J, Ligeti E, Kristóf K, Lőrincz ÁM

MICy: a Novel Flow Cytometric Method for Rapid Determination of Minimal Inhibitory Concentration

MICROBIOLOGY SPECTRUM 9: 3 Paper: e00901-21, 10 p. (2021)

Folyóiratcikk/Szaccikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

SJR Scopus - Ecology : D1

SJR Scopus - Infectious Diseases: D1

SJR Scopus - Microbiology (medical): D1

SJR Scopus - Physiology : D1

SJR Scopus - Cell Biology: Q1

SJR Scopus - Genetics: Q1

SJR Scopus - Immunology and Microbiology (miscellaneous): Q1

IF: 7,171*

II. Egyéb – nem az értekezés témájában megjelent – közlemények és posztterek:

Kovács E, **Kállai A**, Fritúz G, Iványi Z, Mikó V, Valkó L, Hauser B, Gál J
The efficacy of virtual distance training of intensive therapy and anaesthesiology among fifth-year medical students during the COVID-19 pandemic: a cross-sectional study
BMC MEDICAL EDUCATION 21 (1) Paper: 393, 10 p. (2021)

Folyóiratcikk/Szaccikk (Folyóiratcikk)/Tudományos

IF: 2,463*

Kállai A, Skultéti D, Párkányi A, Bíró E., Fehér A, Szombath G, Iványi Z, Fazakas J, and Gál J. “Safe Delivery of Prolonged Thrombolysis Treatment for Pulmonary Embolism Using ClotPro Viscoelastic Test - Preliminary Results.” *INTENSIVE CARE MEDICINE EXPERIMENTAL* 11 (suppl 1):359. 2023.

Párkányi A, Bíró E, Skultéti D, Kovács E, Fehér A, **Kállai A**, Iványi Zs, Fazakas J, and Gál J “Fibrinolysis Resistance Duration after Tranexamic Acid Administration: How Is It Affected by Renal Insufficiency?” *INTENSIVE CARE MEDICINE EXPERIMENTAL* 11 (suppl 1): 635. 2023.

Maár Cs, Kovács E, Kovács G, **Kállai A**, Berczi M, Nagy T, Fábry Sz, Szvath P, Fritúz G, Iványi Zs, Gál J “The Effect of Practical Exam on the Skill Retention of Basic Life Support Skills among Fifth-Year Medical Students.” *RESUSCITATION* 192: S131. doi:10.1016/S0300-9572(23)00651-2.2023.

Kállai A, Párkányi A, Skultéti D, Kanász N, Kovács E, Mogyoródi B, Fehér A, Iványi Zs, Fazakas J, and Gál J. “The Effect of COVID-19 on the Comparability of the Traditional and Viscoelastic Coagulation Monitoring.” *INTENSIVE CARE MEDICINE EXPERIMENTAL* 10 (part 2): 44 (000719)-44. 2022.

Hermann, Cs, Holndonner-Kirst E, Bódi B, Mogyoródi B, Tóth K, **Kállai A**, Szegő E, et al. “Outcomes from Critical Care in Pregnant and Postpartum Patients with COVID-19.” *INTENSIVE CARE MEDICINE EXPERIMENTAL* 9 (Suppl. 1). 2021.

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Lőrincz Márton Ákosnak**, akinek ötletéből, korábbi kutatási eredményei kapcsán folytatott beszélgetésünkből kiindulhatott az egész, áramlási citométeren alapuló baktérium antibiotikum rezisztencia meghatározó eljárásunk. Szintén köszönettel tartozom **Prof. Dr. Ligeti Erzsébetnek**, hogy a fokozatszerzés teljes folyamatát átfogóan támogatott és felügyelte az előrehaladásomat.

Köszönöm **Prof. Dr. Gál Jánosnak**, az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Klinika igazgatójának, hogy minden nehézség mellett is lehetővé tette kutatómunkámat és ahhoz minden segítséget megadott. Köszönöm **Prof. Dr. Péntes Istvánnak**, hogy elindított a mindig fejlődő, kritikusan gondolkodó klinikussá válás soha véget nem érő útján.

Hálával tartozom **Dr. Kristóf Katalinnak**, hogy lenyűgöző tudásával és elképesztő teherbírásával segítette a munkánkat.

Köszönöm **Prof. Dr. Vásárhelyi Barnának**, **Dr. Kocsis Ibolyának** és **Dr. Szalay Balázsnak**, hogy biztosították az áramlási citométerhez való hozzáférésünket és meglátásaikkal segítették az előrehaladásunkat.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Prohászka Zoltánnak**, **Dr. Iványi Zsoltnak**, **Dr. Fazakas Jánosnak** és **Dr. Hauser Balázsnak** kritikus hozzáállásukért és hogy bármikor fordulhattam hozzájuk kérdéseimmel.

Szintén köszönettel tartozom minden korábbi és jelenlegi TDK hallgatónak: **dr. Molnár Noéminek**, **dr. Kelemen Mártának**, **dr. Tropotei Adriennek**, **dr. Stempler Márknak**, **dr. Rohács Diánának** és **Stubnya Jánosnak** lelkes és szorgalmas munkájukért, kérdéseikért és ötleteikért. Köszönöm asszisztenseinknek, **Tóth-Kun Reginának**, **Pesti Jánosnénak** és **Vajda Sándornénak**, hogy minden segítséget megadtak a vizsgálatok lebonyolításához.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm a végtelen támogatást, segítséget, türelmet, megértést és szeretetet feleségemnek, **Dalmának**, nélküle sehol nem tartanék...