

A PRIMYCIN *IN VITRO* ANTIBAKTERIÁLIS AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Doktori (Ph.D.) értekezés

Feiszt Péter

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Prof. Dr. Emőd Levente

Programvezetők: Prof. Dr. Emőd Levente, Dr. Kerényi Monika

Doktori iskola vezetője: Prof. Dr. Szekeres Júlia



Pécsi Tudományegyetem

Általános Orvostudományi Kar

Orvosi Mikrobiológiai és Immunitástani Intézet

2017

1 Bevezetés

A huszadik század közepén, amit az antibiotikumok aranykorának tartunk, az antibiotikumok a bakteriális fertőzések végleges gyógyszereinek tűntek. Bár ma sincs sok más lehetőségünk használatuk mellett a fertőzések kezelésében, hamar kiderült, hogy ezek nem bizonyulnak mindenható gyógyszereknek. Az antibiotikumok 1940-es évekbeli klinikai gyakorlatba való bevezetésével megjelentek és terjedni kezdtek az antibiotikum-rezisztens baktériumok. Az 1970-es években a helyzetet tovább súlyosbította az új antibiotikum osztályok felfedezésének ill. kifejlesztésének lassulása. Az évtizedek múlásával a probléma egyre fenyegetőbbé vált, míg napjainkban a "Végzetes szuperbaktérium fertőzések" rendszeresen kerülnek az újságok szalagcímébe.

Bár az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciák valószínűleg a mikrobák antibiotikum-termelő képességével párhuzamos evolúció eredményeként létrejött természetes jelenségek (D'Costa e., 2011; Bhullar és tsai., 2012), széleskörű elterjedésük egyértelműen az antibiotikumok ipari előállításának és széleskörű alkalmazásának a következménye (Davies és tsai., 2010). Például a penicillint elbontani képes és ezáltal a baktériumot rezisztenssé tevő penicillináz enzimet már azelőtt felfedezték, hogy a penicillin-rezisztens baktériumok megjelentek a klinikai gyakorlatban a penicillin bevezetését követő évtizedben (Abraham és tsai., 1940). Természetesen a baktériumok evolúciója olyan gyors ütemű, hogy egy antibiotikum - még ha teljes egészében mesterséges is - szelektív nyomása alatt a rezisztencia *de novo* is kifejlődik. A gyakori pontmutációk, viszonylag alacsony hatékonyságú repair-mechanizmusok és a rendkívül rövid generációs idő miatt a természetes szelekció a génváltozatok óriási készletére hat (Woodford és tsai., 2007). Minden új antibiotikum felfedezését és széles körű klinikai alkalmazását a rezisztencia elterjedése követi.

Az antibiotikum rezisztencia előnyt jelent a baktériumnak az adott antibiotikum szelektív nyomása mellett. Másrésztől azonban a rezisztencia mechanizmus mellékhatása általában fitness- csökkenést okoz (Andersson és tsai., 2010). Ennek következtében az antibiotikum - így annak szelektív nyomása - hiányában a populációban lecsökken a rezisztens sejtek aránya. Ezt a jelenséget klinikai környezetben demonstrálták streptococcus-ok erythromycin-rezisztenciája kapcsán (Seppälä és tsai., 1997).

Az új antibiotikumok kifejlesztésének lassulása miatt új stratégiák alkalmazása vált szükségessé a viágszerte egyre fenyegetőbbé váló antibiotikum rezisztenciák ellen. A fenti jelenség alapján ezek egyike régi, a jelenlegi klinikai gyakorlatban nem vagy kevéssé használt antibiotikumok revitalizálását célozza (Falagas és tsai., 2007; Cassir és tsai., 2012; Pulcini és tsai., 2012). Mivel a jelenleg elterjedt baktérium populációk nem voltak kitéve ezen szereknek, érzékenyek bizonyulhatnak velük szemben. De a régi antibiotikumok újbóli bevezetése a legújabb standardok alapján végzett gondos újraértékelésen kell alapuljon, kiegészítendő ezen régi szerekről meglévő ismereteinket (Theuretzbacher és tsai., 2015).

A primycint a szisztematikus antibiotikum kutatások első hullámában fedezték fel az antibiotikum éra hajnalán (Vályi-Nagy és tsai., 1954). Ez volt az első Magyarországon felfedezett, izolált és gyártott antibiotikum. A primycin felfedezéséről Vályi-Nagy Tibor számolt be a Nature-ben 1954-ben bemutatva a minden ismert kémiai entitástól eltérő, staphylococcusok és mycobactériumok ellen nagy hatásosságot mutató antibiotikumot (Vályi-Nagy és tsai., 1954). A primycint a felfedezése utáni három évtizedben számos alkalmazásban vizsgálták. Kezdetben még urogenitális tuberculosis (Kelenhegyi és tsai., 1956), nem-gonorrhoeás urethritis, és periováriális fertőzések (Molnár és tsai., 1958) kísérletes kezelésére is alkalmazták. Bár jó eredményeket értek el, ezen alkalmazásoknak határt szabtak az anyag rossz vízoldhatósága miatti formulálási nehézségek. Szintén ez volt a limitáló tényező a szer egyébként sikeres szemészeti alkalmazásában is (Alberth és tsai., 1957). A primycint a bőrgyógyászatban alkalmazták a legnagyobb sikerrel. Alkoholos külsődleges gél formulációja, az Ebrimycin® gél klinikai vizsgálatokban igen hatásosnak bizonyult különböző bőrfertőzések, úgymint acne, impetigo és pyoderma kezelésében (Bíró és tsai., 1987; Mészáros és tsai., 1987). Felszínes égések kezelésében is sikerrel alkalmazták (Papp és tsai., 1990).

A primycin a baktériumok sejtmembránjának dezorganizálása által fejti ki hatását, az ionáteresztő és vezetőképesség dózisfüggő növekedését okozva (Horváth és tsai., 1979). A nukleotidok fokozott kiszivárgását is leírták P32 izotóp-jelölt *Bacillus subtilis* tenyészetekben (Horváth és tsai., 1979). A bakteriális sejtmembránon ható antibiotikumok általában képesek a nem osztódó baktérium sejtek elölésére is (Coates és tsai. 2002; Mascio és tsai., 2007; Ooi és tsai., 2009). Ez a fajta baktericid hatás képes a baktérium lízis nélküli

elölésére, épen hagyva a sejtfalat, ezáltal a baktériumsejt integritását (Cotroneo és tsai., 2008). Az általunk végzett kísérletek előtt sem a primycin nem osztódó baktériumsejtekre kifejtett hatását, sem esetleges bakteriolízist okozó hatását nem vizsgálták.

Jelenleg az egyetlen hatóanyagként primycint tartalmazó emberi felhasználású gyógyszer az Ebrimycin® gél, amelyet mindeddig kizárólag Magyarországon forgalmaztak. Az irodalmi adatok szerint a primycin nagyfokú hatásossággal rendelkezik Gram-pozitív baktériumok, különösen a staphylococcusok ellen. A Gram-negatívokra vonatkozóan az adatok ellentmondásosak, alacsony hatékonyságról, vagy hatástalanságról számolnak be. A primycin antibakteriális hatását utoljára a mi vizsgálataink előtt több mint 20 évvel vizsgálták olyan törzsgyűjteményeken, amelyek nem tükrözik a jelenlegi rezisztenciaviszonyokat, és nem elérhetőek újrvizsgálatra. Az utolsó publikáció a primycin hatásosságáról 1988-ban jelent meg, azóta pedig mind a baktériumok rezisztencia mintázata, mind az antimikróbás szerek értékelésének módszerei jelentősen megváltoztak. Ezen körülmények újrvizsgálatra érdemessé tették ezen régi antibiotikumot napjainkban, amikor egyre szűkülnek a lehetőségeink az antibiotikum rezisztenciák elleni harcban.

2 Célkitűzések

1. Első célunk a primycin hatásspektrumának és hatásosságának a vizsgálata volt a primycin alkalmazási körére releváns baktériumfajok jelenlegi rezisztenciaviszonyokat tükröző populációin. Jelenleg elterjedt multirezisztens törzseket, pl. methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) és koaguláz-negatív staphylococcusok (MRKNS), vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-rezisztens enterococcusok (VRE), penicillin-rezisztens *Streptococcus pneumoniae* és a kiterjedt spectrumú béta lactamáz (ESBL)-termelő Gram-negatív baktériumokat, amelyek primycin-érzékenységről nem állt rendelkezésre információ, szintén vizsgálatba vontunk. A primycin hatásosságának vizsgálatát a bőrgyógyászatban, szemészetben és fül-orr-gégészetben széles körben alkalmazott külsődleges antibiotikumokkal, valamint a vancomycinnal és a mupirocinnal, mint a methicillin-rezisztens staphylococcusok elleni Gold-standard szerekkel összehasonlításban végeztük el.
2. Szintén elemeztük a primycin farmakodinámiás tulajdonságait a baktericid hatására vonatkozóan.
3. A primycin sejtmembrán-támadáspontú hatásmechanizmusából kiindulva vizsgáltuk annak nem osztódó baktériumok elleni hatásosságát
4. Ugyanezen okból vizsgáltuk a primycin bakteriolitikus aktivitását.
5. Hogy segítsük felbecsülni a szer hosszú távú használhatóságát, vizsgáltuk a spontán rezisztens mutánsok kialakulásának gyakoriságát, a rezisztencia kifejlődés sebességét, és a más antibiotikumokkal való lehetséges keresztrezisztenciákat.
6. Ígéretes gyógyszerkombinációk azonosítása céljából a primycinnel való kombinálásra alkalmas antibiotikumokat kerestünk, valamint vizsgáltuk ezen jelöltek primycinnel való in vitro kölcsönhatását.

3 Módszerek

3.1 Standard mikrodilúciós módszer

Minden izolátum minimális gátló koncentráció (minimal inhibitory concentration - MIC) értékeit a CLSI szabványainak (2012a; 2012b) megfelelő mikrodilúciós módszerrel mértük meg. Ezen módszer alapja, hogy a baktérium azonos mennyiségű inokulumait az antibiotikum felező hígításokkal előállított csökkenő koncentrációjának tesszük ki tápvelés kis (100 µl) térfogataiban egy 96 lyukú mikroplate-en elrendezve. A legkisebb koncentrációt, amely mellett már nem látható növekedés a kontrollhoz képest, tekintjük a MIC értéknek.

3.2 A minimális baktericid koncentráció (MBC) meghatározása

A minimális baktericid koncentráció (MBC) meghatározásokat a CLSI standard (1999) szerint végeztük. A MIC mérések során növekedést nem mutató lyukakból két párhuzamos 0,01 ml térfogatú mintát vettünk, és agarlemezre oltottuk azokat. Inkubáció után a kinőtt telepeket megszámloltuk. A legkisebb antibiotikum koncentrációt, amely az eredeti inokulum 99,9%-át elpusztította legfeljebb 5 telepképző egységet (Colony Forming Unit - CFU) hagyva tekintettük az MBC értéknek.

3.3 Idő-ölés görbék felvétele

Az idő-ölés vizsgálatokat a CLSI M26-A szabvány (CLSI, 1999) alapján végeztük. A módszer lényege, hogy a baktériumot az antibiotikum különböző koncentrációjának tesszük ki, miközben megadott időközönként mintát véve meghatározzuk a CFU számot. A CFU számot az idő függvényében grafikusán ábrázolva megkapjuk az ölési görbét. Szintén az idő-ölés módszert alkalmazzuk a primycin nem osztódó baktériumok elleni aktivitásának vizsgálatára többféle növekedésgátlási módszer, úgymint mupirocin-, erythromycin-,

carbonil-cianid m-klorofenolhidrazon (carbonyl cyanide m-chlorophenolhydrazone - CCCP) kezelés, ill. alacsony hőmérsékletű inkubáció alkalmazása mellett.

3.4 Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

OD 600 =0,1 kezdeti töménységű, primycinnel (1 µg/ml, 2 MBC, 1h) kezelt és kontroll tenyészeteket állítottunk elő 10 ml-es térfogatokban. A tenyészeteket ezután 5%-os agarba impregnáltuk, fixáltuk és dehydráltuk emelkedő koncentrációjú alkohol oldat sorozatban. A mintákat ezután átítattuk durcupánnal, metszeteket készítettünk LEICA Ultracut mikrotommal, amiket ezután uracil-acetáttal és ólom citráttal festettünk meg. A metszetek TEM vizsgálatát JEOL JEM-1200EX II microszkóppal végeztük standard beállítások mellett.

3.5 A spontán rezisztens mutánsok gyakoriságának vizsgálata

A spontán rezisztens mutánsok gyakoriságát Woosley és mtsi. (2010) leírása alapján egylépéses mutációvizsgálattal mértük. A baktérium egynapos tenyészetéből 4 MacFarland töménységű szuszpenziót készítettünk, majd ennek 1 ml -es térfogatait a baktérium MIC értékének kétszeresét, ill. négyszeresét tartalmazó agarlamezekre oltottuk, majd 48 órán át inkubáltuk 37 C -on. Az inokulumok CFU számát annak 10x-es hígításainak kioltásával és telepszámolással határoztuk meg 24 óra inkubáció után. A spontán rezisztens mutánsok gyakoriságának a rezisztens mutánsok és az összes sejt hányadosát tekintjük.

3.6 Passzálás

A passzálásos kísérletek a CLSI standard mikrodilúciós módszeren alapultak. Az antibiotikumot legnagyobb koncentrációban tartalmazó, még növekedést mutató lyukak tartalmát használtuk a következő MIC mérések inokulumának elkészítéséhez. Ilyen módon a baktériumok az antibiotikum szelektív nyomásának kitéve növekedtek hosszú időn keresztül. A fenti eljárást 21 napon keresztül ismételtük, majd három egymást követő antibiotikum mentes átoltást végeztünk, és vizsgáltuk az esetleges reverziót.

3.7 Checkerboard titrálás

Az egyes antibiotikumok közötti kölcsönhatásokat a checkerboard titrálásos módszerrel vizsgáltuk. A két vizsgált antibiotikum MHB-ban készített felező hígítási sorait egymásra merőlegesen juttattuk 96 lyukú microplatere (egyiket a sorokban, másikat az oszlopokban haladva). A koncentrációsorokat a vizsgálandó baktérium előzetesen megmért MIC értékei szerint állítottuk be. A beoltott lemezeket 24 h-t inkubáltuk 37 C-on normál légkörben. A növekedést vizuálisan olvastuk le. Az adatokat a Fractional Inhibitory Concentration index (FIC_i) (Odds, 2003) alapján interpretáltuk. A FIC értékeit minden olyan lyuk esetében kiszámoltuk, ahol a minimális gátló koncentráció leolvasható volt.

FIC antibiotikum A = MIC A kombinációban / MIC A önmagában

FIC antibiotikum B = MIC B kombinációban / MIC B önmagában

A FIC_i a homológ FIC értékek összege. 0,5 alatti értékei szinergizmust, 4 feletti értékei antagonizmust jeleznek, míg 0,5-4 közötti értékek esetén nincs interakció. Minden organizmusra vonatkozóan a lemezről olvasható összes FIC_i értéket átlagoltuk.

4 Eredmények

4.1 A primycin és az összehasonlító antibiotikumok *in vitro* antibakteriális aktivitása

4.1.1 A primycin és az összehasonlító antibiotikumok hatásossága klinikai izolátumokkal szemben

Összesen 180 klinikai izolátum érzékenységét vizsgáltuk meg a primycinnel, valamint összehasonlító szerekkel úgymint vacomycinnel, gentamicinnel, erythromycinnel, ofloxacinnal, oxytetracyclinnel, tobramycinnel, és neomycinnel szemben. A primycin gátolta mind a 130 vizsgált Gram-pozitív klinikai izolátumot. A MIC₉₀ érték 0,06 µg/ml volt a staphylococcusok, 0,5 µg/ml enterococcusok, és 0,5-1 µg/ml *Propionibacterium acnes* és a streptococcusok esetében (1. Táblázat). A legtöbb összehasonlításban ezen értékek alacsonyabbak voltak, mint az összehasonlító antibiotikumok esetén. Nem találtunk összefüggést az izolátumok valamely összehasonlító antibiotikummal szembeni csökkent érzékenysége, vagy methicillin rezisztenciája és primycin érzékenysége között. Az összehasonlító szerek közül egyedül a vancomycin mutatott teljes körű nagyfokú hatékonyságot. Ennek megfelelően a primycin mellett csak a vancomycin volt kiterjedten hatékony a VSE izolátumokkal szemben. Az is említésre méltó, hogy a gentamicin széles körű hatékonyságot mutatott az MRSA, de nem az MRCNS izolátumokkal szemben. A csökkent vancomycin érzékenységű *Enterococcus* izolátumok esetében a primycin 0,25-0,5 µg/ml MIC értékeket mutatott függetlenül az izolátumok fájától a vancomycin rezisztencia mértékétől és a rezisztenciák biztosító van gén típusától. A primycin esetében az MBC értékeket is megmértük közvetlenül a MIC mérések után. Az MBC értékeket az 1. Táblázat tartalmazza. A primycin minden esetben baktericid aktivitást mutatott. A legtöbb *Staphylococcus*, *Enterococcus* és *P. acnes* izolátum esetén találtunk a MIC feletti lyukakban túlélő sejteket, azonban a *Streptococcus* izolátumok esetében ez csak elszórtan fordult elő. Néhány reprezentánst ezek közül újravizsáltunk, de változatlan primycin MIC értékeket mutattak. Streptococcusok esetében a MIC és MBC értéke általában megegyezett. A

legtöbb *Enterococcus* és *P. acnes* izolátum esetében az MBC a MIC érték kétszerese volt, amely különbség *Staphylococcus* izolátumok esetében kétszerestől harminckétszeresig terjedt. A genuson belül a legnagyobb MIC-MBC különbséget methicillin státuszról függetlenül a *S. aureus* izolátumok mutatták, amelyet a CNS izolátumok értékei követtek.

1. Táblázat A primycin hatásossága klinikai izolátumokkal szemben

Baktérium (izolátumok száma)	MIC (µg/ml)			MBC (µg/ml)		
	Tartomány	50%	90%	Tartomány	50%	90%
MSSA (10)	0,06 – 0,06	0,06	0,06	0,5 – 4	2	2
MRSA (10)	0,06 – 0,06	0,06	0,06	0,5 – 4	2	2
MS-CNS (10)	0,03 – 0,06	0,06	0,06	0,03 – 1	0,125	1
MR-CNS (10)	0,03 – 0,06	0,06	0,06	0,06 – 1	0,125	0,25
VSE (20)	0,5 – 1	0,5	0,5	0,5 – 1	1	1
<i>Enterococcus</i> spp., csökkent vancomycin érzékenységgű (10)	0,25 – 0,5	0,5	0,5	0,5 – 2	1	1
<i>S. pneumoniae</i> , penicillin-érzékeny (10)	0,25 – 1	0,5	0,5	0,25 – 1	0,5	0,5
<i>S. pneumoniae</i> , penicillin-rezisztens (10)	0,5 – 1	0,5	1	0,5 – 1	0,5	1
Viridans group streptococcusok (20)	0,5 – 1	1	1	0,5 – 1	1	1
<i>P. acnes</i> (20)	0,125 – 0,5	0,25	0,5	0,25 – 1	0,5	1

Az MRSA izolátumok esetében a primycint a mupirocinnal, az MRSA hordozása megszüntetésének gold-standard gyógyszerével is összehasonlítottuk. Ezt az összehasonlítást egy kibővített 20 MRSA izolátumot tartalmazó gyűjteményen végeztük vizsgálva mind a MIC mind az MBC értékeket (2. táblázat). A primycin mind a 20 izolátumot gátolta egységesen 0,06 µg/ml MIC értékkel. Csak egy izolátum mutatott magas fokú mupirocin rezisztenciát, a többi érzékenynek bizonyult alacsony MIC értékekkel. A primycin két hígítással alacsonyabb MIC90 és MBC 90 értékeket mutatott, és gátolta a mupirocin-rezisztens izolátumot is.

2. Táblázat A primycin és a mupirocin antibakteriális hatásának összehasonlítása 20 MRSA klinikai izolátumon.

Antibiotikum	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			MBC ($\mu\text{g/ml}$)		
	Tartomány	50%	90%	Tartomány	50%	90%
Primycin	0,06 – 0,06	0,06	0,06	0,5 – 4	2	2
Mupirocin	0,06 – >1024	0,125	0,25	4 – >1024	8	8

A primycin nem mutatott aktivitást a Gram-negatív baktériumokkal szemben. Az összesen 50 *Klebsiella*, *Escheichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Proteus* izolátum egyikét sem gátolta primycin még a legnagyobb, 64 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban sem.

4.1.2 A primycin aktivitása nemzetközi referenciatörzsekkel szemben

A legtöbb ATCC referenciatörzs, beleértve az VRE, MRSA, hVISA és a mupirocin-rezisztens *S. aureus* törzseket a referencia törzsek érzékenysége korrelált a klinikai izolátumok eredményeivel (3. táblázat). Egyetlen kivételként az ATCC 700699 VISA törzs mutatott 0,125 $\mu\text{g/ml}$ MIC értéket, ami a többi *Staphylococcus aureus* törzs MIC értékének kétszerese.

Érdekes módon a korábban primycin-rezisztensként leírt ATCC 25923 *S. aureus* törzs a többi *S. aureus* törzshöz hasonló módon 0,06 $\mu\text{g/ml}$ MIC értéket mutatott.

3. Táblázat A primycin hatásossága ATCC referenciatörzsekkel szemben.

Strain		MIC ($\mu\text{g/ml}$)	MBC ($\mu\text{g/ml}$)
ATCC 29213	MSSA	0,06	0,5
ATCC 25923	MSSA ^a	0,06	1
ATCC 43300	MRSA	0,06	2
ATCC 700698	hVISA	0,06	0,5
ATCC 700699	VISA	0,125	2
ATCC BAA-1708	mupirocin-rezisztens <i>S. aureus</i>	0,06	0,5
ATCC 29212	VSE	0,5	1
ATCC 51299	VRE	0,5	2
ATCC 49619	<i>S. pneumoniae</i>	0,5	0,5
ATCC 8043	<i>E. hirae</i>	0,5	0,5
ATCC 11828	<i>P. acnes</i>	0,25	0,5
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	>64	-

^aA törzset korábban primycin-rezisztensként írták le (Úri és tsai., 1979; Nógrádi, 1988).

4.2 A primycin alapvető farmakodinámiás tulajdonságai

A primycin farmakodinámiái felméréséhez a *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212, és *S. pneumoniae* ATCC 49619 törzseket használtuk. A primycin idő-ölés görbéi mindhárom törzs esetében a koncentrációfüggő baktericid hatás jellegzetes lefutását mutatták. *S. aureus* ATCC 29213 esetében a szer $>3\text{Log}_{10}$ CFU csökkenést okozott a 24 órás mintavételig a MIC érték négyszeresének ill. nyolcszorosának megfelelő koncentrációban. A primycin gyors baktericid hatást mutatott a MIC érték négyszeresének ill. nyolcszorosának megfelelő koncentrációban *S. pneumoniae* ATCC 49619 és *E. faecalis* ATCC 29212 ellen, $>3\text{Log}_{10}$ CFU csökkenést okozva a 2 órás mintavételig. A vancomycin ölési görbéi jellegzetes időfüggő baktericid hatást mutatnak, $>3\text{Log}_{10}$ CFU csökkenést okozva *S. aureus* ATCC 29213 esetén a 24 órás, és *S. pneumoniae* ATCC 49619 esetén a 12 órás mintavételig. A szer bakteriosztatikus hatást mutatott az *E. faecalis* ATCC 29212 ellen.

4.3 A primycin hatásmechanizmusának vizsgálata

Idő-ölés módszerrel vizsgáltuk a primycin *S. aureus* ATCC 29213 nem osztódó sejtjeiben kifejtett hatását. A növekedés gátlásának többféle módszerét alkalmazva próbáltuk meg körvonalazni a szer célstruktúráit ill. hatásmechanizmusát. Az idő-ölés kísérletekben a primycint két koncentrációban, az MBC érték kétszeresével és négyszeresében alkalmaztuk, mivel koncentrációfüggő baktericid hatása van. A vancomycint csak egy, az MBC négyszeresének megfelelő koncentrációban alkalmaztuk, mivel annak baktericid hatása időfüggő. A vancomycines csövek egyúttal a növekedésgátlás negatív kontrolljaként is szolgáltak, mivel a szer csak osztódó sejtekre hat. A kontrollkísérletben mind a primycin mind a vancomycin kifejtette baktericid hatását. A primycin 4 MBC koncentrációja az egy órás, míg 2 MBC koncentrációja a két órás mintavételig ért el $>3\text{Log}_{10}$ CFU csökkenést. A vancomycin esetében a $>3\text{Log}_{10}$ CFU csökkenést a 24 órás mintavételre következett be. Mupirocin kezelés mellett a primycin megtartotta baktericid hatását, bár a $>3\text{Log}_{10}$ CFU csökkenés 4 MBC koncentráció mellett csak a két órás, 2 MBC mellett csak a 12 órás mintavételre következett be. A primycin ölési görbéi nagyon hasonló lefutást mutattak erythromycin kezelés mellett is $>3\text{Log}_{10}$ CFU csökkenést eredményezve a két órás mintavételre 4 MBC, és a 24 órás mintavételre 2 MBC koncentrációban. A primycin CCCP

kezelés mellett is elért baktericid hatást, bár már csak 4 MBC koncentrációban és csak a 12 órás mintavételre. A növekedés alacsony hőmérséklet általi gátlása egyúttal a primycin baktericid hatását is gátolta. Még 4 MBC koncentrációban sem érte el az $>1\text{Log}_{10}$ CFU csökkenést. Bár a hatás minimális volt, azt feltételeztük, hogy a vancomycinnel ellentétben nem szűnt meg teljesen, csak renkívül lelassult. Jóval magasabb, 16 MBC koncentrációval megismételve a kísérletet a baktériumölő hatás egyértelműen megnyilvánult, igaz, még mindig csak $>2\text{Log}_{10}$ CFU csökkenést okozva a 24 órás mintavételre.

A primycin esetleges bakteriolitikus hatását a *S. aureus* ATCC 29213 törzsön végeztük a reakciócsövek fotometriás vizsgálatával egy nagy inokulummal ($\text{OD}_{600}=0,1$) indított idő-ölés kísérlet mintavételeivel párhuzamosan. A primycint 1 MBC és 2 MBC koncentrációkban alkalmaztuk. A CFU szám sokkal gyorsabb esést mutatott mint az optikai denzitás, amely - ellentétben a CFU szám esésével - nem mutatott koncentráció- függést. Ez azt mutatja, hogy a primycin baktericid hatása nem jár sejtlízissel. Továbbá TEM felvételeket is készítettünk primycin-kezelt (1 h, 2 MBC) és kontroll sejtekről. A primycin kezelt tenyészet képein lízis jelei nem voltak felfedezhetőek. A kontroll tenyészetrel ellentétben osztódó, szeptumos sejtek csak elszórtan voltak jelen. A kontroll tenyészet sejtjei jól definiált sejtfallal és sejthártyával jelentek meg, és a heterogén elektron denzitású nukleoid régiók is láthatóak voltak. A kezelt sejtek megtartották alakjukat és integritásukat, de a beltartalmuk homogéneen nagy elektron denzitásúvá vált, és folytonossághiányok utaltak a membrán károsodására.

4.4 Rezisztencia vizsgálatok

A spontán primycin-rezisztens mutánsok gyakoriságát egy lépéses mutációvizsgálattal mértük nyolc referenciatörzset bevonva. Ezek a *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 25924, *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 700698, *S. aureus* ATCC 700699, *S. aureus* ATCC BAA-1708, *E. faecalis* ATCC 29212, és *E. faecalis* 51299 voltak. Nem találtunk rezisztens mutánst ezekben a vizsgálatokban. Az *S. aureus* ATCC 25923 törzsszel, amelyet korábban rezisztensnek írtak le, a kísérletet két nagyságrenddel nagyobb inokulummal is elvégeztük, de így sem találtunk rezisztens mutánst.

Mivel az egylépéses mutációvizsgálattal nem találtunk primycin-rezisztens mutánst, elvégeztünk egy 21 napos passzálós kísérletet ugyanezekkel a törzsekkel hogy megfigyeljük a rezisztens mutánsok kiszelektálódását, amelyeket azután a más antibiotikumokkal esetleg kialakuló fenotípusos keresztrezisztenciákat is megvizsgáljuk. Csak egy izolátum ért el négyszeres, és további hat kétszeres MIC emelkedést a kezdeti populáció értékéhez képest. Ez a lassú adaptáció jól korrelál a spontán rezisztens mutánsok alacsony gyakoriságával. Az utódtörzsek emelkedett MIC értékei stabilnak maradtak három egymást követő primycinmentes átoltás után is.

Hogy megvizsgáljuk az esetleges fenotípusos keresztrezisztenciákat a nagyobb antibiotikum családok képviselőivel, a vancomycinnel, mupirocinnal, gentamicinnel, erythromycinnel, ofloxaccinnal, oxytetracyclinnel és oxacillinnel, párhuzamos MIC méréseket végeztünk a passzálós kísérletben képződött hét törzspárral. Ebbe az összehasonlításba a szintén membrán támadáspontú daptomycint is bevontuk. A szülő és leszármazott törzsek mupirocin-, gentamicin-, erythromycin-, ofloxacin-, oxytetracyclin- és oxacillin érzékenységében nem találtunk konzekvens változást. A korrelációk hiánya koherens a klinikai izolátumok ezen szerekkel szembeni érzékenységéről függetlenül egységes primycin MIC értékeivel. Másrészt viszont egyértelmű egybeesés figyelhető meg a primycin és a vancomycin passzálós törzsek esetén megváltozott MIC értékei között. Amíg a szülő törzsek közül csak a VISA ATCC 700699 rendelkezett 4 µg/ml MIC értékkel, a passzált törzsek közül a hVISA ATCC 700698, és az MRSA ATCC 43300 is elérte ezt a határértéket. További három törzs vancomycin MIC értéke emelkedett 1- ről 2 µg/ml-re. Ez a korreláció harmonizál az ATCC 700699 VISA törzs többi *S. aureus* törzsénél kissé magasabb kiindulási primycin MIC értékével. Ezen felül a hétből hat emelkedett primycin MIC értékű passzált törzs egy hígítási fokkal magasabb daptomycin MIC értéket mutatott a szülő törzsénél. A VISA ATCC 700699 törzs elérte a daptomycin-nem- érzékenység határértékét (MIC=2 µg/ml) a primycin passzálás után.

4.5 Lehetséges kiegészítő szerek és azok primycinnel való in vitro interakciója

Összehasonlító érzékenység vizsgálatok alapján a neomycint és a polymyxin B-t választottuk mint jelölteket a primycinnel való kombinálásra széles antibakteriális hatásspektrum elérése érdekében. A kombinált szerek primycinnel való esetleges

interakcióinak vizsgálata érdekében checkerboard titrálásokat végeztünk néhány natív baktériumtörzsön. A checkerboard vizsgálatok során nem észleltünk semmilyen irányú interakciót. Az átlagos FIC indexek minden esetben 4 alatt és 0,5 fölött voltak, tehát nem lépett fel interakció ezen interpretáció szerint.

5 Megbeszélés

Az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciák kiemelt jelentőségű egészségügyi problémát jelentenek világszinten is. A multirezisztens baktériumok megjelenése és elterjedése számos vizsgálat indítását eredményezte hatékonyabb antibakteriális szerek fejlesztése érdekében, valamint több korábbról ismert de a mai terápiás palettán már háttérbe szorult vegyület újraértékelését inspirálta. A mi érzékenységvizsgálataink az utóbbi megközelítést valósították meg újravizsgálva a primycint, amely topikális szer az 50-es években vezettek be, de a jelenlegi gyakorlatban kevésbé használt, főleg világszinten nézve.

Eredményeink azt mutatják, hogy a primycin kimagasló hatékonyságot mutat a leggyakoribb Gram-pozitív kórokozók jelenlegi populációival szemben, beleértve a jelenleg terjedő multirezisztens törzseket, míg a vizsgált Gram-negatív fajokkal szemben hatástalan. A primycin spektruma és hatásossága a Gram pozitív baktériumok ellen jobbnak bizonyult hat topikálisan széles körben alkalmazott antibiotikuménál valamint a vancomycinénél is. Valamivel hatékonyabbak bizonyult a mupirocinnál is, annak elsődleges célorganizmusával, az MRSA-val szemben. A primycin a staphylococcusok fenyegető mupirocin-rezisztenciára is választ ad a mupirocin-rezisztens *S. aureus* törzsek elleni nagyfokú hatékonysága által. A primycin mupirocinnal szembeni további előnye a bőrgyógyászati alkalmazásokban *P. acnes*-el szembeni nagyfokú hatékonysága, amely kórokozó a mupirocinnal szemben elsődleges rezisztenciával rendelkezik. Vizsgálatainkban a primycin streptococcusokkal szemben a MIC értékkel megegyező koncentrációban baktericid hatást mutatott. Az MBC érték enterococcusok és a *P. acnes* esetében egy vagy két hígítási fokkal a MIC fölött voltak, amely különbség staphylococcusok esetén egytől hat hígítási fokig terjedt. Ezek az eredmények a staphylococcusok esetén kapott jóval alacsonyabb MIC értékek klinikai jelentőségének felmérését teszik szükségessé.

A primycin baktericid aktivitása koncentrációfüggést mutat. Ezen eredmény korrelál egy korábbi, a hatásmechanizmust célzó vizsgálattal, ahol koncentrációfüggő hatást figyeltek meg a bakteriális sejtmembrán permeabilitására vonatkozóan (Horváth és tsai., 1979).

A legtöbb baktericid antibiotikum csak az osztódó sejtekre hat, mivel a hatásmechanizmusuk működésben levő anyagcsereutakkal való kölcsönhatásokon alapul.

Az antimikrobás kezelésben ez a fertőzött területen nyugalmi állapotban levő, nem osztódó sejtek túléléséhez vezet, ami a rezisztencia kialakulásának kedvező elhúzóó kezeléset tesz szükségessé (Coates és tsai., 2002). Emiatt a nem osztódó sejtek elleni baktericid hatás a fertőzött terület teljes mentesítésének előfeltétele, különösen csökkent immunitású betegekben. A primycin baktericid hatását megvizsgáltuk egy *S. aureus* referenciatorzs növekedésében különböző módszerekkel gátolt tenyészetin. Mivel ezek egyike sem szüntette meg teljesen a primycin baktericid aktivitását, kijelenthetjük, hogy ahhoz nem szükséges sejtosztódás. A metabolikus aktivitást befolyásoló növekedésgátlási módszerek csak kismértékű csökkenést okoztak a primycin aktivitásában. A tény, hogy a "stringent" válasz nem szüntette meg a primycin baktericid hatását, mutatja, hogy az nem metabolikus utakkal való kölcsönhatáson alapul. Ennek megfelelően az erythromycinnel elért fehérjeszintézis gátlás sem tudta akadályozni a primycin baktericid hatását. Másrésztől a sejtmembránt érintő növekedésgátlási módszerek a primycin baktericid hatását jelentősen csökkentették. A CCCP védő hatása ismert volt a daptomycin és a kationos antimikrobás fehérjék baktericid hatásával szemben (Yang és tsai., 2013). Ez a jelenség az említett szerek membránpotenciál megszüntető hatásával függ össze, amely ellen a mikroorganizmus a CCCP hatására védekező mechanizmusok sorát aktiválja (Yang és tsai., 2013). Bár további vizsálatok szükségesek annak eldöntéséhez hogy ez a jelenség zajlik-e le a primycin aktivitáscsökkenésekor CCCP jelenlétében, ez meggyőző magyarázatnak tűnik, mivel a primycinről ismert hogy növeli a bakteriális sejtmembrán permeabilitását és vezetőképességét (Horváth és tsai., 1979). A legnagyobb csökkenést a primycin baktericid hatásában a hideg kultúrákban tapasztaltuk. Az alacsony hőmérséklet a metabolikus aktivitás csökkentése mellett a membránfluiditás drasztikus csökkenését okozza (Phadtare és tsai., 2004). Mivel ez utóbbi jelenti a legalapvetőbb különbséget a mupirocinnal előidézett növekedésgátlás fiziológiai következményeihez képest, valószínűleg ez az oka a primycin hideg kultúrákban tapasztalt drasztikus hatásának. Ez a feltételezés jól korrelál az irodalmi adatokkal. Az alacsonyabb membránfluiditás mérsékeltőbb primycin érzékenységgel járt egy a szülőtörzsénél kompaktabb membránnal rendelkező ergosterolhiányos *Candida albicans* mutáns esetén (Virág és tsai., 2012a, 2012b). Feltehetőleg az alacsony hőmérséklet miatt lecsökkent membránfluiditás és lelassult diffúzió hátráltatta a primycin integrálódását a sejtmembránba, ami szükséges lenne a hatás kifejtéséhez (Virág és tsai., 2012b). Ez szintén magyarázhatja az exponenciálisan növekvő tenyészetek elleni gyorsabb hatást, mivel ismert, hogy a membránfluiditás megemelkedik az exponenciális fázisban (Xiong és tsai., 1993). Ezek az eredmények további vizsálatok szükségességét

jelzik, a membránfluiditás és a primycin antibakteriális hatásának összefüggései kapcsán. Eredményeink alapján a primycin baktericid hatását sejtlízis nélkül fejt ki, ami szintén koherens a membrán támadáspontú hatással (Cotroneo és tsai., 2008). Ezt az elméletet támogatták továbbá a TEM felvételek is, amelyeken intakt sejtfal mellett károsodott membránt figyelhettünk meg.

Vizsgálataink során nem találtunk primycin-rezisztens Gram-pozitív baktériumot. Még a korábban rezisztensként leírt (Úri és tsai., 1979; Nógrádi, 1988) *S. aureus* ATCC 25923 törzs is konzisztensen érzékenynek bizonyult 0,06 µg/ml MIC értékkel. Ezt a törzs különböző forrásokból beszerzett mintáin is elvégzett sokszor ismételt vizsgálatokkal erősítettük meg. A korábban leírt rezisztencia okát nem ismerték (Úri és tsai., 1979) és mivel ez az eredmény nem volt reprodukálható, most már magyarázat nélkül marad. Eredményeink alapján a spontán rezisztens mutánsok megjelenése valószínűtlen, és a rezisztencia kifejlődése is igen lassú. A passzált törzsek csökkent primycin érzékenysége nem mutatott összefüggést a legtöbb másik baktériummal szembeni érzékenység mértékével. Másrészt a csökkent primycin érzékenység világos összefüggést mutat a *S. aureus*-ok vancomycin-intermediate fenotípusával. A primycin érzékenység csökkenése szintén együtt járt a daptomycin MIC értékek emelkedésével. Ezek a korrelációk azt sejtetik, hogy a VISA fenotípus csökkent daptomycin érzékenységét okozó mechanizmusok állhatnak a csökkent primycin érzékenység mögött is. Ez azt implikálja, hogy a primycin szubinhibitorikus koncentrációinak való hosszan tartó kitettség a VISA fenotípus kifejlődéséhez és csökkent daptomycin érzékenységhez vezethet. Másrészt még az emelkedett primycin MIC értékű passzált törzsek is bőven érzékenyek a gyakorlatban alkalmazott koncentrációkkal szemben (az Ebrimycin® gél primycin tartalma pl. 2000 µg/g). Klinikai vizsgálatok és dozírozások tervezésénél ezen tényeket számításba kell venni.

Mivel a primycin hatástalan a Gram-negatív baktériumokkal szemben, további fejlesztési lehetőség a szer kombinálása egy másik, a Gram-negatívok ellen hatásos anyaggal. A primycin spektrumát kiegészítő szert keresve a neomycint és a polymyxin B-t találtuk kiterjedten hatékonyak a Gram-negatív fajok törzseivel szemben. Egyik szer sem mutat interakciót a primycinnel, tehát a kombinálás nem befolyásolja a szerek egyenkénti hatásosságát. A kölcsönhatások hiánya koherens az eltérő spektrumokkal és hatásmechanizmusokkal.

A multirezisztens Gram-pozitív baktériumokkal szembeni kiterjedt és nagyfokú hatékonyság a primycint igen értékesé teszi a klinikai gyakorlat számára. Tekintettel arra, hogy a külsődleges alkalmazásokban az antibiotikumot az MBC értékek több százszorosát elérő koncentrációban alkalmazzák, a koncentrációfüggő baktericid hatás egy újabb előnyös tulajdonsága a szernek potenciálisan gyors terápiás választ eredményezve. A nem osztódó baktériumokkal szembeni baktericid hatás egy további igen kedvező tulajdonsága az anyagnak, ami a fertőzött vagy kolonizált területek teljes mentesítését ígéri. Ezek a tulajdonságok a szerrel szembeni rezisztencia fejlődés alacsony potenciáljával együtt aprimycin hosszú távú sikeres alkalmazhatóságát vetítik előre. Szintén javasoljuk a primycin kombinálását polymyxin B-vel vagy neomycinnel, mivel ezek nem befolyásolják a primycin hatását, de hatékonyan egészítik ki az antimikróbás spektrumát potenciálisan még hasznosabbá téve az empirikus alkalmazások céljára. Mint hatóság által engedélyezett hatóanyag, a primycin a multirezisztens Gram-pozitív baktériumok által okozott lokális fertőzések megelőzésének és kezelésének, ill. tünetmentes kolonizációk megszüntetésének könnyen hozzáférhető szere lehet.

6 Új eredmények

1. Bizonyítottuk, hogy a primycin kiterjedt és nagyfokú hatékonysággal rendelkezik a Gram-pozitív baktériumokkal szemben, azok multirezisztens törzseit (MRSA, MRCNS, VRE, mupirocin-rezisztens *S. aureus*, penicillin-rezisztens *S. pneumoniae*) is beleértve.
2. Igazoltuk a primycin baktericid hatásának koncentrációfüggő jellegét.
3. Kimutattuk hogy a primycin megőrzi baktericid hatását a növekedésében gátolt *S. aureus*- al szemben is. Indirekt bizonyítékot találtunk a primycin membránpotenciál megszakító hatására, és a baktérium csökkent membránfluiditásának primycinnel szembeni védő hatására.
4. Bizonyítottuk, hogy a primycin lízis nélkül pusztítja el a *S. aureus* sejteket.
5. Kimutattuk, hogy a spontán primycin-rezisztens mutánsok gyakoriága igen alacsony, ami igen lassú rezisztencia-fejlődéssel párosul.
6. Bebizonyítottuk, hogy a primycin érzékenység mértéke független a fluoroquinolon ofloxacin-, az amnoglikozid-, tobramycin-, gentamicin-, neomycin-, a makrolid erythromycin-, a tetraciklin oxytetracyclin-, a β -laktám penicillin-, methicillin-, oxacillin-, valamint a mupirocin- érzékenység mértékétől.
7. Összefüggést találtunk az emelkedett primycin MIC értékek és a *S. aureus* VISA fenotípusa - és ezáltal csökkent daptomycin érzékenysége - között.
8. Bizonyítottuk, hogy nincs kölcsönhatás a primycin ill. a neomycin és a polymyxin B hatása között, ezért az utóbbiakat ígéretes kombináns szerekként javasoljuk a primycin hatásspektrumát kiegészítendő.

7 Hivatkozások

1. Abraham EP, E Chain (1940) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Rev Infect Dis* 10: 677-678
2. Alberth B, Elek P, Herpay Z, Szilágyi I (1957) Primycin and penicillic acid in ophthalmology. *Ophthalmologica* 134: 54-61
3. Andersson DI, Hughes D (2010) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 8: 260-271
4. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, Barton HA, Wright GD (2012) Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS ONE* 7(4): e34953. doi:10.1371/journal.pone.0034953
5. Bíró J, Várkonyi V (1987) Ebrimycin gel in the treatment of pyodermas and bacterial secondary infections. *Ther Hung* 35: 136-139
6. Cassir N, Rolain JM, Brouqui P (2014) A new strategy to fight antimicrobial resistance: the revival of old antibiotics. *Front Microbiol* 5: 551
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (1999) M26-A Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved Guideline, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012a) M07-A9. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; approved Standard, 9th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012b) Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard M11-A8, 8th ed. Wayne, PA.
10. Coates A, Hu Y, Bax R, Page C (2002) The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat Rev Drug Discov* 1: 895-910
11. Cotroneo N, Harris R, Perlmutter N, Beveridge T, Silverman JA (2008) Daptomycin exerts bactericidal action without lysis of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2223-2225
12. Davies J, Davies D (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 417-433
13. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WL, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD (2011) Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477: 457-461
14. Falagas ME, Kopterides P (2007) Old antibiotics for infections in critically ill patients. *Curr Opin Crit Care* 13: 592-597
15. Horváth I, Kramer M, Bauer PI, Büki KG (1979) The mode of action of primycin. *Arch Microbiol* 121:135-139
16. Kelenhegyi M, Uzvölgyi F, Gurdon J (1956) Clinical experiences with a new Hungarian-made antibiotic primycin in urogenital tuberculosis. *Magy Seb* 9: 198-200
17. Mascio CTM, Alder JD, Silverman JA (2007) Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 4255-4260
18. Mészáros C, Vezekényi K (1987) Use of Ebrimycin gel in dermatology. *Ther Hung* 35: 77-79
19. Molnár G, Bíró L (1958) Local administration of primycin in the therapy of inflammations of the uterine region. *Magy Nőorv Lapja* 21: 155-160

20. Nógrádi M (1988) Primycin (Ebrimycin[®]) – a new topical antibiotic. *Drugs of Today* 24: 563-566
21. Odds FC (2003) Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 52: 1
22. Ooi N, Miller K, Randall C, Rhys-Williams W, Love W, Chopra I (2009) XF-70 and XF-73, novel antibacterial agents active against slow-growing and non-dividing cultures of *Staphylococcus aureus* including biofilms. *J Antimicrob Chemother* 65: 72-78
23. Papp T, Ménesi L, Szalai I (1990) Experiences in the Ebrimycin gel treatment of burns. *Ther Hung* 38: 125-128
24. Phadtare S (2004) Recent developments in bacterial cold-shock response. *Curr Issues Mol Biol* 6: 125-134
25. Pulcini C, Bush K, Craig WA, Frimodt-Møller N, Grayson ML, Mouton JW, Turnidge J, Harbarth S, Gyssens IC, ESCMID Study Group for Antibiotic Policies (2012) Forgotten antibiotics: An inventory in Europe, the United States, Canada, and Australia. *Clin Infect Dis* 54: 268-274
26. Reiss S, Pané-Farré J, Fuchs S, Francois P, Liebeck M, Schrenzel J, Lindequist U, Lalk M, Wolz C, Hecker M, Engelmann S (2012) Global analysis of the *Staphylococcus aureus* response to mupirocin. *Antimicrob Agents Chemother* 56: 787-804
27. Seppälä H, Klaukka T, Vuopio-Varkila J, Muotiala A, Helenius H, Lager K, Huovinen P, Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance (1997) The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics on erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. *N Eng J Med* 337: 441-446
28. Theuretzbacher U, Van Bambeke F, Cantón F, Giske CG, Mouton JW, Nation RL, Paul M, Turnidge JD, Kahlmeter G (2015) Reviving old antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 70: 2177-2181
29. Úri JV, Actor P (1979) Crystallization and antifungal activity of primycin. *J Antibiot (Tokyo)* 32: 1207-1209
30. Vályi-Nagy T, Úri J, Szilágyi I (1954) Primycin, a new antibiotic. *Nature* 174: 1105-1106
31. Virág E, Belágyi J, Gazdag Z, Vágvolgyi C, Pesti M (2012a) Direct *in vivo* interaction of the antibiotic primycin with the plasma membrane of *Candida albicans*: an EPR study. *Biochim Biophys Acta* 1818: 42-48
32. Virág E, Juhász Á, Kardos R, Gazdag Z, Papp G, Péntes Á, Nyitrai M, Vágvolgyi C, Pesti M (2012b) In vivo direct interaction of the antibiotic primycin on a *Candida albicans* clinical isolate and its ergosterol-less mutant. *Acta Biol Hung* 63: 38-51
33. Woodford N, Ellington MJ (2007) The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect* 13: 5-18
34. Woosley NM, Castanheira M, Jones NR (2010) CEM-101 activity against Gram-positive organisms. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 2182-2187
35. Xiong Z, Ge S, Chamberlain NR, Kapral FA (1993) Growth cycle-induced changes in sensitivity of *Staphylococcus aureus* to bactericidal lipids from abscesses. *J Med Microbiol* 39:58-63
36. Yang SJ, Xiong YQ, Yeaman MR, Bayes KW, Adbelhady W, Bayer AS (2013) Role of LytSR two-component regulatory system in adaptation to cationic antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 3875-3882

Köszönetnyilvánítás

Nagy megtiszteltetés volt a számomra hogy Emődy Levente Professzor Úrral dolgozhattam Ph.D. hallgatóként. Nagyra értékelem őszinte érdeklődését és nyitottságát az általam javasolt téma iránt, és minden tanácsát, ötletét és nélkülözhetetlen segítségét annak valóra váltásában. Hálás vagyok legmesszebb menő támogatásáért, megértéséért és hogy inkább a kollégájaként és barátjaként kezelt mint hallgatójaként. Tiszteletre méltó személyes kvalitásai nagy hatással voltak rám.

Köszönöm Pallos József Péternek, a PannonPharma Kft. Ügyvezető igazgatójának a bátorítását, anyagi támogatását, és a lehetőséget, hogy részt vehettem ezekben a kutatás-fejlesztési projekteken. Gyakran inspirált Igazgató Úr "szükségből kovácsoljuk az erényt" hozzáállása. Remélem sikerült egy új, izgalmas fejezetet nyitunk a primycin történetében.

Külön köszönet illeti Schneider Györgyöt a TEM kísérletek elvégzéséért, és a brainstorming-okért. Mindig nagyszerű társaság volt a laborban, tele kíváncsisággal, kreativitással és viccekkel.

Nagyon hálás vagyok Csepreginé Lajkó Rózsának a kísérletekhez nyújtott - különösen a legintenzívebb első évben - nélkülözhetetlen segítségéért.

Köszönöm Seress László Professzor Úrnak a TEM labor biztosítását, valamint Domján Gábornének és Dr. Lórándné Miskey Juditnak a TEM kísérletek elvégzéséhez nyújtott segítségüket.

Köszönetemet fejezem ki Mestyán Gyulának, Kerényi Monikának, Dobay Orsolyának, Szabó Juditnak, Dombrádi Zsuzsannának, és Urbán Editnek hogy megosztották velem törzsgyűjteményeiket a vizsgálatok elvégzéséhez, ill. értékes javaslataikat és visszajelzéseiket a publikálás folyamán.

Minden PannonPharmás kollégámnak hálásan köszönöm a segítségét amit a kutatásommal kapcsolatban nyújtottak, valamint amiért a cégnél helyettesítettek időről-időre amíg az Egyetemen dolgoztam.

Végül legmélyebb köszönetemet fejezem ki családomnak, elsősorban feleségemnek az évek során nyújtott minden támogatásáért, tanácsáért és türelméért, és kislányomnak amiért bearanyozta az életemet.

Publikációk

A disszertációhoz felhasznált eredeti közlemények

Feiszt P, Mestyán Gy, Kerényi M, Dobay O, Szabó J, Dombrádi Zs, Urbán E, Emődy L; Re-evaluation of *in vitro* activity of primycin against prevalent multiresistant bacteria. 2014. INTERNATIONAL JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY. 304:1077-85.

IF: 3.614

Feiszt P, Schneider Gy, Emődy L; Effect of primycin on growth-arrested cultures and cell integrity of *Staphylococcus aureus*. 2017. ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA. doi: 10.1556/030.64.2017.002.

IF: 0,568 (2015)

További eredeti közlemény

Majoros L, Kardos G, **Feiszt P**, Szabó B; Efficacy of amphotericin-B and flucytosine against fluconazole-resistant *Candida inconspicua* clinical isolates. 2005. JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY. 56:253-4.

IF: 3.886

Prezentációk

Feiszt P, Mestyán Gy, Kerényi M, Dobay O, Szabó J, Dombrádi Zs, Pallos JP, Emődy L; A primycin *in vitro* aktivitása multirezisztens Gram-pozitív baktériumokkal szemben. 2014. *Gyógyszerészet* LVIII. Évf. Supplementum I. ISSN 0017-6036, S95.

Poszter

Feiszt P, Emődy L., Multirezisztens Gram-pozitív baktériumok *in vitro* primycin-szulfát érzékenysége. 2012. 18. Országos Antibiotikum Továbbképző Tanfolyam. Siófok.

Előadás

Szabadalmi bejelentések

Feiszt P, Emódy L, Pallos JP, Juhász Á, Seffer D, Sefferné Szalai M, Péntzes Á; Primycin, primycin components or combinations thereof for use in the treatment or prevention of infections caused by specific pathogens. PTC/HU2012/000111; Elsőbbség napja 2011.10.25.

Feltalálói részarány: 45%

Juhász Á, Péntzes Á, Péteri AZs, Pallos JP, Seffer D, **Feiszt P**, Pesti M, Fekete Cs, Vágvölgyi Cs, Gazdag Z, Papp G; Process for producing primycin, primycin component(s), precursors and metabolites thereof via fermentation by the use of bacterial species *Saccharomonospora azurea*. PTC/HU2010/000116; Elsőbbség napja 2009.10.29.

Feltalálói részarány: 5%