

**Extended-spectrum
β-lactamase (ESBL)
production of *Escherichia
coli* strains isolated from
diarrheic pigs**

I. E. Kis^{1*}
E. Albert¹
J. Gimesiné Fodor²
A. Czuck³
I. Biksi¹

1. Állatorvostudományi Egyetem,
Patológiai Tanszék, Haszonállat
Diagnosztikai Központ,
2225 Üllő, Dóra major

*e-mail: kis.istvan.emil@gmail.com

2. Magánállatorvos,
Lajoskomárom

3. Bóly Zrt.,
Bóly

Hasmenéses sertésekből izolált *Escherichia coli* törzsek kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) termelésének vizsgálata

**Kis István Emil^{1*}, Albert Ervin¹, Gimesiné Fodor Judit², Czuck Anna³,
Biksi Imre¹**

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők hasmenéses tüneteket mutató sertésekből izolált, *Escherichia coli* baktériumtörzsek kiterjedt-spektrumú β-laktamáz (ESBL) termelését vizsgálták. Az 50, korábbi rezisztencia-eredmények alapján feltételezhetően ESBL-termelő törzs közül 35 esetben tudták mikrohígítós teszt segítségével igazolni az ESBL-termelést, két esetben a törzs emellett cefalosporináz (AmpC-t) is termelt, egy további törzs pedig csak AmpC-termelő volt. A vizsgált 27 állomány közül 20 esetben igazolták ESBL-termelő törzsek jelenlétét. A szopós malacokból származó, ESBL-termelő törzsek jelentős része véresagaron nem mutatott β-hemolízist, és nem rendelkezett a szerzők által vizsgált 9 gyakori virulenciafaktor-gén egyikével sem. A választott malacokból izolált ESBL-termelő törzsek ugyanakkor mindegyik esetben β-hemolízist mutattak és egy vagy több virulenciafaktor-génnel rendelkeztek.

SUMMARY

Background: Extended spectrum β-lactamases (ESBLs) are enzymes conferring resistance to the majority of β-lactam antibiotics in many bacterial species, including *Escherichia coli*. Bacteria harboring these enzymes could be resistant to 3rd and 4th class cephalosporines and carbapenems, depleting the range of compounds available for treating serious human infections.

Objectives: The authors of this study aimed to examine the ESBL production of 50 selected *E. coli* strains isolated between 2016 and 2022 in Hungary from cases of porcine diarrhea.

Materials and Methods: Archived *E. coli* strains suspected to produce ESBL were selected based on results. The 50 strains tested in the study originated from 27 different farms, 28 were collected from suckling, 22 from weaned piglets. The phenotypic characterization of the strains was achieved using Micronaut-S β-lactamases MIC plates.

Results and Discussion: Phenotypic characterization of selected *E. coli* strains revealed the presence of ESBL production in 35 strains, two strains additionally produced AmpC cephalosporinase, and one strain only produced AmpC. ESBL producing strains were found on 20 of the 27 farms investigated. Many of the ESBL producing strains originating from cases of neonatal diarrhea did not possess any of the examined virulence factor genes, nor were they β-hemolytic. ESBL producing strains from post weaning diarrhea cases on the other hand were all β-hemolytic and had one or several virulence factor genes. ESBL producing strains are likely widespread, although with quite low frequency in the Hungarian swine production system, both among pathogenic and likely commensal groups of *E. coli*. Continuous monitoring of ESBL producing strains is warranted, possibly with the inclusion of ESBL selective media or other methods of identification in routine AST, especially in case of *E. coli* strains isolated from suckling piglets.

SERTÉS

A kiterjedt spektrumú β -laktamázok (extended spectrum beta-lactamase, ESBL) számos baktériumfajban megtalálható enzimek, amelyek rezisztenciát biztosítanak számukra a β -laktám antibiotikumok többségével, így a 3. és 4. generációs cefalosporinokkal és karbapenemekkel szemben is [1, 2]. A humángyógyászatban ez jelentősen korlátozza a súlyos fertőzések gyógykezelésére alkalmas hatóanyagok körét. Az ESBL-termelő organizmusok általában egyéb antibiotikum-rezisztenciát kódoló géneket (pl. kinolonok, aminoglikozidok, tetraciklinek és folsavszintézis-gátlók) is hordoznak, ami ilyen fertőzések esetében tovább korlátozza a terápiás lehetőségeket [1, 2]. A 3. és 4. generációs cefalosporinok kiterjedt alkalmazása és a velük szembeni rezisztencia elterjedése közötti összefüggés állatok és emberek esetében egyaránt jól dokumentált a szakirodalomban. Dániában pl. egy 39 sertéstelepre kiterjedő vizsgálatban kimutatták, hogy ahol nem használtak 3. és 4. generációs cefalosporint az állatok kezelésére, ott az *E. coli* törzsek csupán 20%-a volt ESBL-termelő, míg ott, ahol nagy mennyiségben használtak ilyen hatóanyagokat, közel 80% volt az ESBL-termelő izolátumok aránya. A vizsgálat kitért a sertésekkel dolgozó emberek hasonló típusú baktériumhordozására is. A vizsgált emberek közel 10%-a hordozott ESBL-termelő *E. coli* törzseket, négy telepen pedig a sertésekből és az emberekből izolált *E. coli* törzsek ugyanazokat az ESBL enzimeket tartalmazták. Eszerint a sertések által hordozott baktériumok kolonizálni tudják az embert is, vagy a sertés és az emberi eredetű *E. coli* törzsek plazmidokat képesek cserélni egymás között [3].

A kiterjedt spektrumú β -laktamázok bakteriális enzimek, amelyek rezisztenciát biztosítanak β -laktám antibiotikumok többségével szemben

Korlátozni kell a széles spektrumú cefalosporinok állategészségügyi alkalmazását

Fennáll a veszély, hogy a gazdasági haszonállatokban szelektálódott ESBL-termelő *E. coli* törzsek pl. az élelmiszerláncba kerülve adott esetben nehezen gyógykezelhető fertőzéseket okoznak emberben. A probléma súlyosságát jelzi, hogy a WHO (World Health Organization) a harmadik generációs cefalosporinokra rezisztens enterobakteriumokat, ideértve az ESBL-termelőket is, a 21. századi világ legnagyobb fenyegetései közé sorolta [4]. E veszély csökkentése érdekében elsődleges fontosságú a széles hatásspektrumú cefalosporinok állategészségügyi célú felhasználásának korlátozása, valamint az ESBL-hordozó baktériumtörzsek élelmiszertermelő állatokban való előfordulásának folyamatos monitorozása. Utóbbi célra az *E. coli* törzsek ideálisnak tekinthetők, mivel széles körben előfordulnak a környezetben, a gazdasági haszonállatokban és emberekben egyaránt, ill. adott esetben állatokban és emberben egyaránt megbetegedést képesek okozni [4]. A hazai sertésállományokból származó, vágóhídon gyűjtött *E. coli* törzsek ilyen irányú monitorozása az érvényes EU előírások alapján folyamatosan zajlik, a klinikai megbetegedéseket okozó *E. coli* törzsek ESBL-termelésével kapcsolatban azonban viszonylag kevés hazai adat áll rendelkezésre [5].

Egy 2006 és 2007 között végzett hazai felmérésben 1489, klinikai tüneteket mutató sertésből származó *E. coli* törzset vizsgáltak, ezek közül csupán egy szopós malac és 3 választott malac eredetű törzs esetében sikerült az ESBL termelést igazolni [6]. Ugyanebben a vizsgálatban feltérképezték az izolált állati és emberi eredetű *E. coli* törzsek ESBL-termelésért felelős génszakaszait és megállapították, hogy a vizsgált időszakban nem volt kimutatható kapcsolat az állati eredetű és a kórházi esetekből származó ESBL-termelő törzsek között. Egy 2021-ben megjelent hazai közlemény szerzői ugyanakkor 100 sertés bélsármintájából már 43 ESBL-termelő *E. coli* törzset mutattak ki [7]. A közleményben nem szerepel utalás a sertések klinikai megbetegedésére.

Jelen vizsgálatunkkal klinikailag megbetegedett (hasmenéses) sertésekből kimutatott *E. coli* törzsek ESBL-termelésével kapcsolatos hazai ismereteket szerttük volna szélesíteni.

A β -LAKTAMÁZOK OSZTÁLYOZÁSA

A széles spektrumú β -laktám antibiotikumok elleni rezisztenciáért elsősorban a kiterjedt spektrumú β -laktamázok felelősek. Ezek az enzimek a β -laktámgyűrű irreverzibilis enzimatis hidrolízise útján a karbapenemeken és cefamicineken kívül minden β -laktám antibiotikumot hatástalanítanak, de β -laktamázgátló anyagokkal, pl. klavulánsavval gátolható [8].

A β -laktamázok elsődleges szerkezetük, vagy funkcionális jellemzőik alapján osztályozhatók. A molekulák fehérjeszekvenciái alapján történő csoportosítás során a β -laktamázokat A, B, C vagy D csoportba sorolják. Az A, C, D csoportokba tartozó enzimek szubsztrátjaikat aktív szerincsoportjuk segítségével hidrolizálják. A B csoportba tartozó β -laktamázok metalloenzimek, amelyek aktív centrumában legalább egy cink-ion felelős a β -laktámgyűrű bontásáért. A funkcionális osztályozás szerint három fő csoportot különböztetünk meg.

Cefalosporinázok

A cefalosporinázok C molekulacsoportba tartozó β -laktamázok, amelyek képesek a penicillin és több cefalosporin bontására. Jellemző képviselőjük az AmpC (aminopenicillin inaktiváló cefalosporináz). Az enterobacteriumokban széles körben előforduló, kromozómában vagy plazmidokon kódolt enzimek. Működésük általában nem gátolható klavulánsavval vagy kelátképző anyagokkal (pl. EDTA-val), de specifikusan gátolható bórsav sóival, pl. 3-amino-fenilboráttal.

Szerintípusú β -laktamázok

Az A és D molekulacsoportba tartozó, eltérő szubsztrátspecifitással rendelkező β -laktamázok sorolhatók ide, amelyek több alcsoportba oszthatók. Ide tartoznak az általunk vizsgált KPC-k (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemázok), az ESBL-ek, és a D-típusú karbapenemázok.

A KPC a leggyakrabban kimutatott A molekulacsoportba tartozó szerin-karbapenemáz, amely széles szubsztrátspektrummal rendelkezik, beleértve a penicillineket, a cefalosporinokat és a karbapenemeket. Eredetileg csak *Klebsiella pneumoniae*-ben volt megtalálható, de mára a plazmidok általi horizontális terjedésnek köszönhetően több más Gram-negatív baktériumfaj is szert tett erre az enzimecsoportra. Az ide tartozó altípusok legfőbb közös tulajdonsága, hogy a karbapenemeket hidrolízis révén bontják. Ezen enzimek működése nem gátolható klavulánsavval, sem kelátképző anyagokkal (pl. EDTA-val), de specifikusan gátolható pl. a 3-amino fenilboráttal.

Az ESBL olyan plazmidon kódolt β -laktamázok megnevezése, amelyek bontani képesek a penicillin-származékokat (pl. az ampicillint, az amoxicillint és a tikarcillint), az első generációs cefalosporinokat (pl. a cefalexint és a cefadroxilt), a második generációs cefalosporinokat (pl. a cefuroximot), a harmadik generációs cefalosporinokat (pl. a ceftiofurt, a ceftazidimet, a cefoperazont), valamint a negyedik generációs cefalosporinokat (pl. a cefkvinomot, a cefepimet), továbbá a monobaktám típusú aztreonámot. Az enzim aktivitása klavulánsavval blokkolható.

A D molekulacsoportba tartozó karbapenemázok (pl. az OXA-48 típusú karbapenemáz) közös tulajdonsága, hogy aktivitásuk nem gátolható sem EDTA-val, sem 3-amino fenilboráttal.

Metallo- β -laktamázok

A 3. csoportba tartozó MBL (metallo- β -laktamáz) enzimek bontják a penicillineket, a cefalosporinokat és a karbapenemeket, aktivitásuk nem gátolható a szerin- β -laktamázok működését gátló anyagokkal, pl. klavulánsavval, de gátlásuk kiváltható kelátképző anyagokkal, pl. EDTA-val. A gátlás lényege, hogy a gátlóanyag elfedi az aktív centrumban lévő kétértékű cink iont, így az enzim működésképtelenné válik [1, 2, 8].

A cefalosporinázok C molekulacsoportba tartozó β -laktamázok, amelyek képesek a penicillin és több cefalosporin bontására

Az ESBL olyan plazmidon kódolt β -laktamázok megnevezése, amelyek bontani képesek a penicillinszármazékokat

Az ESBL- és/vagy cefalosporináz-termelő *E. coli* törzsek az élelmiszer-termelő állatokban előforduló antimikrobiális rezisztencia legfontosabb indikátorai közé tartoznak

Az ESBL és/vagy cefalosporináz (AmpC) termelő *E. coli* törzsek az élelmiszer-termelő állatokban előforduló antimikrobiális rezisztencia (AMR) legfontosabb indikátorai közé tartoznak [4, 5]. Az AMR rutin monitorozása során az EU-országokban, Norvégiában, Izlandon és Svájcban többek között az ESBL/AmpC/karbapenemáz termelő *E. coli* törzsek arányát határozzák meg élelmiszertermelő állatokból származó mintákból. A 2015 óta végzett kötelező monitorozás során a különböző állatfajok vágóhídon gyűjtött vakbél tartalmát cefotaximot tartalmazó táptalajra oltják az ESBL/AmpC/karbapenemáz termelő *E. coli* törzsek szelektív azonosítása érdekében. A monitorozás részét képező szelektív tenyésztés során kimutatott, feltételezhetően ESBL-termelő *E. coli* törzseket, ill. a nem szelektív talajon tenyésztett, gyógyszerérzékenységi vizsgálatok eredményei alapján cefotaxim/ceftazidim/meropenem-rezisztensnek bizonyuló *E. coli* törzseket egy második ellenőrző vizsgálatnak vetik alá, amely során cefotaxim, cefotaxim+klavulánsav, ceftazidim, ceftazidim+klavulánsav, cefoxitin, cefepim, temocillin, ertapenem, imipenem és meropenem hatóanyagokkal szemben mutatott érzékenységüket vizsgálják. Ez a módszer lehetővé teszi az ESBL, AmpC és karbapenem-rezisztencia fenotípusos meghatározását [5].

Egy nemrégiben közzétett metaanalízisben *E. coli* törzsek 3. generációs cefalosporinokkal szembeni rezisztenciáját vizsgáló közlemények eredményeit összegezték. Megállapították, hogy a rezisztencia előfordulási aránya a beteg sertésekből izolált törzsek esetében lényegesen nagyobb volt, mint a klinikailag egészséges sertésekből származó törzseknél. A cefalosporin-rezisztencia előfordulási aránya országonként jelentős mértékben változott, az európai izolátumoknál pl. <1%-tól 14%-ig terjedt [9]. Ebben a közleményben nem szerepeltek magyarországi adatok.

A különböző enterobacteriumok β -laktamáz-termelése genetikai módszerekkel is vizsgálható. Így lehetőség van pl. a bla_{CTX-M} , a bla_{SHV} , a bla_{TEM} , a $bla_{OXA-1-like}$ génszakaszok PCR-eljárással történő azonosítására. Ez a módszer különösen alkalmas az egyes genetikai elemek különböző populációkon belüli előfordulásának, terjedésének vizsgálatára [10]. Olaszországi sertésállományokból származó *E. coli* törzsek teljes genomszekvenálásával (whole genome sequencing, WGS) megállapították pl., hogy az ESBL-termelő törzsek zöme a $bla_{CTX-M-1}$ -gént hordozta [11].

SAJÁT VIZSGÁLATOK

ANYAG ÉS MÓDSZER

Jelen vizsgálatunk során a laboratóriumunkban 2016 és 2022 között izolált, klinikai hasmenést mutató állatok mintáiból származó egyes *E. coli* törzsek β -laktamáz-termelését vizsgáltuk. Laboratóriumunkban ebben az időszakban közel 2800, sertésekből izolált *E. coli* törzs gyógyszerérzékenységi vizsgálatát végeztük el, amelyek közül 1191-et tárolunk törzsgyűjteményünkben -80 °C-on. A törzsek gyógyszerérzékenységét korongdiffúziós és/vagy mikrohígításos MIC (minimal inhibitory concentration, minimális gátlókoncentráció) vizsgálattal határoztuk meg a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ajánlásai szerint [12, 13]. Jelen vizsgálatunkhoz a legfontosabb kiválasztási kritérium korongdiffúziós vizsgálat esetén a ceftiofur-rezisztencia, MIC-vizsgálat esetén a vizsgálatra alkalmazott lemezek (MICRONAUT-S Large Animals vagy MICRONAUT-S Lifestock / Equines GN; Bruker Daltonics GmbH & Co. KG., Bréma, Németország) kiértékelő szoftvere által meghatározott „feltételezett ESBL-termelés” volt. A két említett gyári MIC-lemez részben eltérő antibiotikumokat tartalmaz, a „Large Animals” lemez esetében az ampicillin- és ceftiofur-rezisztencia és egyidejű amoxicillin+klavulánsav érzékenység, a „Lifestock / Equines” lemez esetében az cefoxitinrezisztencia vagy csökkent érzékenység alapján jelölte meg az értékelő szoftver az adott törzset feltételezett ESBL-termelőnek. A feltételezett ESBL-termelő törzsek a β -laktám antibiotikumokon kívül esetenként 1–7 további hatóanyaggal szemben is rezisztensnek bizonyultak.

A szerzők 2016 és 2022 között izolált, klinikai hasmenést mutató állatok mintáiból származó egyes *E. coli* törzsek β -laktamáz-termelését vizsgálták

Vizsgálták az *E. coli* törzsek fimbria- és toxingénjeit is

Összesen 50 törzset vizsgáltak, amelyek közül 28 származott szopós, 22 pedig választott malacból

Laboratóriumunkban az *E. coli* izolátumok egy része esetében virulenciafaktorok, azaz az F4, F5, F6, F18, F41 fimbriagének, ill. az STa, STb, LT, STx2e toxingének kimutatására irányuló multiplex (m)PCR-vizsgálatot is végzünk [14]. Jelen vizsgálatunkra olyan törzseket választottunk, amelyek esetében ez az információ is rendelkezésre állt. Amennyiben lehetséges volt, egy adott sertésstelepről legfeljebb két szopósmalacból és két választott malacból származó törzset választottunk ki. Mindezeknek a kritériumoknak a törzsgyűjteményünkben 124 *E. coli* törzs felelt meg, közülük ötven β -laktamáz termelését kíséreltük meg igazolni. A törzsek összesen 27 nagyüzemi sertésstelepről származtak (1–4/állomány). A baktérium-törzseket klinikai tüneteket mutató állatokból származó bélsárból (1 db; 2%), vagy végbéltamponból (23 db, 46%), vagy vékonybéltamponból (26 db, 52%) izoláltuk (1. ábra). A vizsgált minták közül 28 (56%) származott szopós malacokból és 22 (44%) választott malacokból. Nem volt szelektív kritérium, de lejegyeztük a kiválasztott törzsek esetében, hogy Columbia-véresagaron mutattak-e β -hemolízist. A szopós malacokból izolált törzsek közül csak 9 (32,1%), míg a választott malacokból izolált törzsek mindegyike β -hemolizáló volt. A szopós malacokból izolált *E. coli* törzsek közül csak 11 rendelkezett a korábban említett virulenciafaktor-gének közül eggyel vagy többel (39,3%), míg a választott malacokból származó törzsek mindegyike ilyen volt.

1. ÁBRA. Colibacillosisban elpusztult 3 hetes szopós malac bélsatornája
A kitágult bélfodri nyirokerek (nyíl) a nyálkahártya felszívó tevékenységének épségére utalnak, vírusfertőzések esetében ez általában nem figyelhető meg

FIGURE 1. Intestines of a 3 weeks old piglet succumbed to colibacillosis
Dilated mesenteric lacteals (arrow) indicate intact absorptive function of the mucosa, which is generally absent in viral infections



A bemutatott feltételek alapján kiválasztott törzseket Columbia-véresagarra oltva kiolvasztottuk, majd az életképesnek bizonyult izolátumokat szintén Columbia-véresagarra oltottuk át, és 16–24 órás friss tenyészetüket vizsgáltuk. A vizsgálatra a kereskedelmi forgalomban kapható MICRONAUT-S β -Lactamases (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG.) lemezeket használtuk a gyártó előírásai szerint. A MIC-meghatározáson alapuló vizsgálat a korábban említett β -laktamáz típusok közül az ESBL, KPC, MBL, D-típusú karbapenemáz, ill. AMP-C-termelés fenotípusos azonosítására alkalmas [15]. A lemezek mélyedéseikben az 1. táblázatban feltüntetett hatóanyagokat és hatóanyag-kombinációkat tartalmazza beszárítva. A kiválasztott törzsek friss tenyészetének egy telepéből 5 ml steril foszfátpufferelt fiziológiás sóoldatban (PBS) 0,5 McFarland hígítású szuszpenziót készítettünk. A baktérium-szuszpénzióból 50 μ l-t 11,5 ml táplevesbe (Mueller–Hinton Broth, cation adjusted; Bruker

**A vizsgálatokat
mikrohígítási
módszerrel végezték**

Daltonics GmbH & Co. KG.) pipettáztunk. A jól homogenizált táplevest egy steril edénybe öntöttük, ahonnan tizenkét csatornás pipettával a mikrotiter lemezek minden mélyedésébe 100 µl-t mértünk. Az így elkészült lemezeket légmentesen záró fóliával lefedtük, és 18–24 órán keresztül 37±1 °C-on inkubáltuk. Az inkubálás végeztével a fóliát óvatosan eltávolítottuk, és a lemezt spektrofotométerrel leolvastuk. A kapott adatok kiértékelésére a MICRONAUT-System szoftvert gyári beállításait használtuk (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG.). Az izolátum fenotípusosan ESBL-termelőnek minősült, ha rezisztens volt ceftazidimre és/vagy cefotaximra és/vagy cefepimre, a növekedése gátolható volt klavulánsav jelenlétében, továbbá az önálló és a klavulánsavval kombinált hatóanyagra vonatkozó MIC-értékeinek hányadosa 8 vagy az feletti volt. Az izolátum fenotípusosan AMP-C-termelőnek minősült, ha rezisztens volt ceftazidimre és/vagy cefotaximra, a növekedése gátolható volt 3-APB jelenlétében, továbbá az önálló és a 3-APB-vel kombinált hatóanyagra vonatkozó MIC-értékeinek hányadosa 8 vagy az feletti volt (1. táblázat).

1. TÁBLÁZAT. A Micronaut-S β-Lactamases (E1-111-040; Bruker Daltonics GmbH & Co. KG.) MIC-lemezen alkalmazott hatóanyagok és hatóanyag-kombinációk, valamint egyes β-laktamázok termelésének fenotípusos igazolására használt kritériumok

TABLE 1. Compounds and combinations thereof used on the Micronaut-S β-Lactamases (E1-111-040; Bruker Daltonics GmbH & Co. KG.) MIC plate, and criteria for phenotypic confirmation of the presence of certain β-lactamases

Hatóanyag / hatóanyag kombináció Compounds and their combinations	Koncentráció tartomány Concentration range (µg/ml)	Rezisztencia fenotípusos igazolása Phenotypic confirmation of resistance
Cefepim (CEP)	1–128	ESBL = MIC _{CEP} / MIC _{CMC} ≥8
Cefepim + klavulánsav (CMC)	0,25/4–32/4	
Cefotaxim (CTX)	1–128	ESBL = MIC _{CTX} / MIC _{C/C} ≥8
Cefotaxim + klavulánsav (C/C)	0,25/4–32/4	
Cefotaxim + 3-APB (CTB)	0,25–32	AMP-C = MIC _{CTX} / MIC _{CTB} ≥8
Ceftazidim (CAZ)	1–128	ESBL = MIC _{CAZ} / MIC _{CZC} ≥8
Ceftazidim + klavulánsav (CZC)	0,25/4–32/4	
Ceftazidim + 3-APB (CZB)	0,25–32	AMP-C = MIC _{CAZ} / MIC _{CZB} ≥8
Ertapenem (ERT)	0,125–0,5	KPC = MIC _{MER} / MIC _{MEB} ≥8
Meropenem (MER)	0,125–128	
Meropenem + 3-APB (MEB)	0,25–32	
Meropenem + EDTA (MEE)	0,25–32	MBL = MIC _{MER} / MIC _{MEE} ≥8
Temocillin (TMO)	32–128	

3ABP: 3-amino-fenil-borát, EDTA: etiléndiamin-tetraecetsav

Az 50 kiválasztott *E. coli* törzs közül 36 esetében lehetett β-laktamáztermelést igazolni

A szopós malacokból származó *E. coli* törzsek 92,9%-a volt ESBL-termelő

EREDMÉNYEK

Vizsgálatunk eredményeit a 2. táblázatban foglaltuk össze. Az 50 kiválasztott *E. coli* törzs közül 36 esetében lehetett β-laktamáztermelést igazolni, az enzim 33 esetben ESBL, két esetben ESBL és AMP-C, egy esetben pedig csak AMP-C volt. KPC, MBL, D-típusú karbapenemáz enzimek jelenlétét vizsgálatunkkal nem lehetett kimutatni. A pozitív minták 20 különböző sertéstelepről származtak (74,1%). A szopós malacokból származó *E. coli* törzsek között jóval nagyobb arányban voltak ESBL-termelők, mint a választott malacokból izolált törzsek között (92,9% vs 45,5%). A virulenciafaktor-génekkal rendelkező és nem rendelkező, ill. a β-hemolízist mutató és nem-β-hemolizáló, szopósmalac-eredetű törzsek között nem volt különbség az ESBL-termelés tekintetében.

2. TÁBLÁZAT. Vizsgálataink eredményei**TABLE 2.** Results of the study

Korcsoport (n)	Szopósmalac				Választott malac				Összesen
	28		22		22		0		
β-hemolízis (βh)	βh+		βh-		βh+		βh-		
	9		19		22		0		
Virulenciagén (vg)	vg+	vg-	vg+	vg-	vg+	vg-	vg+	vg-	
	7	2	4	15	22	0	0	0	
ESBL	6	2	3	14	10	0	0	0	35
AMP-C	0	0	1 + 1*	0	1*	0	0	0	1 + 2*
β-laktamáz-termelő törzs összesen (%)	6 (21,4)	2 (7,1)	4 (14,2)	14 (50)	10 (45,45)	0	0	0	36
	26 (92,85)				10 (45,45)				36 (72)

*Egyidejűleg ESBL- és AmpC-termelő törzs

MEGVITATÁS

Vizsgálatunkban a diagnosztikai munkánk során hasmenéses sertésekből kimutatott *E. coli* törzsek egy részét vizsgáltuk ESBL-termelés szempontjából. A vizsgálatra különböző β-laktám hatóanyagok és hatóanyag-kombinációk esetében megállapítható MIC-értékeken alapuló fenotípus meghatározást alkalmaztunk. Törzsgyűjteményünkben olyan *E. coli* törzseket választottunk ki erre a célra, amelyek esetében a korábban elvégzett korongdiffúziós vagy MIC-vizsgálatok ESBL-termelés gyanúját vetették fel. Eredményeink alapján ezt a gyanút a törzsek 72%-a esetében lehetett igazolni. A fenotípuson alapuló ESBL-azonosítás jelentős mértékben függ az adott baktériumtörzs növekedésétől, enzimtermelésének mértékétől, így esetenként téves negatív eredményt hozhat [15]. Előfordulhat az is, hogy a hosszabb távú fagyasztás hatására csökken a baktériumtörzsekben található, rezisztenciagéneket kódoló plazmidok mennyisége [16]. Mindezek magyarázhatják az ESBL-termelő törzsek feltételezett és tényleges száma közti különbséget. Vizsgálatunk nem tekinthető reprezentatívnak sem a laboratóriumunkba mintát küldő sertéstartó vállalkozások, sem a megbetegedett sertésekből kimutatott *E. coli* törzsek tekintetében. Az ESBL-termelő törzsek hazai elterjedtségére utal ugyanakkor, hogy a pozitív törzsek 20 különböző sertéstelepről származtak, így a vizsgált állományok több, mint 74%-ából ki tudtunk mutatni ESBL-termelő baktériumtörzset. A pozitív minták eloszlását tekintve 26 szopós malacból (92,9%) és 10 választott malacból (45,5%) származó minta esetében igazolódott be β-laktamáz termelés. A szopós malacok esetében túlnyomórészt olyan *E. coli* törzsek álltak rendelkezésünkre a törzsgyűjteményünkben, amelyek nem rendelkeztek virulenciafaktor-génekkkel, ill. nem mutattak β-hemolízist sem. Esetükben az ESBL-termelés gyakori előfordulása alátámasztja azt a megfigyelést, hogy a virulenciafaktorok jelenléte és az antibiotikumrezisztencia előfordulásának gyakorisága „fordítottan arányosak” [9, 10]. A hasmenésben megbetegedett szopós malacokból gyakran semmilyen ismert virulenciafaktorral sem rendelkező *E. coli* törzseket lehet csupán kimutatni, amelyek rendszerint számos hatóanyaggal szemben rezisztensek. Bár ezek tényleges patogenitása kérdéses, jelenlétük a sertésekben (és így a környezetben) a rezisztencia elterjedésére és átvitelének lehetőségére utal.

**A vizsgált állományok
több, mint
74%-ából kimutattak
ESBL-termelő
baktériumtörzset**

A hasmenéses betegségek leküzdéséhez az átgondolt gyógyszerérzékenységi vizsgálat mellett a szopós malacok hatékony állategészségügyi felügyelete is elengedhetetlen

Összefoglalva, vizsgálatunk eredményei alapján a hazai sertésállományokban hasmenéses tünetekkel megbetegedett sertések között széles körben előfordulhatnak kiterjedt spektrumú β -laktamázt termelő *E. coli* törzsek. Elsődlegesen a szopós malacokból izolált *E. coli* törzsek esetében kell különös figyelmet fordítani az ESBL-termelő izolátumok előfordulásának veszélyére. Az Európai Gyógyszerügynökség az antimikrobiális hatóanyagokat az állatgyógyászatban történő alkalmazhatóságuk szerint négy kategóriába sorolja, ezek a „D” (Prudence–Óvatosan), a „C” (Caution–Körültekintően), a „B” (Restrict–Korlátozott) és az „A” (Avoid–Kerülendő) [17]. Szopós malacok terápiarezisztens hasmenésének kezelése esetében merülhet fel pl. a „B” kategóriába tartozó széles terápiás spektrumú cefalosporinok parenterális alkalmazása, ha az elsőként választandó („C” és „D” kategóriás) antibiotikumok alkalmazása nem hozott eredményt. A rutin gyógyszerérzékenységi vizsgálatot ilyen esetekben célszerű kiegészíteni pl. a cefoxitinrezisztencia és / vagy az ESBL-termelés ellenőrzésével (2. ábra). Minden esetben figyelembe kell venni ugyanakkor, hogy az ebben a korosztályban feltételezhetően megbetegedéseket okozó *E. coli* törzsek a legjobb esetben is csak fakultatív patogének, a hasmenéses kórkép kialakításában a malacok kolosztrális védettsége, a környezeti higiénias és klimatikus viszonyok, a fiasztatói menedzsment stb. valószínűleg sokkal lényegesebb szerepet játszanak, mint a laboratóriumi vizsgálattal izolált, gyakran virulenciafaktorokkal sem rendelkező, polirezisztens baktériumtörzsek. Ezért a hasmenéses betegségek leküzdéséhez az átgondolt gyógyszerérzékenységi vizsgálat mellett a szopós malacok hatékony állategészségügyi felügyelete is elengedhetetlen.

2. ÁBRA. ESBL-termelés

fenotípusos szűrése
korongdiffúziós módszerrel

A Müller–Hinton-agaron középre helyezett amoxicillin+klavulánsav (AMC) és a közelébe helyezett β -laktám antibiotikum (ceftiofur FUR, cefquinom, CEQ) korongok körüli gátlási zóna torzulása (ún. kulcslyukjelenség, nyilak) jelzi az ESBL-termelést

FIGURE 2. Phenotypic

confirmation of ESBL-production with disc diffusion

An amoxicillin + clavulanate (AMC) disc is placed between a ceftiofur (FUR) and a cefquinom (CEQ) disc on Muller-Hinton agar. The characteristic distortion of the inhibitory zone („keyhole-effect”, arrows) signals the presence of ESBL-production



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A bakteriológiai és gyógyszerérzékenységi vizsgálatok elvégzéséért köszönetünket fejezzük ki CSUKA EDITNEK és VU ÁGNESNEK.

IRODALOM

1. Bergšpica I, Kaprou G, Alexa EA, Prieto M, Alvarez-Ordóñez A (2020) Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* in Pigs and Pork Meat in the European Union. *Antibiotics* 9:678 <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100678>
2. Deshpande L, Pfaller MA, Jones RN (2000) In vitro activity of ceftiofur tested against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* including extended spectrum beta-lactamase producing strains. *Int J Antimicrob Agents* 15:271–275 [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(00\)00184-9](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(00)00184-9).
3. Hammerum AM, Larsen J, Andersen VD, Lester CH, Skovgaard Skytte TS, Hansen F, Olsen SS, Mordhorst H, Skov RL, Aarestrup FM, Agersø Y (2014) Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother* 69:2650–2657 <https://doi.org/10.1093/jac/dku180>
4. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority), and EMA (European Medicines Agency) (2017) Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals. *EFSA Journal* 15:5017
5. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority) and EMA (European Medicines Agency) (2021) Third joint inter-agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA. *EFSA Journal* 19:6712 164 pp <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6712>
6. Tóth Á, Juhász-Kaszanyitzky É, Mag T, Hajbel-Vékony G, Pászti J, Damjanova I (2013) Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* strains isolated from animal and human clinical samples in Hungary in 2006–2007. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 60:175–185 <https://doi.org/10.1556/AMicr.60.2013.2.8>
7. Balázs B, Nagy JB, Tóth Z, Nagy F, Károlyi S, Turcsányi I, Bistyák A, Kálmán A, Sárközi R, Kardos G (2021) Occurrence of *Escherichia coli* producing extended spectrum β -lactamases in food-producing animals. *AVet* 69:211–215 <https://doi.org/10.1556/004.2021.00036>
8. Bush K, Jacoby GA (2010) Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54:969–976 <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
9. Hayer SS, Casanova-Higes A, Paladino E, Elnekave E, Nault A, Johnson T, Bender J, Perez A, Alvarez J (2022) Global Distribution of Extended Spectrum Cephalosporin and Carbapenem Resistance and Associated Resistance Markers in *Escherichia coli* of Swine Origin – A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Microbiol* 13:853810 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.853810>
10. Renzhammer R, Loncaric I, Roch F-F, Piniør B, Käsbohrer A, Spergser J, Ladinig A, Unterweger C (2020) Prevalence of Virulence Genes and Antimicrobial Resistances in *E. coli* Associated with Neonatal Diarrhea, Postweaning Diarrhea, and Edema Disease in Pigs from Austria. *Antibiotics* 9:208 <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040208>
11. Bonvegna M, Tomassone L, Christensen H, Olsen JE. (2022) Whole Genome Sequencing (WGS) Analysis of Virulence and AMR Genes in Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* from Animal and Environmental Samples in Four Italian Swine Farms. *Antibiotics* 11:1774 <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121774>
12. CLSI (2013) Performance standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard – Fourth Edition. CLSI Document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute
13. CLSI (2018) Performance standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 4th ed. CLSI Supplement VET08. Clinical and Laboratory Standards Institute
14. Casey, TA, Bosworth BT (2009) Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine. *J Vet Diagn Invest* 21:25–30
15. Felhasználói kézikönyv MICRONAUT-S β -Lactamases (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG.), Revision A, 2018 november
16. Koenig GL (2003) Viability of and plasmid retention in frozen recombinant *Escherichia coli* over time: a ten-year prospective study. *Appl Environ Microbiol*. 69:6605–6609 <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6605-6609.2003>.
17. European Medicines Agency (2019) Categorisation of antibiotics in the European Union Answer to the request from the European Commission for updating the scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals. https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf

Közlésre érke.: 2023. febr. 3.