

Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Mcr-1 pozitív *Escherichia coli* törzs első leírása kacsából Magyarországon

TDK dolgozat, 2021.

Szemerits Dóra

Témavezető: dr. Adorján András, egyetemi tanársegéd

Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés.....	4
2.1 E. coli jellemzése.....	4
2.2 Az antibiotikum rezisztenciáról általánosan: típusai, terjedése, jelen korlátozások	5
2.3 Kolisztin jellemzése.....	6
2.4 Az <i>mcr-1</i> rezisztenciagén mechanizmusa	7
2.5 Az <i>mcr-1</i> rezisztenciagén elterjedtsége	8
2.6 One Health szemlélet.....	9
2.7 A kolisztin használatára vonatkozó korlátozások és az érintett iparágak	11
3. Célkitűzések	12
4. Anyag és módszer.....	13
4.1 Mintagyűjtés.....	13
4.2 Baktériumok izolálása	13
4.3 Törzsek molekuláris genetikai vizsgálata	14
4.3.1 PCR (polimeráz láncreakció) ismertetése	14
4.3.2 Templátkészítés.....	14
4.3.3 PCR menete	14
4.3.4 Gélelektroforézis.....	15
4.4 Szekvencia alapú elemzések	16
5. Eredmények.....	18
6. Megbeszélés/Következtetések.....	23
7. Összefoglaló	25
8. Abstract	26
9. Irodalomjegyzék	27
10. Köszönetnyilvánítás	29

1. Rövidítések jegyzéke

- APEC = madár patogén *E. coli*
ExPEC = extraintesztinális *E. coli*
DEC = intesztinális *E. coli*
EPEC = enteropatogén *E. coli*
EHEC = enterohemorrágiás *E. coli*
ETEC = enterotoxikus *E. coli*
EIEC = enteroinvazív *E. coli*
EAEC = enteroaggregatív *E. coli*
DAEC = diffúzan tapadó *E. coli*
AIEC = tapadó-invazív *E. coli*
MIC = minimális gátló koncentráció
MBC = minimális baktericid koncentráció
MPC = mutáció preventív koncentráció
LPS = lipopoliszacharid
SIRS = szisztémás gyulladásoz reakció
PEA = foszfoetanolamin-transzferáz
MCRPEC = *mcr-1* pozitív *E. coli*
CRE = karbapenem rezisztens enterobaktérium
MDR = multirezisztens
WHO = World Health Organization
EMA = Európai Gyógyszerügynökség
HP-CIA = Highest Priority Critically Important Antibioticum
AMEG = AntiMicrobial Expert Group
PCR = polimeráz láncreakció
NGS = Next generation sequencing

2. Bevezetés

Az alábbi dolgozat témája a mobilizálható kolisztin rezisztenciát (mobilized colistin resistance - *mcr-1*) mutató *Escherichia coli* törzs első Magyarországi izolálása. A kolisztint, mint kationos detergensként ható polipeptid antibiotikumot multirezisztens baktériumok okozta kórházi fertőzésekben alkalmazzák. A *mcr-1* rezisztencia megjelenése és ennek a zoonotikus megbetegedést okozó baktériumokban való elterjedése mind a humán-, mind az állategészségügy kiemelt problémáját jelentheti a jövőben. [1]

2.1 *E. coli* jellemzése

Az *Escherichia coli* az *Enterobacteriaceae* családba tartozó, Gram-negatív, 1-2 µm-es pálcika alakú, csillóval és burokkal rendelkező baktérium. Az *Enterobacteriaceae* családban a laktóz pozitív/laktózt bontani képes törzsek közé tartozik. Így a laktózbontó képességet detektálni képes szelektív táptalajokon a táptalaj és a képzett telepek színe ennek megfelelően fog megjelenni. Az egyik gyakran használt ilyen táptalajon, a MacConkey agaron, rózsaszín színű telepeket képez és a táptalaj színe is rózsaszínre változik. [2–4]

Az *E. coli* törzseket a sejtfal ('O') antigénjeik alapján 184 szerocsoportba, csilló ('H') antigénjeik alapján 54 szerotípusba lehet besorolni. Ezeket hagyományosan agglutinációs próbákkal lehet meghatározni, azonban jelenleg rendelkezésre állnak már gén szekvencia analízis alapján működő rendszerek is. [2]

Az *E. coli* széles körben előforduló baktérium, így jelen van a környezetben, a természetes bélflóra alkotásában is részt vesz, mint kommenzalista és hozzájárul a mikrobióta egyensúlyának fenntartásához. Azonban előfordulnak fakultatív és obligát patogén törzsei is, amelyek a bélrendszer és a húgyutak gyulladással járó betegségeit, illetve vérfertőzést, tüdőgyulladást, méhgyulladást, köldökgyulladást, agyhártyagyulladást is okozhatnak. A patogén törzsek nemcsak emlősökben, hanem madarakban is előfordulnak, amelyeket összefoglaló néven madár patogén *E. coli* (Avian Pathogenic *E. coli* - APEC) törzseknek neveznek. Ezek madarakban főként vérfertőzést és a legkülönbözőbb parenchymás szervek gyulladását okozhatják. [2, 3, 5]

Az *E. coli* az okozott megbetegedés helye szerint további csoportokba sorolható, így beszélünk extraintesztinális (extraintestinal *E. coli* - ExPEC) és intesztinális *E. coli* (diarrheagenic *E. coli* – DEC) törzsekről. A DEC törzsek további csoportokba sorolhatók be a hordozott főbb virulenciafaktoraik alapján. Így megkülönböztetünk enteropatogén

(EPEC), enterohemorragiás (EHEC), enterotoxikus (ETEC), enteroinvazív (EIEC), enteroaggregatív (EAEC), diffúzan tapadó (DAEC) és tapadó-invazív (AIEC) *E. coli* törzseket. Bár az egyes törzsek kórszövettani elváltozásai is jellegzetesek, de ezek élő emberekben és állatokon nehezen vizsgálhatók, ellentétben a PCR (polimeráz lánreakció) segítségével végzett génszintű virulenciafaktorok azonosításával. [1, 3, 5]

A fentebbi csoportosítás az emberben okozott elváltozásokat, megbetegedéseket veszi figyelembe. Azonban állatok esetében a csoportok tagjai eltérően viselkedhetnek, így akár csak hordozói lehetnek súlyos emberi megbetegedést okozó patogén törzseknek (ilyen betegség például a szarvasmarha által hordozott EHEC okozta hemolitikus urémiás szindróma emberben). [2, 3]

A baktériumok kórokozó képességéhez szükséges virulenciagének elhelyezkedhetnek kromoszómáisan és extrakromoszómáisan is, mint például plazmidokon. Ez utóbbiak jelentősége nagyobb lehet tekintetbe véve, hogy ezek révén a hordozott információ a baktériumok között nem csak vertikálisan, hanem horizontálisan is terjedésre képes, akár más nemzetségbe tartozó baktériumok között is. Másik gyakori formája lehet a horizontális génterjedésnek a bakteriofágok segítségével történő gén és virulenciafaktor átadás. [6] A kolisztin rezisztenciát kódoló *mcr-1* génről kezdetben azt feltételezték, hogy kromoszómán kódolt, mely megnyugtató volt a nagymértékű állatorvosi felhasználás gyakorlatában is. Azonban kínai kutatók elsőként igazolták, hogy a kolisztin rezisztenciáért felelős gén plazmidon kódolt, így lehetőség van akár gyors rezisztencia átadásra is a baktériumok között. [5, 7]

Esetünkben tehát a plazmidok megléte és típusa a legfontosabb. Ezek a genetikai elemek körkörösek, a citoplazmában helyeződnek, számuk változó. Fontos, hogy a kromoszómától függetlenül replikálódnak, az utódsejtekbe véletlenszerűen kerülnek át, illetve a kromoszómába is integrálódhatnak epizómaként. Az R típusú plazmidok kódolják az antibiotikum rezisztenciát. [6]

2.2 Az antibiotikum rezisztenciáról általánosan: típusai, terjedése, jelen korlátozások

A kemoterápiás szerek hatásával szemben gyakran alakulnak ki különböző rezisztenciamechanizmusok, melyek baktériumok, vírusok, gombák, paraziták, daganatsejtek túlélését szolgálják. Különösen az antibakteriális szerek ellen mutatott rezisztencia növekszik nagy ütemben napjainkban, a túlzott mértékű használat és a tévesen megállapított indikációk miatt. Bár a szelekció eredményeként elkerülhetetlen ezen

mechanizmusok létrejötte, a folyamatos antibiotikum használat miatt kialakult egy szelektációs nyomás, ami jelentősen gyorsítja a folyamatot.

Mára számos rezisztenciamechanizmust leírtak. Ismertek efflux pumpák, melyek kipumpálják az antibakteriális szereket a baktériumsejtből; gyógyszert lebontó és átalakító enzimek; genetikailag módosulhat a target, vagyis a gyógyszer kötőhelye; illetve megváltozhat a baktérium sejtfalának permeabilitása, így már nem tudja felvenni a szert. [6]

A rezisztenciagének átadásának lehetőségei a konjugáció, a transzdukció és a transzformáció. A konjugáció során egy pylussal kapcsolódik egymáshoz a két baktériumsejt, amely génhídon egymásnak képesek átadni különböző géneket. A transzdukció esetén a baktériumokat fertőző bakteriofág adja át az említett genetikai tartalmat. Transzfomáció során a baktériumok a környezetükből vesznek fel géneket, melyek a lizált baktériumsejtekből szabadultak fel. B Az *mcr-1* gén terjedésében a konjugációnak lehet elsődleges szerepe. [1, 8]

Az antibakteriális szerek alkalmazásánál fontos szem előtt tartani a MIC, MBC, MPC értékeket annak érdekében, hogy hatékony legyen a kezelés és ne szelektálódjanak ki rezisztens baktériumtörzsek. A MIC a minimális gátló koncentrációt jelenti. Ez a gyógyszernek az a legkisebb koncentrációja, amely képes a baktériumok szaporodását gátolni. Ebben a koncentrációban a szer gátolja a szaporodást, de még nem öli meg a kórokozókat. A MBC a minimális baktericid koncentrációt jelenti, a gyógyszernek az a legkisebb koncentrációja, ami megöli a baktériumok 99,9%-át. Az MBC mindig magasabb koncentráció érték, mint a MIC. A harmadik érték az MPC, vagyis a mutáció preventív koncentráció. Ez az a koncentráció érték, ami már elég magas ahhoz, hogy megelőzze a rezisztens törzsek kialakulását. A kolisztin a szervezetben képes elérni a MBC-t, anélkül, hogy toxikus lenne a gazdaszervezetre, így a baktericid antibiotikumok közé tartozik. Általánosan minden antibakteriális szer alkalmazásánál igaz, hogy nem csak a MIC, de a MPC értéknél is nagyobb koncentrációt kell elérniük a szervezetben, hogy ne élhessenek túl a gyógyszerrel szemben rezisztenciát mutató törzsek. A kolisztin egy koncentráció függő baktericid szer, így alkalmazásánál arra is kell figyelni, hogy minél nagyobb dózisban, minél rövidebb ideig kapja a beteg. [9]

2.3 Kolisztin jellemzése

A kolisztin egy polipeptid antibiotikum. A polimixinek csoportjába tartozik, melyek szerkezetüket tekintve nem ciklikus polipeptidek keverékei. A *Bacillus polymyxa* és a

Bacillus colistinus baktériumok termelik őket. A keveréket alkotó származékok a polimixin B, a polimixin E és a polimixin M. A kolisztin maga a polimixin E nevű származék. A polimixinek bázikus kationos polipeptidek. A Gram-negatív baktériumok negatív töltésű sejtfalán detergens-szerű hatást fejtenek ki, így azt károsítják, a baktériumsejtek elveszítik integritásukat és felborul a homeosztázisuk. A periplazmatikus réseken átjutva a baktériumok belső membránját is azonos módon károsítja. Ebből látható, hogy az antibiotikum hatásmódja ultragyors, koncentrációfüggő, baktericid. A hatásmód ismeretéből következik, hogy ezt az antibiotikumot minél nagyobb koncentrációban, a lehető legrövidebb ideig kell alkalmazni a rezisztenciamechanizmusok kialakulásának megelőzése miatt. [10–12]

A polimixinek felszívódása nem kedvező, szöveti megoszlásuk pedig mérsékelt, ezért főképp szájon át alkalmazzák őket enterális fertőzésekben. [12]

Hatásmódjukra továbbá jellemző, hogy közömbösítik a Gram-negatív baktériumok sejtfalának LPS (lipopoliszacharid) komponensét, így intravénásan adva megfelelő gyógyszer bakterémia, illetve szepszis és endotoxémia esetén, gátolja a SIRS (szisztémás gyulladásos reakció) kialakulását. A vérben a szövettörmelékekhez, gennyves váladékhoz kötődik. Az intravénás alkalmazás esetén említendő, hogy vesével ürül. Ez azért fontos, mert nephrotoxikus és neurotoxikus vegyület. Így intravénásan adva toxikus lehet, csak életveszélyes fertőzésekben alkalmazzák, melyeket Gram-negatív pálcák, vagy *Pseudomonas* alfajok okoznak. [12–14]

Spektrumát tekintve a korábbiakban említettek értelmében a Gram-negatív baktériumokra hat, az *Enterobacter*, a *Klebsella*, a *Salmonella*, a *Pasteurella*, a *Bordetella*, a *Shigella* és az *Escherichia coli* érzékenyek rá. Nagyon nagy koncentrációban a *S. aureus* ellen is hatékony. [12]

Alkalmazzák tehát parenterálisan életet veszélyeztető nozokomiális fertőzésekben, szájon át enterális fertőzések esetén, illetve helyileg sebfertőzésre, bőrgyulladásra, külső hallójárat gyulladásra, tőgygyulladásra. [12]

2.4 Az *mcr-1* rezisztenciagén mechanizmusa

Az Enterobaktériumok számos törzse mutat rezisztenciát a kolisztinre. Ennek a rezisztenciamechanizmusnak az alapja, hogy a Gram-negatív baktériumok külső membránjának lipopoliszacharid-LPS komponense megváltozik. A megváltoztatott felépítés

már nem teszi lehetővé a polimixinek kötődését, így a baktériumok nem képesek azokat felvenni. Az antibiotikumok detergens hatása így nem érvényesülhet. [10]

Az LPS-nek egy adott része változik meg, a lipid-A alegység. Az *mcr-1* gén azt a fehérjét kódolja, amely enzimként viselkedve alakítja át a lipid-A részt. Ezt a fehérjét a foszfoetanolamin-transzferázok (PEA) családjába sorolják. A PEA a lipid-A 4-foszfát csoportjához kapcsolódik. A kémiai modifikációnak köszönhetően tehát a LPS csökkent affinitást mutat a kolisztinhez. Az *mcr-1* által kódolt fehérje működésének pontosabb részletei még kevésbé ismertek. [8, 10, 15]

Felépítését tekintve az *mcr-1* gén által kódolt fehérje egy integrált membrán fehérje, amely 5 transzmembrán régióval rendelkezik. Olyan konzervált helyek találhatóak rajta, amik szükségesek a katalitikus aktivitáshoz. A transzmembrán régió horganyozza le az enzimet a citoplazmamembrán periplazmatikus oldalára, ahol működését ki tudja fejteni. [10]

Az *mcr-1* fehérje transzmembrán részének a katalitikus aktivitásban betöltött szerepét rezisztencia vizsgálatokkal igazolták. Mutagenezissel módosítva a fehérje adott részeit, az már nem tudta betölteni a szerepét, így az érintett baktérium törzs érzékennyé vált a kolisztinre. Így 5 olyan konzervált rész meglétét igazolták, amelyek esszenciálisak a funkció betöltéséhez. [10]

A *Klebsiella pneumoniae* esetében ez a fehérje kromoszómán kódolt, azonban más Enterobaktériumok között plazmiddal is képes terjedni. [8, 10]

2.5 Az *mcr-1* rezisztenciagén elterjedtsége

Az *mcr-1* rezisztenciagén kialakulása vissza vezethető az 1980-as évekre. A kolisztin rezisztencia kezdetben kromoszómán kódolt volt, majd a plazmidra kerüléssel mobilissá vált. Az első plazmid közvetítette kolisztin rezisztenciagént 2015-ben jelentették, azóta variánsait világszerte detektálták. [15] 2016 január-áprilisában gyűjtött adatok szerint az *mcr-1* gén már 18 országban megjelent. [10] Egy újabb, 2020-as kutatás alapján ma már több, mint 50 országban jelen van. [14]

Az *mcr-1* gén elterjedésének hátterében főként a nagyüzemi, intenzív állattartás áll. [8, 14, 16] Az 1990-es években a kolisztint profilaxisra és hozamfokozásra használták a gazdaságokban. [14] Kína a világ legnagyobb sertés- és baromfihús előállítójaként jelentős szerepet tölt be az állattartó telepekről kiszabaduló rezisztens törzsek elterjedésében. Az is igaz továbbá, hogy a világon itt használják fel a legnagyobb mennyiségű kolisztint. Ennek

eredményeként számos koliszin rezisztens *E. coli* törzsek előfordulását felmérő kutatás Kínában készült. [8]

Egy az említettekhez hasonló kínai felmérésben 2012 és 2016 között szignifikánsan nőtt a kolisztin rezisztens *E. coli* törzsek előfordulásának aránya sertésben, illetve baromfiban is emelkedett. A sertések között terjedő rezisztencia hátterében a nagy hasmenéses fertőzések kolisztinnel való tömeges kezelése állhat. [17]

Másik Kínában készített 7 éves kutatásban szintén sertések, illetve csirkék között vizsgálták az *mcr-1* gén előfordulását 2013 és 2019 között. Azt tapasztalták, hogy 2015-2016 évekig nőtt az *mcr-1* pozitív *E. coli* (MCRPEC) törzsek előfordulása, ezután egy csökkenés következett. Ennek hátterében a kínai kormány által 2017-ben bevezetett korlátozás áll, melyben megtiltották a kolisztin takarmánykiegészítőként, hozamfokozásra való használatát. [14, 18] Az MCRPEC (*mcr-1* pozitív *Escherichia coli*) törzsek arányának csökkenése mutatja a korlátozás eredményességét. [19] Ezt követően 2018-ban Japánban, 2019-ben pedig Malajziában és Indiában is korlátozták a kolisztin felhasználását. [14, 18]

Egy összehasonlító kínai tanulmányban a kolisztin felhasználását korlátozó intézkedések hatását vizsgálták. Ennek szemléltetésére 2015 és 2019 között követték a rezisztencia terjedését. A tiltó intézkedések után mind a kolisztint tartalmazó készítmények előállítását, mind eladása jelentősen csökkent. Kolisztin rezisztens *E. coli* törzsek jelenlétét vizsgálva kórházakban, sertés- és baromfitelepeken azt találták, hogy számuk visszaszorult. [18]

2.6 One Health szemlélet

Mivel a kolisztin ún. "páncélszekrény" antibiotikum, azaz halálos kimenetelű, multirezisztens kórházi fertőzések kezelésére elzárt, az állatorvosok és humánorvosok közös feladata a rezisztencia terjedésének korlátozása. Ez is jó példája a napjainkban egyre inkább elfogadott One Health szemléletnek, mely együtt veszi figyelembe a humán- és állategészségügy problémáit. [11, 14, 17]

A One Health szemlélet értelmében több kutatásban is vizsgálták az *mcr-1* rezisztenciagén előfordulását különböző állatfajokban, illetve a környezetben. A gén ennek megfelelően jelen van az élelmiszerláncban, így kerülhet az emberi szervezetbe is, akár tünetmentes hordozó állatokból, akár az elfogyasztott zöldségek által. [14] A rezisztenciagént hordozó DEC patotípusok súlyos, járványos megbetegedéseket okozhatnak mind a rosszabb higiéniai körülményekkel rendelkező fejlődő, mind a fejlett világban. [3]

A növényi eredetű táplálékok tekintetében több országban is leírták már az *mcr-1* pozitív *E. coli* törzsek jelenlétét. 2016-ban salátából és paradicsomból származó mintákból izolálták Kínában, 2014-ben pedig Svájcban mutatták ki Thaiföldről és Vietnámból származó zöldségekből. [20]

Megjegyzendő, hogy az emberek számára a kedvtelésből tartott társállatok is jelenthetnek fertőzési forrást. [3] A kedvencállatok esetében azonban kisebb az MCRPEC törzsek előfordulásának aránya. Leginkább állati eredetű táplálékkal veszik fel azokat, majd a szorosabb kontaktus miatt tudják átadni gazdáiknak. [14]

A humánorvoslás szempontjából a kolisztin fontos szer a nozokomiális fertőzések kezelésére. Korábban a karbapenemeket alkalmazták erre a célra, ám széleskörű felhasználásuk következtében, megjelentek a karbapenem rezisztens enterobaktérium törzsek (CRE). [7, 11, 14, 15] További problémát jelent, hogy az *mcr-1* gént hordozó plazmidok a *Pseudomonas aeruginosa* törzseiben is megjelenhetnek, ezáltal a kolisztinnel szemben ellenállóvá válik ez a kulcsfontosságú emberi patogén is. [8]

H. Zhang és mtsai. kutatásukban igazolták, hogy az *mcr-1* gén előfordulása *E. coli* törzsekben nem csak a low-level kolisztin rezisztenciában vesz részt, de a high-level kolisztin rezisztens mutánsok kisselektálódását is segíti. Ez fenyegetést jelent a kórházi fertőzések kezelésére. [15]

Egy másik kutatásban Y. Shen és mtsai. összehasonlító genetikai analízist végeztek klinikai fertőzésekből és önként jelentkező emberekből származó székletmintákból. Céljuk az volt, hogy tanulmányozzák az *mcr-1* pozitív *E. coli* törzsek terjedését a kórházakban. A kommenzalista és patogén törzsek plazmidjai genetikai diverzitást mutattak, mégis képesek voltak átadni egymásnak az *mcr-1* gént. Ez arra utal, hogy a gén flexibilitása nagy, így különböző genetikai háttérű gazdáknak is képes jelen lenni. [7]

A nozokomiális fertőzések főleg az immunszupresszált betegek esetében veszélyesek. R. Lalaoui és mtsai. akut leukémiás betegekből izoláltak kolisztin rezisztens *E. coli* törzseket. Immunszupresszió esetén különösen nagy a veszélye az MDR (multirezisztens - multidrug resistant) baktériumokkal való felülfertőződésnek, ezért a leukémiás betegeknél nagyon fontos az antibiotikus kezelés. Az MDR törzsek gyorsan terjednek a beteg populációban, ezért javasolják a rezisztenciagének jelenlétére irányuló gyorsesztek elvégzését a kórházba érkezéskor. [13]

2.7 A kolisztin használatára vonatkozó korlátozások és az érintett iparágak

Az antibiotikum rezisztencia terjedésének mérséklése nemzetközi érdek, így a World Health Organization (WHO) és az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) is kiemelten foglalkozik vele. Ezen szervezetek különböző kategóriákba sorolták az antibakteriális szereket, így korlátozva indikációikat és alkalmazásukat.

A WHO három kategóriába sorolja az antibiotikumokat javasolt alkalmazásuknak megfelelően. Ez a három csoport az ACCES, a WATCH és a REVERSE. Ez utóbbi csoportba tartoznak azok az antibakteriális szerek, amelyeket életmentés céljából alkalmaznak kórházi fertőzések kezelésére. Ezen csoport tagjai a polimixinek, így a kolisztin is. A WHO megnevezése szerint továbbá a kolisztin HP-CIA gyógyszer, azaz Highest Priority Critically Important Antibioticum, melynek alkalmazása különös körültekintést igényel. [18, 21, 22]

Az Európai Gyógyszerügynökség szervezete az AMEG (AntiMicrobial Expert Group) négy kategóriát állapított meg az antibakteriális szerek rendszerezésére. Az AMEG ABCD rendszerében a polimixinek a B kategóriába sorolódnak. A kategória elnevezése a „Restrict”. Ebbe olyan antibakteriális szerek tartoznak, melyeket az állatorvosok napjainkban sajnos még gyakran használnak, pedig nem lenne indokolt a rezisztencia kialakulásának kockázatát figyelembe véve. A kolisztin, bár állatorvosi célra törzskönyvezett és élelmiszertermelő állatnak is adható, ma már csak korlátozottan, kevés indikációra alkalmazható. Adása abban az esetben indokolt, ha nem áll rendelkezésre megfelelő C, illetve D kategóriás szer az adott betegség kezelésére, használatát mindenképpen rezisztencia vizsgálatnak kellene megelőznie. [23]

Az Európai Unió 2019/6-os Rendelete korlátozza az állatorvosi gyógyszerek felhasználását, kiemelt figyelmet fordítva az antibiotikum rezisztenciára. 2022. január 28-ától az antibiotikumok nem használhatóak profilaxisra és hozamfokozásra, csupán gyógykezelés alkalmával, illetve metafilaxis céljából. A kolisztin használatára jelenleg 65%-os csökkentés az előírt cél. [18, 24]

Ez a korlátozás nem kedvez a sertés iparnak, ahol az enterális fertőzéseket okozó sertéspatogén *E. coli* törzsek ellen szájon át alkalmazzák a kolisztint. Főleg az újszülöttkori hasmenés kezelésében fontos szer. Ultragyors baktericid hatása nem adott teret a rezisztens törzsek kiszelektálásának. Ez azonban változott a rezisztencia gének plazmidra kerülésével, ami indokolttá teszi a korlátozások betartását. [1, 18]

Az antibiotikum rezisztencia kialakulásához és elterjedéséhez a baromfi ipar is nagymértékben hozzájárul, hiszen az emberiség húsfogyasztásának a legnagyobb részét a baromfihús teszi ki. A különféle baromfifajták tartása esetén azonban eltérő mennyiségű antibiotikumot használnak fel. A pulykák és a libák intenzív tartásában nagyobb mennyiségű antibiotikum felhasználására van szükség, így bennük hamarabb alakulnak ki rezisztens baktériumtörzsek. A galambok ezzel szemben kevesebb antibiotikumos kezelésben részesülnek, így az ő mikrobiótájuk kevesebb rezisztens törzset tartalmaz. Az antibakteriális szerek felhasználásának korlátozásával tehát várhatóan kevesebb pulykahús fog a fogyasztók rendelkezésére állni. [5]

3. Célkitűzések

Mivel jelenleg Európából nagyon kevés adat elérhető az *mcr-1* rezisztenciagén jelenlétéről és elterjedtségéről, így célunk volt egy több baromfi fajra kiterjedő mintagyűjtés során az *mcr-1* rezisztenciagént Magyarországon elsőként kimutatni. Ezt követően az így izolált törzset részletesebb genetikai elemzéseknek, vizsgálatoknak alávetni.

4. Anyag és módszer

4.1 Mintagyűjtés

A mintákat a Nébih Állatorvosi Diagnosztikai Igazgatóságának (Nébih-ÁDI) Baromfi Osztályán, két baromfi vágóhídon (víziszárnyas és pulyka), két galambtenyésztőtől és egy házi tyúk tartótól gyűjtöttük, összesen öt baromfi fajtaból. Az elhullott állatokból és a vágóhídról származó mintáknál az állatok vakbeléből sterilen vett tampon mintákat gyűjtöttünk. Az élő állatok esetében kloáka tampon mintákat használtunk fel, melyeket aseptikus körülmények között vettünk. A levett mintákat a laboratóriumi feldolgozásig 4 °C-on hűtve tároltuk, maximálisan 3 óra hosszat.

4.2 Baktériumok izolálása

A tampon mintákat az *Enterobacteriaceae* család tagjainak izolálására alkalmas MacConkey szelektív táptalajra oltottuk ki és szélesztettük el, majd 24 órát 37 °C-on inkubáltuk őket.

A MacConkey agar a Gram-negatív, az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumok szelektív és differenciáló izolálására alkalmas. A szelektivitása abban mutatkozik meg, hogy a Gram-pozitív baktériumok, illetve a Gram-negatív törzsek jelentős része nem képes szaporodni rajta. Ezt a tulajdonságát gátlóanyagok teszik lehetővé, úgy mint a kristályibolya és különféle epesavak. A kristályibolya a Gram-pozitív baktériumok szaporodását, míg az epesavak a *Proteus spp.* rajzását gátolják. Erre azért van szükség mert ez utóbbi baktérium benőve a táptalaj felszínének nagy részét jelentősen rontanák a minták értékelhetőségét. A táptalaj egyben differenciáló is, hiszen segít elkülöníteni az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumokat laktózbontó képességük alapján. A táptalaj ennek megfelelően laktózt és neutrálvörös indikátort is tartalmaz. A laktóz pozitív baktériumok képesek lebontani a táptalajban található laktózt. Ezt a tulajdonságukat a neutrálvörös indikátor teszi láthatóvá. A laktózbontó baktériumok anyagcseréje során tejsav keletkezik, így a táptalaj pH értéke csökken. Ezt a változást az indikátor rózsaszín színnel jelzi. Ennek megfelelően a telepek rózsaszínnel jelennek meg a táptalaj felületén, melyek körül az epesavak precipitálódnak, halvány szegélyt alkotva. Ilyen formában megjelenő laktóz pozitív baktérium például az *E. coli*. A laktóz negatív baktériumok közé tartozó *S. Enterica* esetében színtelen telepek képződnek, valamint a táptalaj megtartja eredeti színét. Ennek a magyarázata az, hogy az anyagcsere során képtelen bontani a laktózt, ennek megfelelően nem képződik sav, amit az

indikátor színváltozással jelezhetne. A MacConkey agar tehát esetünkben alkalmas volt a *Salmonella* és az *E. coli* elkülönítésére, ám figyelembe kell venni a lehetőséget, hogy az *E. coli* olyan törzsei is szelektálódhatnak, amelyek elveszítették laktózbontó képességüket, ekkor megjelenésük a *Salmonelláéhoz* hasonló. [3, 4]

A MacConkey táptalajon *Escherichia coli* morfológiájú telepeket tovább oltottuk szintén MacConkey táptalajra tiszta szintenyészet eléréshez. A szintenyészetben nőtt *E. coli* törzseket véres agarra átvittük és 24 órát 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően elsődleges (kataláz és oxidáz teszt) és másodlagos biokémiai tesztekkel (indol, metil-vörös, Voges–Proskauer, citrát hasznosítási próba) igazoltuk, hogy a szintenyészet *Escherichia coli* törzset tartalmaz. A véres agar felületéről Mueller-Hinton levesbe szuszpendáltuk a szintenyészetben lévő már azonosított baktériumokat. Ezt a szuszpenziót 15% glicerinnel összekevertük és -80 °C-ra lefagyasztva tároltuk további felhasználásig.

4.3 Törzsek molekuláris genetikai vizsgálata

4.3.1 PCR (polimeráz láncreakció) ismertetése

A polimeráz láncreakció egy olyan molekuláris genetikai módszer, amely a templát DNS-t felsokszorozni képes, így a genetikai tartalom alkalmassá válik az azonosításra. A reakció 4 lépésben, eltérő hőmérsékleteken zajlik, hőstabil enzimek segítségével. Az amplifikálni kívánt génszakaszt primerek jelölik ki, így specifikusan kiválasztható a vizsgálni kívánt DNS szakasz. Vizsgálatunk célja az volt, hogy megtaláljuk az *mcr-1* gént a mintákban.

4.3.2 Templátkészítés

A PCR vizsgálatok első lépéseként elkészítettük a templátokat. A DNS kinyeréséhez szuszpendálni szükséges a baktériumokat. A templátokat forralásos módszerrel állítottuk elő a szintenyészetekből. Ennek során a szintenyészetben nőtt *Escherichia coli* törzseket 500 µl PCR vízbe szuszpendáltuk, majd Eppendorf csövekben, 9000 rpm (fordulat/perc - round per minute) fordulatszám mellett 2 percig centrifugáltuk őket, ezt követően 96 °C-on 5 percig „forraltuk” a mintákat. A forralást követően a 100 µl felülúszót használtuk a továbbiakban, mint templát.

4.3.3 PCR menete

A PCR működéséhez egy speciális reakcióelegyre, a Master mixre van szükség. Ennek komponensei a következők: a templát DNS (1 µg), a felsokszorozni kívánt szakaszt kijelölő primer pár (0,5 µM mindegyikből), a 72 °C-on működő hő rezisztens Taq polimeráz enzim

(1,25 egység), az új DNS molekulákba épülő dezoxinukleotid-trifoszfátok (dNTP-mix) (0,2 mM mindegyikből), az enzim működését segítő, festékkel jelölt puffer (5 µl), DNáz mentes víz.

A molekuláris genetikai vizsgálatokban az *mcr-1* génszakaszra tervezett primer párt (CLR5F: 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC és CLR5R: 5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG) használtuk, az *mcr-1* pozitív törzsek kiválasztására.

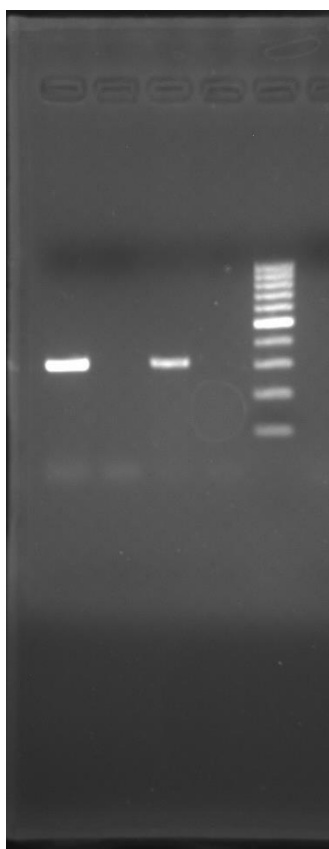
A reakcióelegyek összeállítása során egy negatív kontrollt is készítettünk egy Eppendorf csőbe, a kapott eredmények megbízhatóságának növeléséhez, illetve a hibakeresés megkönnyítéséhez. Ez nem tartalmazza a templát DNS-t, így nem szabad, hogy megtalálható legyen benne a rezisztencia gént kódoló szakasz. A vizsgálatokhoz elengedhetetlen a pozitív kontroll is, ám az első izolálásnál ez még nem állt rendelkezésünkre. Az első PCR biztató eredményei után végzett teljes genom szekvenálást követően a saját *mcr-1* pozitív törzset használtuk pozitív kontrollként a további vizsgálatokhoz.

A reakcióelegy pontos összeállítása után elindítottuk a PCR programját, amely az alábbi lépésekből és paramétereiből állt esetünkben. Az első ciklust megelőzte egy bevezető lépés, amely alatt a reakcióelegyben található DNS-polimeráz aktiválódott és a primerek belépéshez szükséges DNS szálak egymástól elváltak. Ez 94 °C-on történt, 1 percig. Ez után kezdődött a láncreakció 3 lépése. Az első lépés a denaturáció volt, amely 94 °C-os hőmérsékleten, 1 percig tartott. Ekkor a hidrogén-hidak felbomlásával minden ismétlődő ciklusban a DNS-ek két szála egymástól elvált. A második lépésben, az annealing során 51 °C-on kötődtek a primerek a DNS szálak komplementer szakaszaihoz. Ehhez 30 másodperc idő kellett. A harmadik, extenziós lépésben a Taq polimeráz enzim 72 °C-on komplementer DNS szálakat képzett a primerek által kijelölt szakaszhoz képest, 30 másodperc alatt. Ez a három lépés esetünkben 25 ciklusban ismétlődött. A legutolsó ciklust követte a végső extenziós lépés, 72 °C-on, 5 percig, amely alatt az enzim befejezte a megkezdett DNS szálak felépítését. Ezután a gép 4 °C -ra hűtötte és tárolta a reakcióelegyet.

4.3.4 Gélelektroforézis

A kapott amplikonokat 1,5 %-os agaróz gélben futtattuk meg. A gél elkészítésekor a futtató kádnak megfelelő mennyiségű TAE puffert (0,004M Trisz bázis, 0,002M EDTA, 0,02 M ecetsav) kevertünk össze 1,5 %-os agarózzal. A pufferben lévő ecetsav szerepe, hogy egységes töltést biztosít a DNS-nek, az EDTA pedig megköti a szennyeződések. Forralással és homogenizálással folyékony géllé alakítottuk az elegyet, majd 50 °C-ra hűtve

hozzákevertük a nukleotid festéket. Ez etídium-bromid volt, 5 μ l/100 ml koncentrációban. A gélt a futtató kádba öntöttük, majd 20 perc alatt hagytuk megszilárdulni. Ezt követően puffert öntöttünk rá. Az agarózgél zsebeibe 10 μ l PCR-rel lefuttatott mintát mértünk be, majd 110 Volt állandó feszültség és 100bp marker alkalmazása mellett megfuttattuk. Az alkalmazott primer párok alapján 309 bp amplikon hosszúság volt várható. A keletkezett termékeket ultraibolya fény mellett, átvilágító ernyővel tettük láthatóvá. A keletkezett gélképet fényképesen dokumentáltuk. Az elbírálás elméleti háttere, hogy a konstans feszültség mellett, adott idő alatt az egységes töltésű molekulák közül a kisebb méretűek nagyobb távolságra futnak. Az elkülönítés alapja tehát a molekulasúly. (Ábra 1.)



1. ábra: Gélkép *mcr-1* génre tervezett primerrel. Mintasorrend balról jobbra: *mcr-1* pozitív minta, negatív minta, pozitív kontroll, negatív kontroll, 100 bp marker

4.4 Szekvencia alapú elemzések

Mivel *mcr-1* pozitív törzs nem állt rendelkezésre, ezért a pozitívnak ítélt minták esetében az amplikonok pontos génszekvenciáját Sanger szekvenálással állapítottuk meg, kétirányú szekvenálással a BaseClear holland cég által.

Az *mcr-1* pozitívnak talált törzs esetében a Biomi (Gödöllő, Magyarország) cég segítségével teljes genom szekvenálással a teljes génkészletét a baktériumnak meghatároztuk.

A génszintű vizsgálatok során az Unipro Ugene szoftvert és a Galaxy internetes platformot használtuk további elemzésekre és információnyerésre. Génkeresésre a Blast-ot (National Library of Medicine) használtuk.

5. Eredmények

Összesen 332 tampon mintát gyűjtöttünk baromfiból. Mindegyik egyedi mintaként lett véve egy baromfiból. Azonban csak 319 minta (n=35 galamb, n=42 házi tyúk, n=87 kacsa, n=101 lúd, n=54 pulyka) esetében sikerült *Escherichia coli* törzset izolálni és ezt biokémiaailag is igazolni.

A Nébih-ÁDI-ban gyűjtött *E. coli* törzsek galamb (n=1), házi tyúk (n=29), kacsa (n=36), lúd (n=53) és pulykákból (n=4) származtak. A háztájiból gyűjtött *E. coli* törzsek galambból (n=34) és házi tyúkból (n=13) származtak. *E. coli*-t izoláltunk kacsákból (n=51), lúdból (n=48) és pulykákból (n=50) a vágóhidakon. (Táblázat 1.)

	Állat kora	Galamb	Házi tyúk	Kacsa	Lúd	Pulyka	Összesen (db)
Nébih-ÁDI	0-1 hetes		14	27			41
	1-6 hetes			4	26	4	34
	7-16 hetes				13		13
	15 hetes			4			4
	17 hetes-6 hónapos				3		3
	6 hónapos	1					1
	6-12 hónapos				11		11
	1 év feletti		15	1			16
Összesen		1	29	36	53	4	123
	Állat kora	Galamb	Házi tyúk	Kacsa	Lúd	Pulyka	Összesen (db)
Háztáji	fészeklakó	12					12
	3-4 hónapos	8					8
	6 hónapos	4					4
	2-3 éves	10	13				23
	Összesen	34	13				47
	Állat kora	Galamb	Házi tyúk	Kacsa	Lúd	Pulyka	Összesen (db)
Vágóhid	14 hetes			51			51
	16 hetes				48		48
	20 hetes					50	50
	Összesen			51	48	50	149
Összesen		35	42	87	101	54	319

1. táblázat: Gyűjtött minták összesítése gyűjtési hely, állatfaj és életkor szerint

Az összes gyűjtött minta esetében egy esetben sikerült *mcr-1* génre pozitívnak minősíthető *Escherichia coli* törzset kimutatni. Ez egy 5-6 napos elhullott kacska vakbeléből került izolálásra. Ezen törzs esetében a kapott amplikon szekvenciáját Sanger szekvénálással is meghatároztuk. Az amplikonokra kapott szekvenciákat összehasonlítva a NCBI adatbázisában fellelhető adatokkal megállapítható volt, hogy mindkét irányú leolvasás ráillett a *mcr-1* génre és közel 100%-ban egymásnak megfeleltethetők voltak a kapott szakaszok. (Táblázat 2.)

Bázis sorrend	Lefedettség	Azonosság	Bázis eltérés
3'GACGTGCCATAGTGTCAGTAAATAACTGGTCAC CGCGCCCATGATTAATAGCAAAATCAACACAGGC TTTAGCACATAGCGATACGATGATAACAGCGTGG TGATCAGTAGCATCGCGCCAAAGAGCACGACAGC GATCGTCAGCACAAAGCCGAGATTGTCCGCGATG GGATAGGTTTGGCTGATTTTATCAAAAAAGGTAA GATTGGCGGTTCGCGGTCAAGAAAACGGCAACACT CGCCACAAGAACAAMGGACTGACCAGCAACACCT TTCRATGTTTGATAAATCGGCAAACCTATCCAACA CGMATATCTTGGTTTGTGTGAAATGSTGTCCGTTT TTGAGGCTAGCTWTCCWAAGGTTTTAATCCTAGT CYTGGTTTTAAGGGTGTGTGTCWTCCTTATAAGW CCMGCCGYGCGACAGGTATTKATGTTTTTTTAGC TGGTCTATGATYTGACGATCTTCATTATCCCCAAA ACCAAACGAAAAYTTTTTTACCTTCCCCCTATTC CCACCTCMTCTT-5'	49,80%	99,60%	1
5'GGGTTCTGACGCGACGCMATCTTACCTTTTTTGA TAAAATCAGCCAAACCTATCCCATCGCGGACAAT CTCGGCTTTGTGCTGACGATCGCTGTCGTGCTCTT TGGCGCGATGCTACTGATCACCACGCTGTTATCAT CGTATCGCTATGTGCTAAAGCCTGTGTTGATTTTG CTATTAATCATGGGCGCGGTGACCAGTTATTTTAC TGACACTTATGGCACGGTCTATGATACGACCATGC TCCAAAATGCCCTACAGACCGACCAAGGAATTGC TWWAAATGCTGCCTCMGGTTTGATCTGGTTCTTC TGGAKGAAGCTTTTCTTGCTGGAGGAGCWWGCTC CGTTGGSTGGTTGGGSGYGTGGGTGRYCCGTCCTT CTTGKTTTGCTTCGCTTCTTTTTTTAGTAATTGTTG TCCACCGTATTTTGCTCTGTGGGGTWTTKGGGAG AAGATAATCAAAGTATCCTT-3'	56.7%	99,60%	1

2. táblázat: Sanger szekvenálás bázis sorrendjének összehasonlítása *Escherichia coli* (CP080254.1) *mcr-1* plazmiddal

Az NGS (Next generation sequencing) során a bakteriális DNS bázissorrendjét 1408067 szekvencia darabban sikerült meghatározni. A szekvenciák döntő többsége (1074599 db –

76,32% és 1090568 db – 77,45%) 250 bázisnál hosszabb volt. A Galaxy szoftver (SPAdes) által ebből összesen 209 contig-ot sikerült összeállítani, amelyből az első tíz contig 568083 és 166358 bázis hosszúság között volt. Az ABRicate alkalmazás segítségével a Resfinder adatbázist felhasználva számos antibiotikum rezisztenciagént sikerült beazonosítani a baktérium genomjában. (Táblázat 3.)

Contig	Kezdő	Vég	Gén neve	Lefedettségi	Lefedettségi (%)	Azonosság (%)	Regisztrációs száma	Rezisztencia gének
	pozíció							
39	27421	29046	<i>mcr-1.1_1</i>	1-1626/1626	100,00	100,00	KP347127	Kolisztin
6	26127	27359	<i>mdf(A)_1</i>	1-1233/1233	100.00	98.70	Y08743	Több csoportban szerepet játszik
60	565	1366	<i>ant(3'')-Ia_1</i>	171-972/972	82.51	99.75	X02340	Sztreptomicin
60	1449	2708	<i>cmlA1_1</i>	1-1260/1260	100.00	99.92	M64556	Klóramfenikol
60	2970	3771	<i>aadA2_1</i>	18-819/819	97.92	100.00	NC_010870	Sztreptomicin
60	4169	4666	<i>dfrA12_8</i>	1-498/498	100.00	100.00	AM040708	Trimetoprim
69	707	1953	<i>tet(A)_6</i>	1-1247/1275	97.80	100.00	AF534183	Doxiciklin, Tetraciklin
70	846	2765	<i>tet(M)_8</i>	1-1920/1920	100.00	96.15	X04388	Doxiciklin, Tetraciklin, Minociklin
74	897	2110	<i>floR_2</i>	1-1214/1215	99.92	99,92	AF118107	Klóramfenikol, Flórfenikol
75	75	866	<i>sul3_2</i>	1-792/792	100.00	100.00	AJ459418	Szulfometoxazol
77	132	788	<i>qnrS1_1</i>	1-657/657	100.00	100.00	AB187515	Ciprofloxacín
81	864	1724	<i>blaTEM-106_1</i>	1-861/861	100.00	99.88	AY101578	Több csoportban szerepet játszik
98	11	826	<i>sul2_2</i>	1-816/816	100.00	100.00	AY034138	Szulfometoxazol

3. táblázat: Az *mcr-1* pozitív törzs genomjában található antibiotikum rezisztenciagének összesítése

Az így beazonosított rezisztenciagének közül az *mcr-1* is megtalálható a 39-es contigon, amely 32484 bázis hosszúságú. Ezt a contigot összehasonlítva az NCBI adatbázisban tárolt szekvenciákkal számos már leírt *mcr-1* kódoló plazmiddal 99-100%-os lefedettséget és közel 100%-os azonosságot lehetett felfedezni. Így elmondható, hogy az *mcr-1* gént kódoló plazmidot teljes egészében sikerült összeállítani és meghatározni az általunk izolált baktérium esetében is. (Táblázat 4.)

Génszakasz	Lefedettségi	Azonosság (%)
Escherichia coli strain MFDS2254 plasmid pMFDS2254.1	100%	99.98
Escherichia coli strain MFDS2258 plasmid pMFDS2258.1	100%	99.98
Escherichia coli strain MFDS1300 plasmid pMFDS1300.1, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain MFDS1318 plasmid pMFDS1318.1, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain CFSAN061769 plasmid pCFSAN061769_01, complete sequence	100%	99.98

Escherichia coli strain T71115 plasmid pIBMC_mcr1, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain MFDS1029 plasmid pMFDS1029.1, complete sequence	100%	99.98
Klebsiella pneumoniae strain 1525_17_B1 plasmid pMCR_1525_B1, complete sequence	99%	99.98
Escherichia coli strain MFDS1310 plasmid pMFDS1310.1, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain 1139_17_A1 plasmid pMCR_1139_A1, complete sequence	99%	99.98
Escherichia coli plasmid pMCR-1_Msc, complete sequence	100%	99.97
Escherichia coli strain WCHEC1618 plasmid pMCR_WCHEC1618, complete sequence	100%	99.97
Escherichia coli strain 1413_17_E1 plasmid pMCR_1413_E1, complete sequence	99%	99.97
Escherichia coli strain WCHEC1606 plasmid pMCR_WCHEC1606, complete sequence	100%	99.96
Escherichia coli strain 1525_17_D1 plasmid pMCR_1525_D1, complete sequence	99%	99.97
Escherichia coli strain 1449_17_C1 plasmid pMCR_1449_C1, complete sequence	99%	99.97
Escherichia coli strain 1253_17_A2 plasmid pMCR_1253_A2, complete sequence	99%	99.96
Escherichia coli strain DIB-1 plasmid pDIB-1, complete sequence	100%	99.96
Escherichia coli strain 1138_17_D1 plasmid pMCR_1138_D1, complete sequence	99%	99.94
Escherichia coli strain NMG38 plasmid pMCR-NMG38, complete sequence	100%	99.95
Escherichia coli O176:H45 strain MIN9 plasmid pMUB-MIN9-MCR, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain LHM10-1 plasmid pLHM10-1-MCR-1, complete sequence	100%	99.94
Escherichia coli strain LHM10-1 plasmid pLHM10-1-mcr-1, complete sequence	100%	99.93
Escherichia coli strain 2016C-3936C1 plasmid pMCR-1-CT, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain 31349 plasmid p31349, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain Mcp0271 plasmid pMcp0271, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain GD-8 plasmid pECGD-8-33, complete sequence	100%	99.95
Escherichia coli strain B65 plasmid pEJCS-B65-33, complete sequence	100%	99.81
Salmonella enterica strain SLR1_8245 plasmid pS8245-3, complete sequence	100%	99.96
Escherichia coli strain NCYU-29-19 plasmid pNCYU-29-19-1_MCR1, complete sequence	100%	99.74
Escherichia coli strain 1138_17_A1 plasmid pMCR_1138_A1, complete sequence	100%	98.91
Klebsiella pneumoniae strain 1525_17_C2 plasmid pMCR_1525_C2, complete sequence	99%	99.98
Salmonella enterica subsp. enterica serovar California strain SL01 plasmid pMCR-1, complete sequence	100%	99.94

Escherichia coli strain CFSAN064036 plasmid pGMI17-004_2, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain O177:H21 plasmid unnamed4, complete sequence	100%	99.94
Escherichia coli genome assembly, plasmid: 1	100%	99.96
Escherichia coli genome assembly, plasmid: 1	100%	99.96
Escherichia coli strain MDR_56 plasmid pMCR1-NY, complete sequence	100%	99.99
Escherichia coli strain EF7-18-51 plasmid pEF7-18-51_2, complete sequence	100%	99.96
Escherichia coli strain QEC11-421 plasmid pEcQE11-421-5, complete sequence	100%	99.99
Salmonella enterica strain SLR1_8250 plasmid pS8250-2, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli O7:H4 strain MIN14 plasmid pMUB-MIN14-MCR, complete sequence	100%	99.94
Escherichia coli 2017.19.01CC plasmid p2017.19.01CC DNA, complete genome	100%	99.95
Escherichia coli strain 1506 plasmid p1506-3-mcr, complete sequence	100%	99.95
Escherichia coli strain CDF8 plasmid pCDF8, complete sequence	99%	99.99
Escherichia coli plasmid pEC15-101mcr DNA, complete sequence	100%	99.99
Escherichia coli B2 plasmid pB2 DNA, complete sequence	100%	99.99
Klebsiella pneumoniae plasmid pRYU3223C-1 RYU 3223 DNA, complete sequence	100%	99.99
Escherichia coli strain PF52 plasmid pPF52, complete sequence	100%	99.99
Escherichia coli strain PF91 plasmid pPF91, complete sequence	100%	99.99
Escherichia coli strain E15004 plasmid pE15004, complete sequence	100%	99.99
Escherichia coli strain EC1283 plasmid pEC1283, complete sequence	100%	99.99
Escherichia coli strain EC1280 plasmid pEC1281, complete sequence	100%	99.99
Escherichia coli strain EC1279 plasmid pEC1279, complete sequence	100%	99.99
Escherichia coli strain EC1281 plasmid pEC1281, complete sequence	100%	99.99
Klebsiella pneumoniae strain KP-6884 plasmid pMCR1.2-IT, complete sequence	100%	99.99
Escherichia coli strain E648 plasmid pE648MCR-1, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli A2 plasmid pA2 DNA, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli A1 plasmid pA1 DNA, complete sequence	100%	99.98
Salmonella enterica strain SH15G2167 plasmid pSH15G2167, complete sequence	100%	99.98
Salmonella enterica strain SH15G1397 plasmid pSH15G1397, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain P744T plasmid pP744T-MCR1, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain GZ49260 plasmid pGZ49260, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain CSZ4 plasmid pCSZ4, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain OW3E1 plasmid pOW3E1, complete sequence	100%	99.98
Escherichia coli strain FS170G plasmid pFS170G, complete sequence	100%	99.98

4. táblázat: A saját törzs *mcr-1* gént hordozó plazmidjének összehasonlítása már korábban leírt plazmidokkal

6. Megbeszélés/Következtetések

Az öt féle baromfi fajtából gyűjtött minták esetében sikerült plazmidon kódolt kolisztin rezisztenciát hordozó (*mcr-1* pozitív) törzset izolálni. Magyarországon eddig nincsen adat arról, hogy állatból sikerült volna ilyen rezisztenciát hordozó *E. coli* törzset izolálni. Ezért elmondható, hogy elsőként sikerült egy *mcr-1* pozitív *E. coli* törzset izolálnunk Magyarországon kacsából. A kimutatásunkat többféle módszerrel: PCR, Sanger szekvenálás, NGS szekvenálás is elvégeztük, a kapott eredmény validálása érdekében.

A teljes genom meghatározás alapján elmondható, hogy az izolált törzs nem csak egyféle antibiotikum rezisztenciát hordoz, hanem legalább 5 félé, ami alapján a törzs multirezisztensnek is minősíthető. A szekvenációelemzés további lényeges tulajdonságok meghatározását teszi majd lehetővé, valamint lehetőséget teremt további virulencia faktorok felderítésében is, ami nem része a jelen dolgozatnak.

Az elhullott és *mcr-1* pozitív *E. coli* törzset hordozó kacska a boncolás alapján kelésgyengének volt minősíthető. Így a fiatal kora és elhullás körülményei alapján kicsi a valószínűsége egy esetlegesen alkalmazott antibiotikum kezelésnek. Valamint elmondható, hogy mivel multirezisztens törzsről van szó, így a baktériumban jelen lévő rezisztenciák már az *E. coli* törzs bekerülésekor ott kellett lennie. Sajnálatos módon az állatok gyógyszeres kezelésére vonatkozó információk a legtöbb esetben nem beszerezhetők, mert a telepek saját maguk védelme érdekében erről nem szeretnek nyilatkozni. Már csak azért sem, mert egy kutatási eredményben való ilyen szereplés rossz fényt vethet rájuk vagy későbbi gazdasági veszteséggel is járhat.

Az ilyen fiatal korban már jelenlévő multirezisztens törzsek esetén számunka felmerül a kérdés, hogy a jelenlétük a kelésgyengeségnek és az immunrendszer gyengeségének tudható be, vagy már a kelést követően megjelennek a béltraktusban és az állományban a későbbiek folyamán elterjednek. Ezzel is csökkentve az esetleges gyógykezelések hatékonyságát, akár a rezisztenciagének más baktériumok számára horizontális géntranszfer révén való átadásával. További kérdésként felmerül számunkra ilyen esetben a hordozott törzs eredete is, hogy honnan került a már kikelt kiskacsába. Ez utóbbi kérdések megválaszolása további kutatások folytatását szorgalmazza, amelynek során további hasznos információk nyerhetők egy ritka törzs terjedéséről, illetve a multirezisztens törzsek hatásáról a felneveléssel kapcsolatosan.

Összegezve elmondható, hogy egy ritka törzs első izolálását sikerült végrehajtanunk Magyarországon állatokból, amely további érdekes kutatási lehetőségeket vett fel a rezisztenciagénekkel és azok terjedésével kapcsolatban.

7. Összefoglaló

Az *Escherichia coli* egy széles körben előforduló baktérium és számos állatfajban a normális bélflóra alkotója. Azonban léteznek patogén és így megbetegedést okozó *E. coli* törzsek is. Az *E. coli* széleskörű előfordulása és változékonysága lehetőséget ad arra, hogy számos virulencia és antibiotikum rezisztenciagént hordozzon. Ezen géneket aztán akár horizontális géntranszfer révén a vele együtt előforduló más baktérium törzseknek is képes átadni.

Az *mcr-1* gén által plazmidon kódolt kolisztin rezisztencia is ezek közé tartozik. A kolisztin, másik nevén polimixin E, a polipeptidek csoportjába tartozó kationos antibiotikum. Jelentőségét mutatja, hogy multirezisztens törzsek okozta kórházi fertőzések kezelésére fenntartott szer. Mint a legtöbb antimikrobiális kemoterapeutikum alkalmazása esetén, itt is kialakult a rezisztencia, melynek következtében egyes gyógyszerek hatástalanná váltak a korábban érzékeny baktériumokkal szemben. A kolisztin rezisztencia főként az *Enterobacteriaceae* családban terjed. Korábban számos országban leírták a rezisztenciagén jelenlétét, főképp sertésben. A gén terjedésének jelentősége nagy, hiszen zoonotikus fertőzéseket okozó baktériumokban van jelen. Magyarországon ennek a gennek az állatokban való előfordulását eddig még senki sem mutatta ki, ezért célunk volt az 5 leggyakoribb baromfifajból gyűjtött mintáinkban ennek jelenlétét is igazolni.

Összesen 332 vakbél tampon mintát gyűjtöttünk libából, kacsából, pulykából, házityúkból és galambból. Ezekből 319 *E. coli* törzset sikerült izolálni. Az így gyűjtött minták esetében, egy kacsából származó *E. coli* bizonyult *mcr-1* gént hordozónak a PCR-rel végzett vizsgálatok során. A *mcr-1* gén jelenlétére gyanús amplikon, a Sanger szekvenciánálás alapján megállapított bázisrendje alapján valódi *mcr-1* gennek bizonyult. Ezen baktériumtörzs teljes genom szekvenálása szintén ezt igazolta, más antibiotikum rezisztenciagének jelenléte mellett. Így egy multirezisztensnek mondható és *mcr-1* gént hordozó törzs került általunk izolálásra.

Elmondható, hogy Magyarországon elsőként sikerült állati mintából plazmidon kódolt kolisztin rezisztens (*mcr-1* pozitív) *E. coli* törzset izolálni. A törzs további jellemzése jövőbeni munkák alapját képezi, így ezen információk még nem lehetnek részei a jelen dolgozatnak.

8. Abstract

Escherichia coli is a widely distributed bacterium and it takes part in the establishment of the normal intestinal flora. Nonetheless, several *E. coli* strains are pathogenic and cause illnesses. Its wide distribution and its genom's plasticity give chance harbouring several virulence and antibiotic genes. These genes can be spread between cohabiting bacterial species with horizontal gene transfer.

Plasmid encoded colistin (*mcr-1*) resistance gene is belong to this group. Colistin or polymixin E is a cationic polypeptid antibiotic. Hospitals reserve colistin as a last resort antibiotic against multiresistant bacteria. However, resistance against colistin emerged similarly for another antibiotics and made drugs ineffective against these bacteria. Colistin resistance spread mainly in the *Enterobacteriaceae* family. This resistance gene was written down in several countries, mainly in pigs. The spreading of *mcr-1* is important because zoonotic bacteria can harbour it. In Hungary nobody wrote down the existence of this gene yet. Therefore, our aim was to investigate five mostly kept poultry species about the *mcr-1* carrying status.

Altogether, we collected 332 cloacal swabs from goose, duck, turkey, chicken and pigeon. We isolated 319 *E. coli* strains from them. We found only one duck sample was suspicious for *mcr-1* gene by PCR. Our suspicion was verified by Sanger sequencing and investigation of the got amplicon base sequence. The whole genom sequencing confirms further it beside another antibiotic resistance gene harbouring. Therefore, our strains was *mcr-1* carrying multidrug resistant *E. coli*.

Main result of this study that we could firstly isolate and describe plasmid encoded colistin (*mcr-1*) resistant *E. coli* from farm animal. The comprehensive examination of the genom will serve the base of future study, thus these informations cannot be the part of this manuscript.

9. Irodalomjegyzék

1. Guo L, Wang J, Wang S, Su J, Wang X, Zhu Y (2020) Genome characterization of *mcr-I*-positive *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in China. *Front Vet Sci* 7:503 <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00503>
2. Adorján A, Makrai L, Könyves L, Tóth I (2021) Enteropatogén *Escherichia coli* (EPEC): Rövid irodalmi összefoglaló. *MÁL* 143:429-438
3. Mohácsi L (2020) Atipikus enteropatogén *Escherichia coli* törzsek előfordulása hazai vízibaromfi- és pulykaállományokban. 2020- as TDK konferencia dolgozat.
4. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR (1994) Enterobacteriaceae. In: Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR (eds) *Clinical veterinary microbiology*. Elsevier Health Sciences, London, pp 209-236
5. Adorján A, Thuma Á, Könyves L, Tóth I (2021) First isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* from geese (*Anser anser domestica*) and first description of atypical EPEC from turkeys and pigeons in Hungary. *BMC Vet Res* 17:263 <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02968-w>
6. Gálfi P, Csikó G, Jerzsele Á (2015) I.7. A rezisztencia. In: Gálfi P (ed) *Állatorvosi gyógyszerteran III., Második, javított kiadás*. Robbie-Vet Kft, Budapest, pp 78–86
7. Shen Y, Wu Z, Wang Y, Zhang R, Zhou H-W, Wang S, Lei L, Li M, Cai J, Tyrrell J, Tian G-B, Wu C, Zhang Q, Shen J, Walsh TR, Shen Z (2018) Heterogeneous and flexible transmission of *mcr-I* in hospital-associated *Escherichia coli*. *mBio* 9:e00943-18 <https://doi.org/10.1128/mBio.00943-18>
8. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu L-F, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu J-H, Shen J (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16:161–168 [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
9. Gálfi P, Csikó G, Jerzsele Á (2015) I.2. Az antibakteriális szerek hatékonyságának jellemzése: minimális gátló koncentráció (MIC), a minimális baktericid koncentráció (MBC) és a mutáció preventív koncentráció (MPC). In: Gálfi P (ed) *Állatorvosi gyógyszerteran III., Második, javított kiadás*. Robbie-Vet Kft, Budapest, pp 70
10. Gao R, Hu Y, Li Z, Sun J, Wang Q, Lin J, Ye H, Liu F, Srinivas S, Li D, Zhu B, Liu Y-H, Tian G-B, Feng Y (2016) Dissemination and mechanism for the *MCR-1* colistin resistance. *PLoS Pathog* 12:e1005957 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005957>
11. Papa-Ezdra R, Grill Diaz F, Vieytes M, García-Fulgueiras V, Caiata L, Ávila P, Brasesco M, Christophersen I, Cordeiro NF, Algorta G, Galiana A, Vignoli R (2020) First three *Escherichia coli* isolates harbouring *mcr-I* in Uruguay. *J Glob Antimicrob Resist* 20:187–190 <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.016>
12. Gálfi P, Csikó G, Jerzsele Á (2015) II.9.1. Polipeptid antibiotikumok: bacitracin és polimixinek. In: Gálfi P (ed) *Állatorvosi gyógyszerteran III., Második, javított kiadás*. Robbie-Vet Kft, Budapest, pp 206-209
13. Lalaoui R, Djukovic A, Bakour S, Sanz J, Gonzalez-Barbera EM, Salavert M, López-Hontangas JL, Sanz MA, Xavier KB, Kuster B, Debrauwer L, Ubeda C, Rolain J-M (2019) Detection of plasmid-mediated colistin resistance, *mcr-I* gene, in *Escherichia coli* isolated from high-risk patients with acute leukemia in Spain. *J Infect Chemother* 25:605–609 <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2019.03.007>
14. Xiaomin S, Yiming L, Yuying Y, Zhangqi S, Yongning W, Shaolin W (2020) Global impact of *mcr-I*-positive Enterobacteriaceae bacteria on “one health.” *Crit Rev Microbiol* 46:565–577 <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1812510>

15. Zhang H, Zhao D, Quan J, Hua X, Yu Y (2019) *Mcr-I* facilitated selection of high-level colistin-resistant mutants in *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 25:517.e1-517.e4
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.12.014>
16. Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C (2016) Early emergence of *mcr-I* in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect Dis* 16:293 [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00061-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00061-X)
17. Liu J-Y, Liao T-L, Huang W-C, Liu Y-M, Wu K-M, Lauderdale T-L, Tsai S-F, Kuo S-C, Kuo H-C (2020) Increased *mcr-I* in pathogenic *Escherichia coli* from diseased swine, Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 53:751–756 <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2018.10.011>
18. Wang Y, Xu C, Zhang R, Chen Y, Shen Y, Hu F, Liu D, Lu J, Guo Y, Xia X, Jiang J, Wang X, Fu Y, Yang L, Wang J, Li J, Cai C, Yin D, Che J, Fan R, Wang Y, Qing Y, Li Y, Liao K, Chen H, Zou M, Liang L, Tang J, Shen Z, Wang S, Yang X, Wu C, Xu S, Walsh TR, Shen J (2020) Changes in colistin resistance and *mcr-I* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. *Lancet Infect Dis* 20:1161–1171 [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30149-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30149-3)
19. Liu Y-Y, Zhou Q, He W, Lin Q, Yang J, Liu J-H (2020) *Mcr-I* and plasmid prevalence in *Escherichia coli* from livestock. *Lancet Infect Dis* 20:1126 [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30697-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30697-6)
20. Manageiro V, Jones-Dias D, Ferreira E, Caniça M (2020) Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-I*) in *Escherichia coli* from non-imported fresh vegetables for human consumption in Portugal. *Microorganisms* 8:429 <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030429>
21. WHO updates essential medicines list with new advice on use of antibiotics, and adds medicines for hepatitis C, HIV, tuberculosis and cancer. <https://www.who.int/news/item/06-06-2017-who-updates-essential-medicines-list-with-new-advice-on-use-of-antibiotics-and-adds-medicines-for-hepatitis-c-hiv-tuberculosis-and-cancer>. Accessed 4 Oct 2021
22. WHO releases the 2019 AWaRe Classification Antibiotics. <https://www.who.int/news/item/01-10-2019-who-releases-the-2019-aware-classification-antibiotics>. Accessed 4 Oct 2021
23. AMEG (2021) Categorisation of antibiotics in the European Union. In: European Medicine Agency: Science, Medicines, Health
https://www.ema.europa.eu/en/documents/presentation/presentation-ameg-categorisationof-antibiotics-european-union-g-moulin-ameg_en.pdf
Accessed 4 Oct 2021
24. EUR-Lex - 32019R0006 - EN - EUR-Lex
Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC
<https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2019/6/oj>
Accessed 4 Oct 2021

10. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm dr. Adorján András témavezetőmnek, hogy részt vehettem a tudományos munkában. Köszönöm a lelkes tanítását, biztatását és a munka során nyújtott segítségét.

Valamint köszönöm dr. Fodor Lászlónak a szívélyes fogadtatást a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszéken. Hálás vagyok a tanszék valamennyi munkatársának a segítségéért.

További köszönet illeti a Kutató Intézet munkatársait, dr. Szmolka Annamáriát és az Enterális bakteriológia és alimentáris zoonózis témacsoport tagjait.

Köszönöm szeretteim biztatását és támogatását.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Adorján András, mint témavezető nyilatkozom, hogy Szemerits Dóra állatorvostan-hallgató „*Mcr-1* pozitív *Escherichia coli* törzs első leírása kacsából Magyarországon” c. dolgozata részt vehet az Állatorvostudományi Egyetem 2021. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján.

Budapest, 2021 10. hó 12. nap.



témavezető

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: SZEMENITS DÓRA
Elérhetőség (e-mail cím): szements.dora@gmail.com
A feltöltendő mű címe: MCR-1 POZITIV ESCHERICHIA COLI TÖRZS ELSŐ
LEIKALSA KACSABÓL MAGYARORSZÁGON
A mű megjelenési adatai: -
Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatssa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2021 . év¹⁰.....hó¹³.....nap

Szemerits Dóra

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

NYILATKOZAT

Alulírott SZEMERITS DÓRA nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe MCR-1 POZITÍV ESCHERICHIA COLI TÖRZS ELSŐ
LEÍRÁSA KACSABÓL MAGYARORSZÁGON..... tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2021..... évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023. 10. 24......

Szemerits Dóra
SZEMERITS DÓRA
a hallgató neve és aláírása



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Szemerits Dóra

Neptun-kódja: Y1PYJE

A témavezető neve és beosztása: Dr. Adroján András, egyetemi adjunktus

Tanszék: Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

A diplomadolgozat címe: Mcr-1 pozitív Escherichia coli törzs első leírása kacsából Magyarországon

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	02	15	Kézirat szerkesztése	<i>[Signature]</i>
2.	2023	04	11	Kézirat szerkesztése	<i>[Signature]</i>
3.	2023	05	8	Anyag további bővítése	<i>[Signature]</i>
4.	2023	05	25	Új adatok vizsgálata	<i>[Signature]</i>
5.	2023	06	22	Eredmények értékelése	<i>[Signature]</i>

Érdemjegy az első félév végén: 5 (jeles)

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	08	02	Kézirat bevezetőjének elkészítése	<i>[Signature]</i>
2.	2023	08	16	Anyagok és módszerek fejezet megírása	<i>[Signature]</i>
3.	2023	08	30	Eredmények fejezet megírása	<i>[Signature]</i>
4.	2023	09	5	Megbeszélés fejezet megírása	<i>[Signature]</i>
5.	2023	09	11	Az Antibiotics lapnak benyújtandó kézirat hallgatói részének lezárása	<i>[Signature]</i>

Érdemjegy a második félév végén: 5 (jeles)

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: *Szemenits Dóra*.....

[Handwritten signature]
.....
témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása: Átvétel dátuma: