

Állatorvostudományi Egyetem
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

Pulykából és víziszárnyasból (kacsa és liba) származó
kommenzalista *Escherichia coli* törzsek összehasonlító antibiotikum
rezisztencia vizsgálata

Comparative screening of antibiotic resistance of commensal
Escherichia coli strains from turkeys and waterfowl (ducks and
geese)

Tóth Evelin

Témavezető: Dr. Adorján András

Belső Konzulens: Dr. Tenk Miklós, tanszékvezető egyetemi docens
Járványtani és Mikrobiológiai Tanszék

2024

Absztrakt

A kommenzalista *Escherichia coli* törzsek az emberek és gerinces állatok bélflórájának természetes alkotói. Anyagcsere termékeik segítségével gátolják a patogén baktériumok elszaporodását, hozzájárulnak a bélmikrobióta egyensúlyához, probiotikumként funkcionálnak, illetve K és B₁₂ vitamint termelnek a gazdaszervezet számára. [1] Jótékony tulajdonságaik mellett, azonban potenciális veszélyt jelenthetnek az antimikrobiális rezisztencia terjedésében, amit a WHO (World Health Organisation) az emberiséget fenyegető aktuális problémaként kezel. [2] Arról, hogy a kommenzalista törzseknek ebben milyen szerepük van, még kevés ismerettel rendelkezünk.

Jelen tanulmányban hazai állományokból származó egészséges és elhullott pulykákból és vízibarmfimból (liba és kacska) izolált kommenzalista *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia mintázatát igyekeztem felderíteni és rámutatni a rezisztencia jelenlétének közegészségügyi jelentőségére a One Health szemlélet alapján. Az említett baromfifélékből vett vakbél eredetű mintákból szelektív MacConkey táptalajon, majd véres agaron szintenyészeteket állítottam elő, amelyekből az elvégzett biokémiai tesztek (kataláz-, oxidáz-, indol-, metilvörös-és citrát-próba) igazolták, hogy valóban *E. coli* törzseket sikerült kitenyészteni. A törzsekben esetlegesen jelenlévő virulencia gének felderítésére PCR (polimeráz-láncreakció) vizsgálat lett elvégezve, amely alapján a kommenzalista törzsek is meghatározásra kerültek. Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatot korongdiffúziós eljárással végeztem, mintánként 12 darab különböző antibiotikum korong került a kommenzalista törzseket tartalmazó Mueller-Hinton agarra. 37°C-on 24 órán keresztül végzett inkubálás után a kialakult gátlási zónákat lemértem és az eredményeket táblázatban rögzítettem.

Az izolált törzseket érzékeny és rezisztens kategóriákba soroltam az EUCAST és a CLSI által kiadott gátlási zóna határértékekkel történő összehasonlítás után, majd minden törzs esetében meghatározásra kerültek a rezisztencia mintázatok is. [3–5] Az eredményekből látható, hogy a pulyka és liba mintákból származó *E. coli* törzsek átlagosan több mint négy antibiotikummal szemben vesztették el az érzékenységet, ami igazolja, hogy kommenzalista törzsek esetében is számolnunk kell a multirezisztencia széleskörű jelenlétével. Leggyakrabban béta-laktám antibiotikumokkal szemben tapasztaltam rezisztenciát, amelyek előszeretettel alkalmazott gyógyszerek a baromfifélék kezelésében hazánkban is. [6]

Abstract

Commensal *Escherichia coli* strains are natural constituents of the intestinal microbiota of humans and vertebrates. With the help of their metabolic products, they inhibit the growth of pathogenic bacteria, contribute to the balance of the intestinal microbiota, function as probiotics and produce vitamins like K and B₁₂ for their host organism. [1] However, in addition to the beneficial properties, they can be a potential danger in the spread of antimicrobial resistance, which the WHO (World Health Organisation) treats as a potential problem threatening humanity. [2] We still have little knowledge about the role of the commensal tribes in this.

In the present study, we aimed to investigate the antibiotic resistance patterns of commensal *E. coli* strains isolated from healthy and deceased waterfowl (goose and duck) from domestic flocks, and to highlight the public health significance of the presence of resistance based on the One Health approach. Caecal samples taken from the mentioned poultry species were cultured on selective MacConkey agar, followed by blood agar, where colonies were grown. Biochemical tests (catalase, oxidase, indole, methyl red and citrate tests) confirmed that *E. coli* strains were successfully isolated. To detect potential virulence genes in the strains, PCR (Polymerase Chain Reaction) testing was performed, which also allowed the identification of commensal strains. Antibiotic resistance was tested using the disc diffusion method, with 12 different antibiotic discs placed on Mueller-Hinton agar containing the commensal strains. After 24 hours of incubation at 37°C, the inhibition zones were measured, and the results were recorded.

The isolated strains were categorized as sensitive or resistant after comparison with the inhibition zone breakpoints established by EUCAST and CLSI, and resistance patterns were determined for each strain. [3–5] The results revealed that the *E. coli* strains from turkey and goose samples have, on average, lost sensitivity to more than four antibiotics, confirming that the widespread presence of multidrug resistance must also be considered in commensal strains. Resistance was more frequently observed against beta-lactam antibiotics, which are commonly used drugs in the treatment of poultry in our country as well. [6]

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	5
2. Szakirodalmi áttekintés	7
2.1. Kommenzalista <i>E. coli</i> törzsek jellemzése.....	7
2.2. Antimikrobiális szerek elleni rezisztencia mechanizmusok	9
2.3. Plazmidok	10
2.4. Rezisztencia terjedésének csökkentését célzó intézkedések.....	11
2.5. Antibiotikum felhasználás a baromfiiparban	13
2.6. Antibiotikum rezisztencia jelentősége: One Health koncepció	14
3. Célkitűzések	16
4. Anyag és módszer	17
4.1. Mintagyűjtés	17
4.2. Baktérium törzsek izolálása	17
4.3. Molekuláris genetikai vizsgálatok	18
4.4. Törzsek antibiotikum érzékenységének vizsgálata	19
4.5. Statisztikai módszerek	21
5. Eredmények.....	22
6. Megbeszélés	26
7. Összefoglalás.....	29
8. Irodalomjegyzék.....	30
9. Köszönetnyilvánítás	34

1. Bevezetés

Az *Enterobacteriaceae* családba tartozó *Escherichia coli* egy Gram negatívan festődő, közepes méretű pálcika alakú baktérium, amely a melegvérű állatok egészséges bélmikrobiótájának normál alkotója, de léteznek patogén/kórokozó törzsei is. [7, 8] Az *E. coli* tenyésztését tekintve egy fakultatív anaerob baktérium, így képesek mind oxigén jelenlétében, mind annak hiányában szaporodni az anyagcsere folyamataik megváltoztatásán keresztül. A baktériumfajok elkülönítésében is használatos oxidációs-fermentációs tesztben az *E. coli* törzsek mind fermentatívak, vagyis a szénhidrátok gyors bontása során gázt és savakat termelnek, amely gáz és savtermelés a félfolyékony tápközeget megsavanyítja, illetve buborékosá teszi. [9, 10] Az *E. coli* törzsek ezen képességének, mégpedig, hogy savtermelésre képesek, fontos szerepe van a bélmikrobióta normális egyensúlyának létrehozásában, illetve fenntartásában. A termelt sav révén a béltraktus hátsó szakaszain a kémhatás savasodik és gátolja a patogén kórokozók térnyerését, így az esetleges megtapadásukat és elszaporodásukat. További fontos tulajdonságuk, hogy a gyors szénhidrátbontási képességük révén a hátsó bélszakaszokban jelenlévő tápanyagok elbontásával szintén kompetitíve gátolják a patogén baktériumok szaporodását, kolonizációját. [11] Az elsődleges biokémiai reakciókban az *Enterobacteriaceae* család tagjai és így az *E. coli* is oxidáz negatív és kataláz pozitív törzsként viselkednek, amely gyors elkülönítésre ad lehetőséget a másik Gram-negatív, szintén népes *Pasteurellaceae* család általában oxidáz és kataláz pozitív törzseitől. Az *Enterobacteriaceae* családon belül az *E. coli* törzsek laktóz bontásra képesek közé tartoznak, így laktóz pozitív törzsekként szokás őket emlegetni és megkülönböztetni a család többi laktóz negatív törzseitől. [10, 12]

Az *E. coli* törzsek jelentős része rendelkezik burokkal. A baktériumot körülvevő burok hatékony fagocitózis gátlóként szolgál, amely így virulencia faktor is lehet egy törzs esetében és fontos lehet az adott törzs jellemzésében. Például a borjakban megbetegedést okozó *E. coli* törzsek laboratóriumi tenyésztése során a képződött telepek gyakran nyálkás, csillogó jellegét szintén a képzett nagy mennyiségű burok adhatja, amelynek hatására a telepek akár a folyós, „takonyszerű” állapot is elérhetik. Az *E. coli* törzsek általában csilló képzésre is képesek, amellyel aktív mozgást tudnak végezni. Valamint fimbriák is általánosan megtalálhatók az *E. coli* törzsek felületén, amelyek a bél- és más hámsejtekhez való kitapadáshoz, a kórokozóképességhez szükségesek és a későbbi kolonizációban szintén fontos szerepet játszanak. [7]

Az *E. coli* törzseket a sejtfalukban található lipopoliszacharid (O) antigén alapján szerocsoportokba, a burok (K) antigének vizsgálatával kiegészítve szerotípusokba lehet besorolni, amelyen belül további elkülönítésre ad lehetőséget a csilló (H) és fimbria (F) antigének meghatározása és további csoportosítása. [7] Ezen előbbi tulajdonságok vizsgálata jó lehetőséget ad járványtani nyomozások során a fertőzés terjedésének nyomkövetésére, eredetének kiderítésére. Illetve szintén hasznos módszer törzsek gyors összehasonlítására is. A jelenlegi kutatási és diagnosztikai tapasztalatok alapján a meghatározott *E. coli* szerotípus és a törzsek virulenciája között nincsen szoros összefüggés, így sem a szerotípusból, sem a meglévő virulencia faktorokból nem lehet következtetni biztosan a másokra. [13] Vannak olyan nem O157-es *E. coli* törzsek, amelyek képesek Shiga toxint termelni és megbetegedéseket okozni, hasonlóan O157:H7-es *E. coli* törzshöz. Texasban 1999-ben, táborozók valószínűleg kontaminált jég és saláta fogyasztása után betegedtek meg. A betegek hasi fájdalmakkal, hasmenéssel és néhány esetben véres hasmenéssel küzdöttek, ebből két esetben hemolitikus urémiás szindrómát is diagnosztizáltak. A bélsárvizsgálatok O111:H8-as *E. coli* jelenlétét mutatták ki, és PCR vizsgálat segítségével később kétféle Shiga toxin jelenlétét is igazolták. Az O111-es szerotípus mellett, az O26 és O103 is gyakran köthető hasonló megbetegedésekhez. [14] A jelenleg elfogadott és terjedő diagnosztikai módszer a valóban patogén törzsek kimutatására, a virulencia faktorok gén szintű vizsgálata PCR segítségével. Viszont a járványtani nyomozásban ma is fontos szerep jut a régóta alkalmazott szerotipizálásnak.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Kommenzalista *E. coli* törzsek jellemzése

Az *E. coli* törzsek jelentős része kommenzalistaként viselkedik és a normál mikrobióta tagjaként hozzájárul a gastrointestinalis rendszer megfelelő működéséhez. Ismerünk azonban fakultatív patogén törzseket is, amelyek bizonyos hajlamosító tényezők (pl.: stressz, zsúfoltság, rossz takarmány, stb.) jelenlétében megbetegedést tudnak okozni. Valamint előfordulnak obligát patogénnek tekinthető törzsek is, mint például az enterohemorhágiás *E. coli* törzsek, amelyek emberben súlyos és közel 100%-ban halálos kimenetelű HUS (hemolitikus urémiás szindróma) kialakítására képesek akár nagyon alacsony fertőző dózis mellett is. [15]

A patogén törzseken belül a szokásos besorolás szerint megkülönböztetnek intesztinális (bélben) és extraintesztinális (a bélrendszeren kívüli) megbetegedést okozó patotípusokat, a törzsek fő megtelepedése alapján. Ezeken belül további patotípus csoportok léteznek, úgy mint ETEC (enterotoxikus *E. coli*), EPEC (enteropatogén *E. coli*), EHEC (enterohemorhágiás *E. coli*), EAEC (enteroaggregatív *E. coli*), UPEC (uropatogén *E. coli*), MNEC (agyhártyagyulladást okozó *E. coli*), APEC (madárpatógén *E. coli*) .stb. [16]

A kommenzalista *E. coli* törzsek az emberi, illetve a meleg- és hidegvérű állatok emésztőtraktusának születés utáni kolonizációja során a bélmikrobióta normál részeként biofilm formájában fordulnak elő. [8] A kommenzalizmus során az együtt élő populációk, olyan kölcsönhatást fejtenek ki egymásra, amely az egyik résztvevő fél számára előnyökkel jár, míg a másik populáció számára ez a kapcsolat közömbös. Ezek a törzsek a teljes mikrobióta viszonylag csekély 0,1%-5%-át adják emlősök esetén és a humán populációban közel 10^{21} darab *E. coli* sejt jelenlétét valószínűsítik. [17, 18] A kolonizáció legfőbb mozgatórugója a rendelkezésre álló tápanyagokért zajló versengés, melynek eredményeként végül azok a fajok népesítik be a bélrendszert, amelyek az adott tápanyagot jobban tudják hasznosítani versenytársaiknál. A tápanyag-niche elmélet alapján, az így kialakult mikrobióta egységét egészséges bél- és immunrendszer mellett, a később felvett fajok vagy patogének nehezen tudják megbontani. [18] A kommenzalista *E. coli* törzsek a vastagbél nyálkahártyájának külső mucin rétegében foglalnak helyet, amit a vastagbél epithel sejteitől a belső mucin réteg választ el. A mucinnak habár a biofilm képződésében szerepe van, a kommenzalista *E. coli* törzsek tápanyagigényeit ez nem tudja kielégíteni, ezért az obligát anaerob baktériumok által fel nem használt, például di- vagy monoszacharidok

szolgálhatnak tápanyagként. A vastagbél kolonizációja patogén *E. coli* törzsek esetén is lezajlik, azonban ez más mechanizmussal történik. [8]

A kommenzalista és patogén *E. coli* törzsek megkülönböztetése tenyésztés alapján nem lehetséges, mivel megjelenésüket tekintve azonosaknak tekinthetők. Szintén nem alkalmas a patogén *E. coli* törzsek kimutatására az O157:H7-es törzsekre alkalmazott speciális tenyésztési közegek, amelyek alapján a fertőzőképességhez mindenképpen szükséges, valóban hordozott virulencia faktorokkal kapcsolatosan semmiféle információt nem tud szolgáltatni. [19] Így a PCR feltalálásával, előretörésével és a napi gyakorlatban való elérhetőségével vált lehetővé a kérdéses törzsek virulencia faktorainak génszintű vizsgálata és ezek alapján történő patogén törzssé besorolásuk. A PCR vizsgálatokkal ezért a hasmenést okozó IPEC (intesztinális patogén *E. coli*) törzsek által hordozott virulencia gének kimutatása gyorsá és megbízhatóbbá vált a szerotipizálásnál, valamint, ezáltal könnyebbé vált az intesztinális patogén törzsek patotípusokba való besorolása ezen információk alapján. Az extraintesztinális fertőzés kétféle formában tud létrejönni. Történhet az extraintesztinális patogén törzseknek a béltraktusból való kikerülésével és a húgyivarszervekbe való felszálló fertőzés kialakításával, vagy belégzés révén a tüdőbe jutva megbetegedést okozni (pl.: APEC törzseknél). Illetve a béltartalomban található ExPEC (extraintesztinális patogén *E. coli*) törzsek egyes virulencia faktoroknak köszönhetően a bélfalon keresztül is képesek lehetnek a véráramba törni és távoli szervek gyulladásos elváltozását létrehozni. [20]

A kommenzalista törzseknek nincs számottevő klinikai jelentősége és a köztudatban kizárólag hasznos mikroorganizmusként gondolnak rájuk, azonban ugyanúgy képesek az antibiotikum rezisztencia hordozására és átadására, mint a szélesebb körben vizsgált patogén társaik. Több kutatás is arra világított rá, hogy a kommenzalista *E. coli* törzsek indikátor mikrobaként szolgálnak az antibiotikum rezisztencia nyomon követésére élelmiszertermelő állatokban. Hollandiában például egészséges brojler csirkékből vett kommenzalista *E. coli* törzsek érzékenységét vizsgálták, míg egy másik monitoring programban patogén kórokozóval fertőzött, beteg brojler csirkékből vett mintákat vizsgálták ugyanebből a célból. [21] A kommenzalista mikroorganizmusok közegészségügyi jelentősége abban áll, hogy potenciális rezervoárjai lehetnek számos rezisztencia génnek, amelyeket a HGT (horizontális géntranszfer) révén képesek akár a patogén kórokozóknak is továbbadni.

2.2. Antimikrobiális szerek elleni rezisztencia mechanizmusok

Az antimikrobiális rezisztencia vizsgálata során elsősorban a patogén kórokozók állnak a középpontban, azonban érdemes figyelmet fordítani a kommenzalista baktériumok csoportjára is. Az antimikrobiális gyógykezelés célpontjában a patogén baktériumok állnak, miközben a kommenzalista törzsek ugyanúgy ki vannak téve az antimikrobiális szerek hatásának. Így a tartós antibiotikumok használata a kommenzalista törzsek között is a rezisztenciával rendelkező törzseket szelektálja ki és növekvő számban lesznek jelen a normál bélmikrobiótában. Aztán az így megszerzett rezisztencia képességeket a kommenzalista törzsek képesek továbbiakban is hordozni, mint a túlélésükhöz előnyt biztosító tulajdonság és akár át is adhatják a HGT révén az egy időben velük előforduló más *E. coli* illetve más baktérium törzseknek is. Ezek az antimikrobiális szerek elleni rezisztenciák növekvő számban is megjelenhetnek a törzsekben, így olyan MDR (multidrog-rezisztencia) törzsek jöhetnek létre, amelyek három vagy több vegyületcsoporttal szemben is rezisztensnek bizonyulnak. [22] Ezzel is befolyásolva a későbbi gyógykezelések hatékonyságát, hatásosságát, illetve a betegségben szenvedők gyógyulási esélyeit is.

Bizonyos rezisztencia mechanizmusok célja az intracelluláris antibiotikum koncentráció minimalizálása, például a bakteriális membrán permeabilitásának csökkentése révén. Ez létrejöhét úgy, hogy a hidrofíli anyagok átjutását segítő porin csatornák csökkent számban találhatók a bakteriális sejtmembránban. Erre a mechanizmusra az alapból lipofíli tulajdonsággal rendelkező *Mycobacterium tuberculosis* az egyik legjobb példa. [23] Az *E. coli* törzsekre jellemző egyik mechanizmus az efflux pumpák működtetése, amelyek a baktérium membránjában elhelyezkedő transzportfehérjék. Feladata a baktérium sejtbe bejutott vegyületek kipumpálása, sejtől való eltávolítása. Működése révén szintén az intracelluláris antibiotikum koncentráció csökkentése valósul meg. MDR kialakulásában fő szerepet játszanak ezek a pumpák, mert egyszerre több antimikrobiális szerrel szemben is védelmet biztosít a baktérium számára, illetve szinergista hatást fejt ki más rezisztencia mechanizmusokkal együttműködve. [22–24]

Az antibiotikumok enzimátikus inaktiválása egy olyan rezisztencia mechanizmus, amely során a rezisztens baktériumok által termelt enzimek képesek lebontani az adott antibiotikumot. Ilyen enzimek a béta-laktamázok, amelyeket elsősorban a *Staphylococcus* fajok termelnek a béta-laktám antibiotikumok ellen. A *Staphylococcus* fajok mellett érdemes megemlíteni a Gram-negatív baktériumokat is, amelyek az enzimet vagy a plazmidon vagy a kromoszómán kódolják. [24]

Bizonyos enzimek célja az antibiotikumok átalakítása és ezzel azok inaktiválása. Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok esetén is jelen lehetnek olyan, például acetilációt vagy adenilációt segítő enzimek, amelyekkel az aminoglikozid antibiotikumokat hatástalanítani képesek. [24]

A biokémiai mechanizmusok mellett, az antibiotikum rezisztencia genetikai vonatkozásairól sem feledkezhetünk meg. Ennek egyik lehetséges útvonala bizonyos génekben bekövetkező mutáció vagy mutációk sorozata. A spontán mutáció több okból kifolyólag is kialakulhat, leggyakrabban a DNS replikáció zavarához vezethető vissza. Érdemes kiemelni a rifampicin rezisztenciát, amelynek kialakulását *E. coli* törzsekben is leírták. Kialakulásának hátterében többnyire az RNS polimerázt kódoló gén mutációja áll, akár nukleotid(ok) kiesése vagy inzerciója következtében. [23]

A rezisztencia átadására a horizontális géntranszfer jelenti az egyik fő útvonalat, amely olyan mobilis genetikai elemekkel történik, mint a plazmidok vagy az integronok. Ezek nemcsak a rezisztencia átadására, hanem annak fenntartására is alkalmasak. A horizontális géntranszfer megvalósítása 3 féle módon történhet, még pedig a transzdukció, transzformáció vagy a konjugáció folyamata. A transzdukció során bakteriofág, vagyis egy vírus szolgál vektorként az érintett gének átadásában. Ha a baktérium a környezetéből egy másik baktériumból származó szabad genetikai anyagot vesz fel, azt transzformációnak nevezzük. A konjugáció folyamán pedig két baktériumsejt kapcsolódása teszi lehetővé a donor sejtből a recipiensbe történő géntranszfert. [24, 25]

2.3. Plazmidok

A plazmidok a citoplazmában elhelyezkedő extrakromoszómális DNS molekulák, melyek olyan genetikai anyagot hordoznak, amelyek a baktérium kromoszómáitól függetlenül képesek kifejeződni és replikálódni. A rezisztencia gének előfordulhatnak egyesével, külön-külön plazmidon, de akár több rezisztencia gén is kódolódhat egy plazmidon is, így létrehozva az ún. MDR plazmidokat. [22, 24]

A kromoszómákhoz hasonlóan, a plazmidok között is bekövetkezhetnek rekombinációk, ezen kívül transzpozonok és integronok beépülése is hozzájárul a plazmidokon hordozott rezisztencia gének számának növeléséhez és széleskörű változatosságának kialakításához. A transzpozonokat szokás ugráló géneknek is nevezni. Ezek olyan DNS szakaszok, amelyek képesek „átugrani” egyik plazmidról a másikra, de akár plazmid és kromoszóma között is bekövetkezhethet ez a fajta géncsere. [23, 24]

Az *E. coli* esetén a kromoszómán kívül elhelyezkedő plazmidok együttesen biztosítják a baktérium nagymértékű genetikai változatosságát, ami teret enged a rezisztencia gének és mechanizmusok sokrétű megjelenésének. Ennek köszönhetően a kommenzalista *E. coli* törzsek az említett mobilis genetikai elemek rezervoárjaként funkcionálnak, illetve képesek donorként és recipiensként is szerepet játszani az antimikrobiális rezisztencia átadásában. A kommenzalista *E. coli* esetében az MDR plazmidok fontosságát részletes molekuláris vizsgálatokkal még nem térképezték fel, ezek inkább a klinikai szempontból fontos *E. coli* törzsek esetében ismeretesek. [22]

Néhány példa baromfiban előforduló rezisztencia gént hordozó plazmidokra kommenzalista *E. coli* törzsekben: Leírtak a béta-laktám antibiotikumokkal szemben rezisztens, olyan ESBL-termelő kommenzalista *E. coli* törzseket, amelyek az enzimtermelésért felelős ún. CTX-M géneket a plazmidokon kódolják. A CTX-M génnek más béta-laktamázt kódoló génnel (CMY) való együttes előfordulását is kimutatták csirkében. [22]

Fluorokinolon rezisztencia kialakításában a *qnr* gének játszanak szerepet, amelyek expressziója során képződött fehérjék védik a DNS-replikációhoz szükséges enzimeket az antibiotikumok hatásától. Korábban úgy vélték, hogy a kinolonokkal szembeni rezisztencia csak vertikálisan tud terjedni, de mára már felfedeztek *qnr* rezisztencia géneket hordozó plazmidokat (PMQR), amik lehetőséget biztosítanak a horizontális terjedésre. Baromfiból és egy esetben kifejezetten pulykából is sikerült az említett géneket a plazmidokról kimutatni. A *qnr* géneken túl, amelyek tehát a *qnr* fehérjék által a DNS giráz illetve a topoizomeráz IV. enzimek védelmét végzik, említést érdemelnek a kinolon efflux pumpát kódoló rezisztencia gének is. Ezek szintén kimutatásra kerültek kommenzalista baromfi *E. coli* törzsekben. [22]

2.4. Rezisztencia terjedésének csökkentését célzó intézkedések

Az antimikrobiális rezisztencia terjedése mind humán mind állategészségügyi szempontból aktuális kérdés. A rezisztencia visszaszorítására és terjedésének megakadályozására az antimikrobiális szerekkel kapcsolatos tevékenységek szigorú monitoringja szükséges, amelyre Európai Unió szabályozások és hazai intézkedési tervek vonatkoznak.

Az EMA (Európai Gyógyszerügynökség) és az AMEG (Antimikrobiális Tanácsadó Ad Hoc Szakértői Csoport) közösen kidolgoztak egy olyan osztályozási rendszert, amely négy fő kategóriába sorolja az antimikrobiális szereket. Az A kategóriába sorolt szerek felhasználása kerülendő, a humán fertőzések kezelésére vannak fenntartva, ezért egyik állatfajnál sem

engedélyezettek az EU-ban. Kivételes esetben kedvtelésből tartott állatoknál, mint egyedüli terápiás megoldás használhatóak. A B kategóriába eső szerek kritikus fontosságúak a humán gyógyászatban, ezért az állatorvosi gyakorlatban korlátozott ezek felhasználása. Akkor alkalmazhatóak, ha az érzékenységi vizsgálatok megtörténtek és nincsen olyan alsóbb kategóriás szer, ami megfelelő alternatíva lenne. Ebbe a csoportba sorolt szerek már használhatóak élelmiszertermelő állatokra is. A C kategóriás szereket körültekintően kell alkalmazni az állatgyógyászatban. Használatuk akkor lehetséges, amikor nem áll rendelkezésre az adott betegség kezelésére megfelelő D kategóriába tartozó szer. A D kategória öleli fel az első vonalbeli antibiotikumokat, amelyek a prudens antibiotikum használat jegyében, csak indokolt esetben alkalmazhatóak. [26] Az említett kategóriák ismerete állatorvosi gyakorlat szempontjából, azért lényeges, mert ezt követve, mindig olyan szert veszünk igénybe, amely klinikai szempontból hatékony miközben a közegészségügyi kockázata a lehetőségekhez képest a legalacsonyabb.

Az antibiotikum rezisztencia terjedésének csökkentésére irányuló intézkedéseket tartalmaz az Európai Parlament és a Tanács 2019/6 rendelete. Tartalmazza például az állatgyógyászati készítmények, beleértve az antimikrobiális szerek forgalomba hozatalára, engedélyezésére, gyártására vonatkozó és ehhez hasonló egyéb tevékenységekre vonatkozó rendelkezéseket. Az antimikrobiális szer felhasználásával kapcsolatban kijelenti, hogy automatikusan nem használható fel profilaktikus kezelésre, azonban kivétel tehető egyedi kezelés esetén, ha a fertőzés vagy fertőző betegség kockázata nagyon magas és potenciálisan végzetes kimenetelű. Állatok egy csoportjára vonatkozó metafilaxiás kezelés akkor lehetséges, ha egyéb terápiás opció nem lehetséges és a kockázat magas. [27] Az antimikrobiális szerek felhasználásának adatgyűjtési kötelezettségeiről fontos megállapításokat tesz például a Bizottság (EU) 2021/578 felhatalmazáson alapuló rendelete. A rendelet 15. cikkében állatfajok szerint megadják az adatgyűjtés kezdeti időpontját, amitől kezdve a tagállamok folyamatosan adatokat gyűjtenek az antibiotikum felhasználásról, majd évente beszámolnak erről az Európai Gyógyszerügynökségnek. [28]

A hazai szabályozások a nemzetközikhöz képest szigorúbbak, például a 27/2021. (VIII. 11.) AM rendeletben metafilaxiás célra akkor adható antibiotikum, ha azt az érzékenységi vizsgálat indokolja. Profilaktikus kezelésnél pedig az élelmiszertermelő állatokra vonatkozólag kizár bizonyos antibiotikumokat, például a fluorokinolonokat vagy a 3. és 4. generációs cefalosporinokat. [29]

2.5. Antibiotikum felhasználás a baromfiiparban

A 2021-es ESVAC (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption) jelentés szerint a baromfik az élelmiszertermelő állatokra vonatkoztatott PCU (Population Correction Unit) 13%-át teszik ki a jelentésben szereplő 31 európai uniós ország összefoglalt adatai alapján. A PCU az antimikrobiális szerekkel potenciálisan kezelhető élelmiszertermelő állatok biomasszáját jelenti, Magyarország esetében ez körülbelül 211 ezer tonnát jelent a baromfifélék esetében. Ez 2020-ban a hazai élelmiszertermelő állatok teljes PCU-jának 26%-át tette ki. [30] Az ESVAC jelentés, illetve a NÉBIH (Nemzeti Élelmiszer-biztonsági Hivatal) összefoglalói alapján az élelmiszertermelő állatokban legnagyobb mennyiségben használt antimikrobiális szerek hazánkban a tetraciklinek és a penicillinek, nagyságrendekkel lemaradva követik őket a pleuromutilinek, fluorokinolonok és a makrolidok. [30–32]

A jelentés tartalmazza azt is, hogy az egyes országok milyen formában alkalmazzák leggyakrabban az antibiotikumokat. Az eladási adatok alapján megállapítható, hogy a premixek és a szájon át alkalmazható belsőleges oldatok teszik ki ennek közel 90%-át, ezzel szemben az injekciós formában adott antimikrobiális szerek aránya elenyésző. [30] Több állat egyidejű kezelését az elsőként említett módokon a legegyszerűbb kivitelezni, ebből pedig arra lehet következtetni, hogy a csoportos kezelések továbbra is jelentős szerepet játszanak az állatgyógyászatban. A baromfitartó telepeken előszeretettel alkalmazzák úgy az antibiotikumokat, hogy azokat ivóvízhez adják vagy premix formájában a takarmányba keverik. Ezeknek a beadási módoknak a hátulütője az, hogy bár az antibiotikumok optimális koncentrációban kerülnek bekeverésre, nem biztos, hogy minden egyed ugyanazt a mennyiséget fogja felvenni, ami alul-vagy túladagoláshoz vezethet. Beteg állatoknál figyelembe kell venni, hogy az étvágyuk és a vízfogyasztásuk is csökkenhet, ami tovább nehezíti a megfelelő adagolást és befolyásolja a kezelés hatékonyságát. Érdemes figyelembe venni azt a tényt, hogy a vízvezeték rendszerbe bekerült antibiotikum kölcsönhatásba léphet a vezetékben kialakult biofilm réteggel, amely teret engedhet a rezisztens baktérium törzsek elszaporodásának. [33]

2023-ban a hazai állatorvosok által leadott jelentések alapján a baromfiiparban leggyakrabban használt antibiotikumok állatfajokra bontva a következők: házityúk és pulyka esetén az amoxicillin felhasználás áll az első helyen, ezt követi az enrofloxacin és a doxiciklin. [6]. Ahhoz, hogy pontosabb és átfogó képet kapjunk a pulykában és víziszárnyasban történő antibiotikum-felhasználásról szigorúbb monitoring programra van

szükség. Az EU Bizottság 2021/578-as rendelete alapján 2024. szeptember 30-ig adatokat kell gyűjteni a pulykákban felhasznált antibiotikumokról, majd 2027. június 30-ig a kacsákra és libákra vonatkozó adatok gyűjtése is kötelező lesz. Ezt követően az országoknak évente jelenteniük kell az eredményeket az Európai Gyógyszerügynökség felé. [28]

2.6. Antibiotikum rezisztencia jelentősége: One Health koncepció

A One Health szemlélet célja az emberek, az állatok és a környezet közös egészségének megvalósítása. Ha ennek bármely tagját egészségügyi veszély fenyegeti, az ugyanúgy befolyásolja a többi alkotó egészségét is. A One Health megvalósításához szükséges a kapcsolódó tudományterületek folyamatos együttműködése, fejlődése és az egy egészség koncepció megvalósításához szükséges erőfeszítések megtétele. Napjaink egyik legjelentősebb, One Health szemléletet veszélyeztető, globális méretű problémája az antimikrobiális rezisztencia terjedése, ami a nem megfelelő antibiotikum felhasználáshoz köthető. Ennek eredményeként kialakuló rezisztencia tovább fokozódik a szelekció hatására, kialakulnak olyan MDR baktérium törzsek, amelyekkel szemben az eddig használt gyógyszerek hatástalanná válhatnak.

A rezisztencia hordozás mind az állati, mind az emberi szervezetben és a környezetben is megvalósulhat. Az állatról emberre történő antibiotikum rezisztencia átadása lehetséges (például a *Staphylococcus aureus* CC97 törzs esetén leírásra került) azonban ennek valószínűsége még igen csekély. [34] Azonban érdemes figyelmet fordítani a zoonotikus kórokozókra, amelyek a betegség közvetítése mellett, a rezisztencia állatról emberre történő átvitelében is szerepet játszhatnak. Az *E. coli* törzsekre általában nem jellemző az állatról emberre történő terjedés, azonban érdemes megemlíteni az EHEC emberi fertőzést, mint tipikus zoonotikus *E. coli* bántalmat. Az emberi EHEC fertőzések többsége az *E. coli* O157:H7 szerotípusához köthetőek, amelyek shigatoxin termelésük révén képesek vérzésszerű bélgyulladás, illetve a HUS (hemolitikus urémiás szindróma) előidézésére. A borjú dizentéria egyik okozójaként, főleg a 2-8 hetes borjakban okozhat idült hasmenéses tüneteket, de előfordulhat, hogy a fertőzés tünetmentesen lezajlik az állatokban. Ebben áll a közegészségügyi jelentősége is, hiszen az egészséges szarvasmarhák 1-50%-a is képes hordozni és üríteni az említett szerotípust. Az emberek általában a nem megfelelően hőkezelt marhahússal fertőződnek, de a patogént hordozó szarvasmarha bélsarával szennyezett élelmiszerek is potenciális fertőzési forrást jelentenek például a nem pasztörözött tej, a szalámi, az ivóvíz vagy a zöldségek. [35]

A humán UTI (urinary track infection) kialakulásának hátterében szintén állati, egészen pontosan madár eredetű ExPEC törzseknek tulajdonítanak szerepet. [36, 37] Az ExPEC törzsek állatról emberre történő terjedése több úton is megvalósulhat, hasonlóan az EHEC fertőzéshez, mint például a fertőzött állattal való érintkezés vagy a szennyezett élelmiszer elfogyasztása révén. Bizonyos élelmiszer termelő állatok által hordozott ExPEC törzsek képesek élelmiszer eredetű humán UTI fertőzést okozni, mivel rendkívül hasonlítanak az emberi törzsekre. Az APEC (madár patogén *E. coli*) és az emberi fertőzést okozó ExPEC törzsek a vizsgálatok alapján nagyon szoros rokonságban állnak egymással. Az APEC törzsekkel való hasonlóság a humán ExPEC törzseken belül, főleg az UPEC és MNEC törzsekre igaz. Az 1990-es évek végéig az ExPEC törzsek, még nem mutattak antibiotikum rezisztenciát és hatékonyan lehetett kezelni például a humán UTI fertőzéseket is ampicillinnel vagy potenciált szulfonamidokkal, azonban ezekkel szemben is egyre inkább csökken a törzsek antibiotikum érzékenysége. [38]

3. Célkitűzések

Célom volt egy kommenzalista pulykából és víziszárnnyasból (kacsa és liba) származó *E. coli* törzsgyűjteményen bemutatni a baktériumokban meglévő antibiotikum rezisztencia alakulását. Ennek gyakorlati és kutatási jelentősége is fontos a nagy mértékben terjedő antibiotikum rezisztenciával rendelkező és multirezisztens törzsek miatt, illetve az élelmiszertermelő állatokból való tovább terjedés lehetősége miatt, amely az emberi élelmezésre és egészségügyre is fontos kihatással lehet.

4. Anyag és módszer

4.1. Mintagyűjtés

A mintagyűjtést pulyka, liba és kacsza vágóhidakon, illetve a NÉBIH-ÁDI Baromfi Osztályán hajtottam végre. A vágóhídon levágott, valamint az ÁDI-ba beérkező baromfi hullák esetében is a vakbelekből, steril mintavételi tamponnal, aszeptikus módon nyertem a bélsármintákat. Az így nyert béltartalmakat tartalmazó mintaedényeket a további feldolgozásig hűtve tároltam legfeljebb 6 órán keresztül.

4.2. Baktérium törzsek izolálása

A mintavételi pálcákat az *Enterobacteriaceae* és így az *E. coli* törzsre is szelektív MacConkey táptalajra oltottam ki és szélesztettem el. Majd ezt követően 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam őket. A MacConkey táptalaj szelektív táptalaj révén gátló anyagokat (epesavas sók, kristályibolya) tartalmaz, amelyek a Gram-pozitív baktériumok szaporodását teljesen legátolják. Így a mintában esetlegesen jelenlévő felületi, illetve bőrről származó kontaminációként bekerülő *Staphylococcus*, *Streptococcus*, Gram-pozitív spórások esetleges szaporodása nem nehezíti meg a minták értékelését. További értékes tulajdonsága, hogy a szelektív kapacitás nem csak a Gram-pozitív, hanem a Gram-negatív baktériumok esetében is jelentős, így gyakorlatilag a táptalajon az *Enterobacteriaceae* családjába tartozó törzseken kívül nagyon kevés esetlegesen kontamináló Gram-negatív baktérium tud kinőni ezen. A szelektivitáson túl további gyakorlat szempontjából hasznos tulajdonsága a MacConkey táptalajnak, hogy az egyes baktériumok, úgymint például az *Enterobacteriaceae* családba tartozó *Proteus* törzsek, nem képesek ezen rajzani és ezzel a számomra fontos törzsek izolálását megnehezíteni, illetve lehetetlenné tenni. A MacConkey táptalajon a laktózt bontani képes és képtelen törzsek eltérő telepmorfológiával és háttér színnel rendelkeznek a táptalajban található laktóz és neutrálvörös indikátornak köszönhetően. Ezen morfológiai különbségek lehetővé teszik ezen törzsek érzékszervekkel való könnyű megkülönböztethetőségét.

A 24 órás inkubációt követően a laktóz pozitív telepek közül egy telepet tovább oltva MacConkey, majd 24 órás 37 °C-on való inkubálást követően véres agaron szintenyészeteket állítottam elő. Amennyiben nem volt laktóz pozitív telep, abban az esetben laktóz negatívokat oltottam tovább szintén hasonló módszerrel. Ennek jelentősége abban van, hogy az *E. coli* törzsek 10%-a *ab ovo* laktóz negatív törzs, mert időközben a laktóz bontáshoz szükséges *lacY* gén által kódolt laktóz-permeázst elvesztették. Azonban egyéb

tulajdonságaikban mindenben megfelelnek az *E. coli* törzseknek és akár fontos virulens törzsek is jelen lehetnek közöttük. [10]

A szintenyészeteket elsődleges (kataláz és oxidáz), majd másodlagos (indol, metilvörös, citrát hasznosítási próba) biokémiai teszteknek vettem alá. A kataláz-pozitív, oxidáz-negatív, indol- és metilvörös-pozitív valamint citrát-negatív törzseket *E. coli* törzseknek minősítettem a továbbiakban. Az így beazonosított *E. coli* törzseket folyékony táplevesben (Mueller-Hinton), 15% glicerinnel hozzáadásával homogenizáltam, majd -80°C-on tároltam a későbbi felhasználásukig.

4.3. Molekuláris genetikai vizsgálatok

A molekuláris genetikai vizsgálatok elvégzéséhez szükséges bakteriális DNS-t az ún. forralásos módszerrel végeztem el. A forralásos módszer során a PCR vízben szuszpendált baktériumokat 10 percig 95 °C-os hőkezelésnek vettem alá. Ennek során a baktériumok citoplazmájában szabadon található DNS tartalom a sejtfal és sejthártya átszakadását követően a PCR vízbe került át nagy mennyiségben. A hőkezelést követő 2 perces 9000 rpm fordulatszámú centrifugálással a nagy mennyiségben a DNS mellett található bakteriális fehérjéket az oldatból kinyertem és a tiszta felülúszóból 100 µl kimérve a PCR számára használható tiszta DNS templátokhoz jutottam.

A PCR vizsgálatokat az állatokban leginkább előforduló *E. coli* enterális patotípusaiban jelenlévő főbb virulencia génekre (*eae*, *stx*, *st*, *lt*, *IpaH*, *aggR*) végeztem el.

1. táblázat

Alkalmazott primerek szekvenciája és referenciája

Vizsgált gén	Primer neve, szekvenciája (5'-3')	Referencia
<i>eae</i>	B52: AGGCTTCGTCACAGTTG	China és
	B53: CCATCGTCACCAGAGGA	mtsai., 1996
<i>stx 1</i>	B54: AGAGCGATGTTACGGTTTG	China és
	B55: TTGCCCCCAGAGTGGATG	mtsai., 1996
<i>stx 2</i>	B56: TGGGTTTTTCTTCGGTATC	China és
	B57: GACATTCTGGTTGACTCTCTT	mtsai., 1996
<i>sta</i>	STa-F: TTTATTTCTGTATTGTCTTT	Rajkhowa és
	STa-R: ATTACAACACAGTTCACAG	mtsai., 2009
<i>lt1</i>	LT1-F: AGCAGGTTTCCCACCGGATCACCA	Rajkhowa és
	LT1-R: GTGCTCAGATTCTGGGTCTC	mtsai., 2009
<i>ipaH</i>	IPAH III: GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	Echeverria és
	IPAH IV: GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	mtsai., 1993
<i>aggR</i>	aggR-3: CATCTCTTTGATAAGTCCTTCTCG	Kimata és
	aggRks-1: GTATACACAAAAGAAGGAAGC	mtsai., 2005

4.4. Törzsek antibiotikum érzékenységének vizsgálata

Amely szintenyészetek *E. coli* törzseket tartalmaztak, azokat 12 antibiotikum elleni rezisztenciára vizsgáltam meg a továbbiakban. A vizsgálatához a napi gyakorlatban általánosan használt korongdiffúziós módszert vettem igénybe és a következő metodikai eljárásokat, lépéseket alkalmaztam. Először is a szintenyészetből véres agarra kioltást végeztem a lefagyasztott és eltett törzsekből. Az egy napos inkubációs idő letelte után egy telepet minden törzsből fiziológiás sóoldatban homogenizáltam és így ~0,5 McFarland sűrűségű baktérium szuszpenziót kaptam. Ebbe steril tampont áztattam és a felvett baktérium szuszpenziót egyenletesen egy egész Mueller-Hinton agar felületén szétoszlattam. Erre

helyeztem el az antibiotikum korongokat egymástól egyenletes távolságra, maximum 6 db-ot egy táptalajra. A 24 órás 37 °C-os inkubációt követően tolómérővel a korongok körül kialakult gátlási zónát milliméterben lemértem és rögzítettem ennek értékét. A korongdiffúziós antibiotikum rezisztencia vizsgálatban felhasznált antibiotikumok a következők voltak: 1. béta-laktámok: amoxicillin, ampicillin; 2. karbapenemek: imipenem; 3. harmadik generációs cefalosporinok: ceftiofur; 4. aminoglikozidok: gentamicin, sztreptomycin; 5. tetraciklinek: doxiciklin; 6. fenikolok: klóramfenikol; 7. fluorokinolonok: marbofloxacin, ciprofloxacin; 8. potenciált szulfonamidok: trimetoprim-szulfametoxazol; 9. nitrofuránok: nitrofurantoin.

2. táblázat

Felhasznált antibiotikumok és azok koncentrációi

Hatóanyag csoport	Antibiotikum neve (koncentrációja)
Béta-laktámok	ampicillin (10 µg)
	amoxicillin (10 µg)
Cefalosporinok	ceftiofur (30 µg)
Karbapenemek	imipenem (10 µg)
Aminoglikozidok	gentamicin (10 µg)
	sztreptomycin (10 µg)
Tetraciklinek	doxiciklin (30 µg)
Fluorokinolonok	ciprofloxacin (5 µg)
	marbofloxacin (5 µg)
Potenciált szulfonamidok	trimetoprim + szulfametoxazol (1,25 µg/23,75 µg)
Fenikolok	klóramfenikol (30 µg)
Nitrofuránok	nitrofurantoin (300 µg)

A milliméterben meghatározott gátlási zónák értékeit az EUCAST és CLSI által közölt értékek alapján soroltam be érzékeny, illetve rezisztens kategóriákba. Az átmeneti csoportba tartozókat minden esetben az érzékenyek közé soroltam be. [3–5]

4.5. Statisztikai módszerek

Az adatok összesítésére és elsődleges értékelésére az Excel programot használtam. A csupán leíró jellegű statisztikai adatokat is az Excel program segítségével nyertem ki a feldolgozandó eredményekből. Az átlagok és szórások kiszámítását a Calculators.net oldal, az átlagok további összehasonlítására szolgáló t-teszt elvégzésére pedig a Graphpad.com oldalt vettem igénybe.

5. Eredmények

A baktériumok izolálása során 238 mintából 236 *E. coli* törzset sikerült kitenyészteni és ezeket, mint törzsgyűjteményt összeállítani. A pulyka esetében az ÁDI és a Vágóhídról származó minták 1-1 állattartótelep állományából kerültek mintavételezésre. Így összesen 48 *E. coli* törzset sikerült a pulyka minták feldolgozása során a gyűjteménybe letenni. Az ÁDI-ból származó minták kevés száma az évközben zajló madárinfluenza járványok miatti korlátozott mintagyűjtési lehetőség miatt adódott. Az ÁDI-ból és a Vágóhídról származó liba végbéltamponok 9 és 2 állattartótelep állományát reprezentálták. Ezen állományokból így összesen 101 *E. coli* törzset izoláltam a libákból származó kollekcióba. A kacsáknál szintén az ÁDI és a Vágóhídi minták 8 és 1 állattartótelepet reprezentáltak, amellyel összesen 87 *E. coli* törzs került letételre. A minták pontos eloszlását és származását a 3. táblázatban foglaltam össze állatfajonként és mintavételi helyszín szerinti csoportosításban.

3. táblázat

Mintavételi helyek és mintaszámok összesítése

	Mintavételi helyszín	Mintázott tartási helyek száma	Minta eredete	Mintavételi hely	Mintasza
Pulyka	ÁDI	1	Hulla	Vakbél	4
	Vágóhíd	1	Élő állat	Vakbél	44
Liba	ÁDI	9	Hulla	Vakbél	53
	Vágóhíd	2	Élő állat	Vakbél	48
Kacsa	ÁDI	8	Hulla	Vakbél	36
	Vágóhíd	1	Élő állat	Vakbél	51
				Összesen	236

Az összes általam gyűjtött törzset megvizsgálva az *E. coli* enterális patotípusaira jellemző főbb virulencia faktorokra negatív eredmény született minden törzsnél.

Az *E. coli* törzseknél tapasztalt antibiotikum rezisztencia értékek átlagát és szórását állatfajonként és mintavételezési helyenként a 4. táblázatban összesítem.

4. táblázat

Az egyes *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia darabszámainak átlaga és szórása

	Átlag	Szórás	Minta eredete	Átlag	Szórás
Pulyka	4,94	1,27	ÁDI	6,25	1,92
			Vágóhíd	4,82	1,11
Liba	5,14	2,21	ÁDI	4,3	2,27
			Vágóhíd	6,06	1,71
Kacsa	2,23	1,97	ÁDI	2,36	2,03
			Vágóhíd	2,14	1,92
Összesen	4,03	2,39			

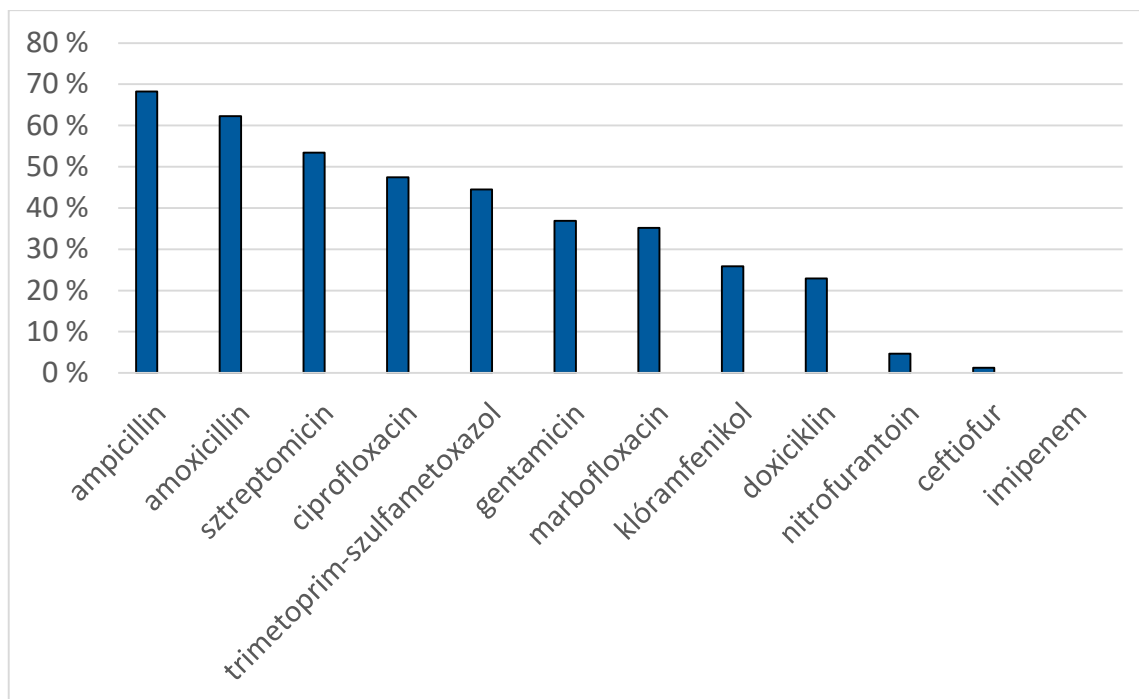
A tapasztalt antibiotikum rezisztenciák statisztikai összehasonlítását a mintavételezési helyek és a mintázott állatfajok alapján az 5. táblázatban foglaltam össze.

5. táblázat

T-teszt szignifikancia értékei az állatfajok és gyűjtési helyeknél tapasztalt rezisztencia értékek összehasonlítására

Összes	p	Vágóhidak	p	Hullák	p	Hullák- Vágóhíd	p
Pulyka- Liba	0,5613	Pulyka- Liba	<0,0001*	Pulyka- Liba	0,1007	Pulyka	0,0248*
Pulyka- Kacsa	<0,0001*	Pulyka- Kacsa	<0,0001*	Pulyka- Kacsa	0,0008*	Liba	<0,0001*
Liba- Kacsa	<0,0001*	Liba- Kacsa	<0,0001*	Liba- Kacsa	<0,0001*	Kacsa	0,6085

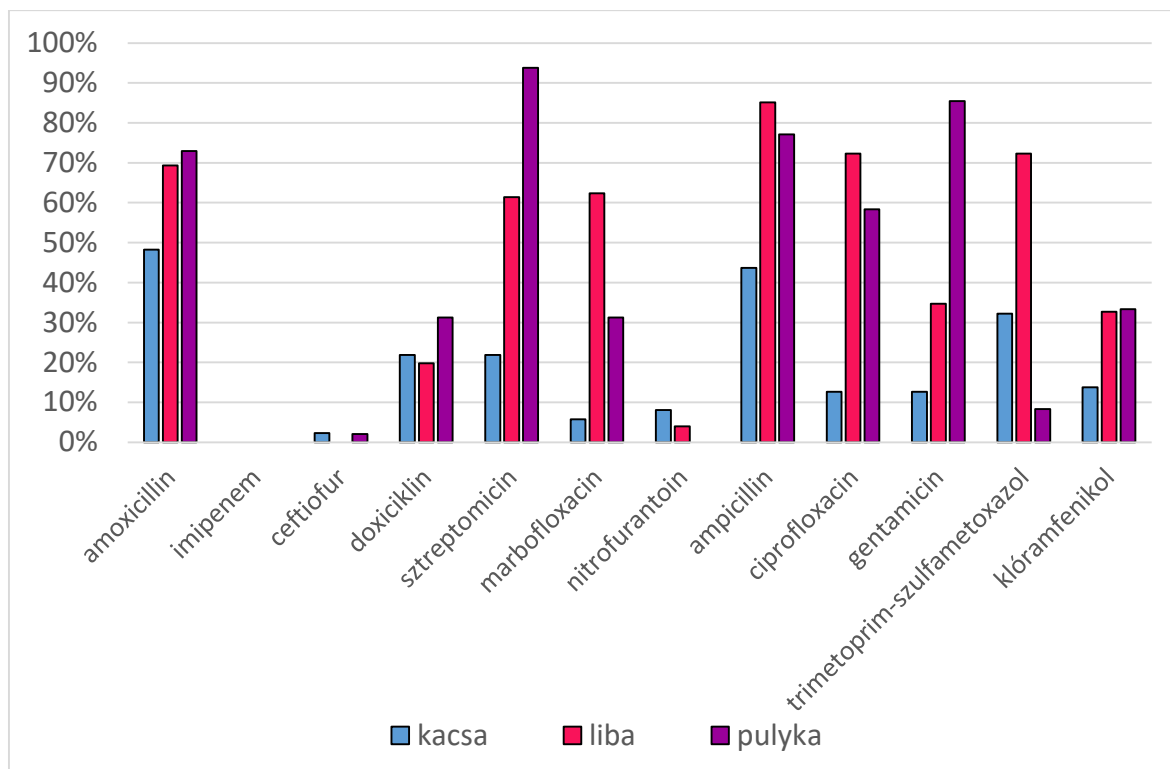
* szignifikáns eltérés



1. ábra

Antibiotikum rezisztencia gyakoriságok összefoglalása a vizsgált kommenzalista *E. coli* törzsekben

Az összes *E. coli* törzs esetében megállapított antibiotikum rezisztencia gyakoriságokat az 1. ábrán összesítettem, amelyen jól tetten érhető az ampicillin és amoxicillin (68% és 62%) antibiotikumokra való rezisztencia dominanciája. Az imipenemre való rezisztenciát nem sikerült kimutatni, de a ceftiofur és nitrofurantoin esetében is nagyon alacsonynak mondhatók a gyakoriságok.



2.ábra

A vizsgált állatfajokból származó kommenzalista *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia gyakoriságának összehasonlítása

Az antibiotikum rezisztenciát állatfajonként szétbontva a 2. ábrán látható, hogy az egyes antibiotikumok gyakorlatilag minden állatfajban megjelennek, ebben nem látható különbség. Azonban a kacsákban minden esetben alacsonyabb gyakoriságúak az értékek, míg libákban és pulykákban magasabb, de nem tendenciózus értékeket tapasztaltam.

6. Megbeszélés

Sikeresen létrehoztam egy 236 *E. coli* törzsből álló pulykából, lúdból és kacsából származó gyűjteményt. Ennek létrehozása kapcsán fontos szempont volt, hogy ne tartalmazza az enterális patotípusait az *E. coli* törzsnek. Így egy olyan gyűjtemény létrehozása volt a célom, amely feltételezhetően csak kommenzalista törzseket tartalmaz. Ugyanis vizsgálataim célja nem az elhullást okozó valóban patogén törzsek vizsgálata volt, hanem éppen ellenkezőleg az egészséges bélflórában is előforduló *E. coli* törzseket szerettem volna az antibiotikum rezisztencia szempontjából megvizsgálni.

Jelenleg leggyakrabban a patogén törzseket vizsgálják antibiotikum rezisztencia szempontjából, illetve általános monitoring/szűrővizsgálatok kapcsán egyes fontosabb antibiotikum rezisztenciákat (pl.: kolisztin, ESBL) hordozó törzsek elterjedtségéről gyűjtenek országos információkat, azonban az indikátor mikrobaként kezelt kommenzalista *E. coli* törzsekre is kiterjesztették ezeket a monitoring vizsgálatokat. [39, 40] A kommenzalista törzsek, sokkal nagyobb számban fordulnak elő, minden állat hordozza őket és kevés információval rendelkezünk jelenleg az ezen törzsekben előforduló, illetve hordozott antibiotikum rezisztencia génekről. Pedig a HGT révén azonos vagy más rokon törzsbe az ilyen rezisztencia gének átkerülhetnek, amelynek hatására virulensebb törzsek, illetve a terápiára sokkal rezisztensebb patogén törzsek is létrejöhetnek. [17]

Saját vizsgálataim alapján, a kommenzalista *E. coli* törzsek esetében tapasztalt antibiotikum rezisztencia gyakorinak mondható, sőt a multirezisztens (3 vagy annál több antibiotikum csoportra rezisztens) törzsek jelenléte is szinte általánosnak tekinthető. Az 1. ábrán látható, hogy a vizsgált törzsek leggyakrabban penicillinekkal szemben mutatnak rezisztenciát, ampicillinnel szemben a törzsek 68,22%-a és amoxicillinnel szemben a törzsek 62,29%-a volt ellenálló. A szélesített spektrumú béta-laktámokat a sztreptomycin követi 53,39%-kal, negyedik helyen pedig a ciprofloxacinn áll 47,46%-os gyakorisággal. Érdeemes kiemelni, hogy a kerülendő AMEG kategóriába tartozó, kizárólag humán gyógyászatban használható imipenemre az összes általam vizsgált *E. coli* törzs érzékeny volt. Az AMEG B kategóriába sorolt ceftiofurral szemben is csak minimális, 1,27%-os rezisztenciát mutattak, ugyanakkor 3. generációs cefalosporin révén ez a hatóanyag nem használható baromfifélék kezelésére az Európai Unióban. [41] Nitrofurantoin és klóramfenikol esetében, amelyek egyébként szintén nem adhatóak élelmiszertermelő állatoknak az Unióban [42], a törzsek 4,66%- és 25,85%-a mutatott rezisztenciát.

Az eredményeket állatfajonként nézve, a kacsák esetében sikerült elég alacsony rezisztencia értékeket kimutatni, amely véleményem szerint a kacsá ágazat tökeszegény mivoltának, sokkal extenzívebb tartástechnológiájának és így a sokkal kevesebb és ritkább antibiotikum felhasználásnak tudható be. Ellentétben a lúd és a pulyka esetében tapasztalt elég magas antibiotikum rezisztencia értékeknek.

A 2. ábra alapján a kacsákból származó *E. coli* törzsek 48,28%-a mutatott rezisztenciát amoxicillinnel szemben, második helyen az ampicillin követi 43,68%-kal, harmadik helyen pedig a trimetoprim-szulfametoxazol áll 32,18%-os gyakorisággal. A libákból izolált kommenzalista törzsek elsősorban szintén ezekkel az antibiotikumokkal szemben mutattak leggyakrabban rezisztenciát. Esetükben az első helyen az ampicillin áll, melynek gyakorisága 85,15%, ezt követi a ciprofloxacín és a trimetoprim-szulfametoxazol hasonló 72,28%-os gyakorisággal, majd a dobogó harmadik fokán az amoxicillin végzett 69,31%-kal. Pulyka törzsek esetén a sztreptomicin mutat kiugróan magas 93,75%-os rezisztencia gyakorisági értéket, amit a második helyen a gentamicin követ 85,42%-kal és a harmadik helyet az ampicillin foglalja el 77,08%-os gyakorisággal.

Az előzőekben ismertetett eredményeket összehasonlítottam a bevezetőben említett, NÉBIH által kiadott összefoglalóval, amely az állatorvosok által a baromfiiparban 2023-ban alkalmazott és bejelentett leggyakrabban használt antibiotikumokat foglalja össze. Az állatorvosok jelentései alapján az amoxicillin volt az általuk leggyakrabban használt antibiotikum a baromfiágazatban. [6] A 2. ábrán jól látható, hogy az amoxicillinnel szemben rezisztens *E. coli* törzsek gyakorisága kisebb eltérést mutat az egyes állatfajok között, mint bármely más vizsgált antibiotikum esetén. Emellett az is megfigyelhető, hogy a rezisztencia értékek mindhárom állatfaj esetében jelentős mértékűek: 48,28% kacsából, 69,31% libákból és 72,92% pulykákból származó törzsek esetén. Az eredmények fényében érdemesnek tartom megfontolni az amoxicillin nagymértékű felhasználását, mivel annak hatékonysága kérdésessé válhat. Az említett ESVAC jelentés alapján hazánkban, az élelmiszertermelő állatok kezelésére, az AMEG D kategóriába tartozó tetraciklinekből adnak el a legnagyobb mennyiségben (a penicillinek mellett). [30] A kutatás során a doxiciklin iránti érzékenységet is vizsgáltuk és viszonylag alacsony rezisztencia értékeket kaptunk mind a pulyka, mind a kacsá, valamint a liba törzsek esetében is.

A vizsgálataim alapján az elhullott állatokból származó és vágóhídon levágott egészséges állatokból izolált törzsek között nem lehetett egyértelmű összefüggést felfedezni az antibiotikum rezisztencia eltérések között. Így ezek alapján azt, hogy a kommenzalista *E.*

coli törzsek elhullott állatokból vagy éppen egészséges állatokból származtak nem vonható le egyértelmű következtetés arra vonatkozólag, hogy melyik esetben nagyobb gyakoriságú az antibiotikum rezisztencia.

7. Összefoglalás

A kommenzalista *E. coli* törzsek alapvetően ártalmatlan mikroorganizmusok, amelyek megtalálhatóak a legtöbb állat, beleértve a baromfifélék emésztőrendszerében is a bélflóra természetes részét képezve. [8] Jelen tanulmányban az antibiotikum rezisztens kommenzalista *E. coli* törzsek előfordulását és rezisztencia mintázatát vizsgáltam pulyka, illetve liba és kacsá mintákból.

A pulykákból és vízibarmfiktól származó kommenzalista *E. coli* törzsek átlagosan egyszerre több különböző antimikrobiális szerrel szemben is ellenállást mutattak, ami a multirezisztencia széles körű jelenlétére hívja fel a figyelmet, erre leginkább a pulyka és liba mintákból származó törzsek voltak alkalmasak. A törzsek leggyakrabban ampicillinnel, amoxicillinnel, sztreptomocinnal és ciprofloxacinnal szemben mutattak rezisztenciát. Az eredmények lényegében megerősítik a béta-laktám antibiotikumok elterjedt használatát a baromfiágazatban, és rámutatnak a felhasználási szokások a rezisztencia kialakulása közötti összefüggésre. Érdekes kiemelni, hogy bizonyos esetekben olyan hatóanyaggal szemben is találtam rezisztenciát, amelyeket élelmiszertermelő állatokban vagy kifejezetten baromfiban tilos alkalmazni hazánkban. Ugyanakkor az imipenemre – amelyet szigorúan humán gyógyászati célra tartanak fenn – minden vizsgált törzs érzékenységet mutatott.

A patogén törzsek rezisztenciájának feltérképezése eddig nagyobb hangsúlyt kapott, azonban vizsgálataim alapján mindenképpen érdemesnek látszik a baromfiban előforduló kommenzalista *E. coli* törzsek részletes vizsgálata is. Hiszen az általam talált rezisztencia értékek mindenképpen felvetik annak alapját, hogy ezen törzseknek szerepe lehet a rezisztencia terjedésében, átadásában, fenntartásában. A jövőben vizsgálatok adhatnak arra választ, hogy az egészséges bélflóra alkotóknak milyen szerepe és akár meghatározó szerepe lehet az antibiotikum rezisztenciával kapcsolatos globális kérdésekben. Ezért én úgy gondolom érdemes lenne egy genetika szintű, átfogó vizsgálat is a témakört illetően, hogy a „One Health” szemléletnek megfelelően számos kérdésre egzakt válasz tudjon születni.

8. Irodalomjegyzék

1. (2011) FAQ: E. Coli: Good, Bad, & Deadly: “What is true for E. coli is true for the elephant.” American Society for Microbiology, Washington (DC)
2. WHO Antimicrobial resistance <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> Accessed 28 Jul 2024
3. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, 2024. <http://www.eucast.org>. Accessed 20 Apr 2024
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. Wayne: CLSI supplement M100 Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020.
5. CLSI. Performance Standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 4th ed. Wayne: CLSI supplement VET08. 2018
6. Antimikrobiális szerek felhasználása élelmiszertermelő állatoknál a 2023-ban benyújtott jelentések szerint. In: Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal. <https://portal.nebih.gov.hu/-/antibiotikum-felhasznalas-2023>. Accessed 21 Oct 2024
7. Varga J, Rusvai M, Fodor L (2018) Escherichia coli okozta betegségek. In: A háziállatok fertőző betegségei. MÁOK Kft., Magyarország, pp 117–129
8. Rossi E, Cimdins A, Lühje P, Brauner A, Sjöling Å, Landini P, Römling U (2018) “It’s a gut feeling” - Escherichia coli biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. Crit Rev Microbiol 44:1–30. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1303660>
9. Zinnah M, Bari M, Islam M, Hossain M, Rahman M, Haque M, Babu S, Ruma R, Islam M (1970) Characterization of Escherichia coli isolated from samples of different biological and environmental sources. Bangl J Vet Med 25–32. <https://doi.org/10.3329/bjvm.v5i1.1305>
10. Mazumder R, Hussain A, Phelan JE, Campino S, Haider SMA, Mahmud A, Ahmed D, Asadulghani M, Clark TG, Mondal D (2022) Non-lactose fermenting Escherichia coli: Following in the footsteps of lactose fermenting E. coli high-risk clones. Front Microbiol 13:1027494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1027494>
11. Li Z, Huang Z, Gu P (2024) Response of Escherichia coli to Acid Stress: Mechanisms and Applications—A Narrative Review. Microorganisms 12:1774. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12091774>
12. Dousse F, Thomann A, Brodard I, Korczak BM, Schlatter Y, Kuhnert P, Miserez R, Frey J (2008) Routine Phenotypic Identification of Bacterial Species of the Family Pasteurellaceae Isolated from Animals. J VET Diagn Invest 20:716–724. <https://doi.org/10.1177/104063870802000602>

13. Alhadlaq MA, Aljurayyad OI, Almansour A, Al-Akeel SI, Alzahrani KO, Alsalman SA, Yahya R, Al-Hindi RR, Hakami MA, Alshahrani SD, Alhumeed NA, Al Moneea AM, Al-Seghayer MS, AlHarbi AL, Al-Reshoodi FM, Alajel S (2024) Overview of pathogenic *Escherichia coli*, with a focus on Shiga toxin-producing serotypes, global outbreaks (1982-2024) and food safety criteria. *Gut Pathog* 16:57.
<https://doi.org/10.1186/s13099-024-00641-9>
14. Mathusa EC, Chen Y, Enache E, Hontz L (2010) Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. *J Food Prot* 73:1721–1736. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.9.1721>
15. Kolodziejek AM, Minnich SA, Hovde CJ (2022) *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors and the ruminant reservoir. *Curr Opin Infect Dis* 35:205–214.
<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000834>
16. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
17. Foster-Nyarko E, Pallen MJ (2022) The microbial ecology of *Escherichia coli* in the vertebrate gut. *FEMS Microbiol Rev* 46:fuac008.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuac008>
18. Conway T, Cohen PS (2015) Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol Spectr* 3:. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MBP-0006-2014>
19. Gambushe SM, Zishiri OT, El Zowalaty ME (2022) Review of *Escherichia coli* O157:H7 Prevalence, Pathogenicity, Heavy Metal and Antimicrobial Resistance, African Perspective. *Infect Drug Resist* 15:4645–4673.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S365269>
20. Riley LW (2020) Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 8:. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020>
21. Hesp A, van Schaik G, Wiegel J, Heuvelink A, Mevius D, Veldman K (2022) Antimicrobial resistance monitoring in commensal and clinical *Escherichia coli* from broiler chickens: Differences and similarities. *Prev Vet Med* 204:105663.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105663>
22. Szmolka A, Nagy B (2013) Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Front Microbiol* 4:258.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00258>
23. Pulingam T, Parumasivam T, Gazzali AM, Sulaiman AM, Chee JY, Lakshmanan M, Chin CF, Sudesh K (2022) Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *Eur J Pharm Sci* 170:106103.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106103>

24. Gálfi P, Csikó G, Jerzsele Á (2015) A rezisztencia. In: Gálfi P (ed) Állatorvosi gyógyszerteran III., Második, javított kiadás. Robbie-Vet Kft., Budapest, pp 78–86
25. Hasegawa H, Suzuki E, Maeda S (2018) Horizontal Plasmid Transfer by Transformation in *Escherichia coli*: Environmental Factors and Possible Mechanisms. *Front Microbiol* 9:2365. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02365>
26. Schmerold I, van Geijlswijk I, Gehring R (2023) European regulations on the use of antibiotics in veterinary medicine. *Eur J Pharm Sci* 189:106473. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106473>
27. 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 18 Oct 2024
28. Commission Delegated Regulation (EU) 2021/578 of 29 January 2021 supplementing Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council with regard to requirements for the collection of data on the volume of sales and on the use of antimicrobial medicinal products in animals https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_del/2021/578/oj Accessed 21 Oct 2024
29. 27/2021. (VIII. 11.) AM rendelet az állatgyógyászati termékekről szóló 128/2009. (X. 6.) FVM rendelet módosításáról <https://njt.hu/jogszabaly/2021-27-20-7R.0> Accessed 18 Oct 2024
30. European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2021. ‘Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020’. (EMA/58183/2021)
31. Nincs számottevő változás az élelmiszertermelő állatok antibiotikus kezelésében. In: Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal. <https://portal.nebih.gov.hu/-/nincs-szamottevo-valtozas-az-elelmiszertermelo-allatok-antibiotikus-kezeleseben>. Accessed 21 Oct 2024
32. Összefoglaló készült az élelmiszertermelő állatok antibiotikus kezeléséről. In: Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal. <https://portal.nebih.gov.hu/-/osszefoglalo-keszult-az-elelmiszertermelo-allatok-antibiotikus-kezeleserol>. Accessed 21 Oct 2024
33. Hahne F, Jensch S, Hamscher G, Meißner J, Kietzmann M, Kemper N, Schulz J, Mateus-Vargas RH (2022) Innovative Perspectives on Biofilm Interactions in Poultry Drinking Water Systems and Veterinary Antibiotics Used Worldwide. *Antibiotics* 11:77. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010077>
34. Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, Muzammil S, Rasool M, Yasmeen N, Shah T, Chaudhry TH, Rasool MH, Shahid A, Xueshan X, Baloch Z (2021) Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol* 11:771510. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>

35. Lim JY, Yoon J, Hovde CJ (2010) A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol* 20:5–14
36. Ghorbani A, Khoshbakht R, Kaboosi H, Shirzad-Aski H, Peyravii Ghadikolaii F (2022) Study on antibiotic resistance and phylogenetic comparison of avian-pathogenic *Escherichia coli* (APEC) and uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolates. *Vet Res Forum* 13:569–576. <https://doi.org/10.30466/vrf.2021.527563.3160>
37. Maluta RP, Logue CM, Casas MRT, Meng T, Guastalli EAL, Rojas TCG, Montelli AC, Sadatsune T, de Carvalho Ramos M, Nolan LK, da Silveira WD (2014) Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extra-intestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil. *PLoS One* 9:e105016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105016>
38. Meena PR, Priyanka P, Singh AP (2023) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) reservoirs, and antibiotics resistance trends: a one-health surveillance for risk analysis from “farm-to-fork.” *Lett Appl Microbiol* 76:ovac016. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovac016>
39. García V, García-Meniño I, Gómez V, Jiménez-Orellana M, Méndez A, Aguarón A, Roca E, Mora A (2022) Mobile colistin resistance (MCR), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and multidrug resistance monitoring in *Escherichia coli* (commensal and pathogenic) in pig farming: need of harmonized guidelines and clinical breakpoints. *Front Microbiol* 13:1042612. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1042612>
40. EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2023. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFSA Journal* 2023;21(3):7867, 232 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7867>
41. Commission Implementing Regulation (EU) 2024/1973 of 18 July 2024 establishing a list of antimicrobials which shall not be used in accordance with Articles 112 and 113 of Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council or which shall only be used in accordance with those Articles subject to certain conditions https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2024/1973/oj Accessed 25 Oct 2024
42. Commission Delegated Regulation (EU) 2022/1644 of 7 July 2022 supplementing Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council with specific requirements for the performance of official controls on the use of pharmacologically active substances authorised as veterinary medicinal products or as feed additives and of prohibited or unauthorised pharmacologically active substances and residues thereof https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_del/2022/1644/oj Accessed 25 Oct 2024

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálámat mindazoknak, akik segítsége és támogatása nélkül ez a szakdolgozat nem jöhetett volna létre.

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Adorján Andrásnak, aki értékes szakmai tudásával és útmutatásaival támogatta a dolgozat elkészítését, és mindvégig végtelen türelemmel és emberséggel fordult felém.

Szeretném megköszönni Dr. Tenk Miklósnak és a Járványtani és Mikrobiológiai Tanszéknek, hogy befogadták a témámat, biztosították a szükséges erőforrásokat és segítettek a munkám megvalósításában.

Végül, de nem utolsósorban szeretném kifejezni hálámat szüleimnek és barátaimnak, akik végig támogattak ezen az úton és a legnehezebb pillanatokban is mellettem álltak.