# TDK DOLGOZAT

**Nagyházi Balázs**

**2025**

**ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM**

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

# Hazai nagylétszámú sertésállományokból izolált, multirezisztens *Escherichia coli* törzsek kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) termelésének vizsgálata új generációs szekvenálással

Készítette:

**Nagyházi Balázs**

5. évf. áo. hallgató

Témavezető:

Dr. Kerek Ádám

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, egyetemi adjunktus

**Budapest**

**2025**

# Tartalomjegyzék


1. Bevezetés ..... 4
2. Irodalmi áttekintés ..... 5
   - 2.1. Az antimikrobiális rezisztencia globális helyzete ..... 5
   - 2.2. Az *Escherichia coli* nemzetség jelentősége ..... 9
   - 2.3. Az antimikrobiális rezisztencia mechanizmusai *Escherichia coli* törzsekben ..... 11
   - 2.4. Kiterjedt spektrumú β-laktamázok (ESBL) ..... 13
   - 2.5. Új generációs szekvenálás (NGS) ..... 14
3. Célkitűzések ..... 16
4. Anyag és módszer ..... 17
   - 4.1. A vizsgálatba bevont törzsek eredete ..... 17
   - 4.2. Minimális gátló koncentráció (MIC) érték meghatározás ..... 17
   - 4.3. Fenotípusos kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) szűrés ..... 18
   - 4.4. Szekvenálási protokoll ..... 18
   - 4.5. Bioinformatikai elemzés ..... 19
5. Eredmények ..... 21
   - 5.1. Fenotípusos szűrési eredmények ..... 21
   - 5.2. A kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) termeléshez kapcsolódó genetikai vizsgálati eredmények ..... 22
   - 5.3. Az egyéb antibiotikum csoportok genetikai vizsgálati eredményei ..... 24
6. Következtetések ..... 32
7. Összefoglalás ..... 38
8. Summary ..... 39
9. Irodalomjegyzék ..... 40
10. Köszönetnyilvánítás ..... 48

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

| | |
|---|---|
| AMEG | Antimikrobiális Tanácsadó Ad Hoc Szakértői Bizottsága |
| AMR | Antimikrobiális rezisztencia |
| APEC | Madárpatogén *E. coli* |
| ARG | Antimikrobiális rezisztencia gén |
| CLSI | *Clinical Laboratory Standard Institute* |
| *E. coli* | *Escherichia coli* |
| EFSA | Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság |
| ESBL | Kiterjedt spektrumú β-laktamáz |
| ExPEC | Extraintestinális patogén *E. coli* |
| MGE | Mobilis genetikai elem |
| MIC | Minimális gátló koncentráció |
| NGS | Új generációs szekvenálás |
| NMEC | Újszülöttek meningitiszéért felelős *E. coli* |
| UPEC | Uropatogén *E. coli* |

# 1. BEVEZETÉS

Az antibiotikumok felfedezése és széles körű alkalmazása a 20. század egyik legnagyobb orvostudományi áttörésének tekinthető, amely döntő mértékben hozzájárult a fertőző betegségek visszaszorításához és az élettartam növekedéséhez. Az antimikrobiális szerek túlzott és gyakran nem megfelelő használata azonban mára világszerte a rezisztens baktériumok elterjedéséhez vezetett, amely az Egészségügyi Világszervezet (WHO) szerint az egyik legsúlyosabb globális közegészségügyi fenyegetés. Az állattenyésztésben alkalmazott antibiotikumok szerepe kettős, egyrészt az állatbetegségek kezelésében és megelőzésében nélkülözhetetlenek, másrészt azonban szelektív nyomást gyakorolnak a kórokozókra és a bélmikrobiom tagjaira, elősegítve a rezisztenciagének kialakulását és fennmaradását. A sertéságazatban a nagyüzemi tartásmód, a zsúfoltság és a gyakori gyógyszerhasználat különösen kedvez a rezisztens baktériumtörzsek kialakulásának. Ezek a törzsek nemcsak állategészségügyi problémát jelentenek, hanem a zoonotikus átadás lehetősége révén az emberi egészségre is kockázatot hordoznak.

Jelen dolgozat célja, hogy feltárja a hazai, nagylétszámú sertésállományokból izolált, multirezisztens *Escherichia coli* (*E. coli*) törzsek rezisztencia génjeinek gyakoriságát, különös tekintettel a kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) termelésért felelős génekre. A vizsgálat során arra törekedtünk, hogy a fenotípusos tesztek és az új generációs szekvenálás (NGS) alapú genetikai elemzés összekapcsolásával átfogó képet kapjunk a rezisztencia-mechanizmusok sokféleségéről, azok eloszlásáról és hordozási mintázatairól. Az eredmények hozzájárulhatnak a rezisztencia terjedésének jobb megértéséhez, valamint alapot nyújthatnak a jövőbeni monitorozási és kockázatcsökkentési stratégiákhoz.

# 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

## 2.1. Az antimikrobiális rezisztencia globális helyzete

Az antibiotikumokat az 1950-es évektől kezdve alkalmazzák az állattenyésztésben nemcsak terápiás, hanem profilaktikus és metafilaktikus célból is, vagyis a bakteriális eredetű megbetegedések kialakulásának megelőzésére, illetve a fertőzött, de még tünetmentes állatok kezelésére. Emellett több – elsősorban harmadik világhoz tartozó – országban máig elterjedt gyakorlat az antibiotikumok hozamfokozó célú felhasználása is, melynek során a készítményeket az állatok takarmányához vagy ivóvizéhez keverik, hogy javítsák a takarmányhasznosítás hatékonyságát. Ez a hatás feltehetően a bélmikrobiom összetételének kedvező irányba történő eltolódásával függ össze [1]. A gyakorlatban sokszor az is probléma, hogy nem megfelelően választják ki az antibiotikumok terápiás dózisait. Az ilyen és az ezekhez hasonló felelőtlen antibiotikum használat során az antibiotikum koncentrációja a szervezetben ugyan meghaladja az adott baktériumra jellemző minimális gátló koncentrációt (MIC), ugyanakkor nem éri el a minimális baktericid koncentrációt (MBC). Ez olyan szelekciós nyomást eredményez, amely elősegíti a rezisztens baktériumtörzsek kialakulását és fennmaradását, hozzájárulva a napjainkra globális problémává vált antimikrobiális rezisztencia (AMR) terjedéséhez. Ez a jelenség nem csupán az állatállományokat érinti, hiszen a rezisztenciáért felelős gének a baktériumok között horizontális géntranszfer (HGT), például konjugáció, transzdukció vagy transzformáció útján átadhatók más baktériumoknak, így azok megjelenhetnek akár humánpatogén törzsekben is. Ennek következményeként az állattenyésztés során alkalmazott antimikrobiális szerek szelekciós hatása révén a rezisztenciagének az embereket is megbetegíteni képes baktériumokba kerülnek és kimutathatóvá válnak [2, 3]. Ennek a közegészségügyi vonatkozásai kiemelt jelentőséggel bírnak, különösen a multirezisztenciára hajlamos *Enterococcus* fajok, a *Campylobacter* fajok, a *Salmonella* fajok és az *E. coli* esetében. Ezek a baktériumok egyre nagyobb arányban hordoznak antimikrobiális rezisztencia géneket (ARG), amelyek jelentős mértékben hozzájárulnak a kezelések eredményességének csökkenéséhez, a halálozási ráta emelkedéséhez, valamint az egészségügyi ellátás költségeinek növekedéséhez [1, 4].

Az antibiotikum használat előnyeinek széles körű megismerésével párhuzamosan globális szinten jelentős mértékben megnőtt a felhasználásuk. Ezt jól szemlélteti az a tény, hogy 2010-ben az állatállományokban világszerte több mint 63 000 tonna antibiotikumot használtak fel, és ez a mennyiség azóta folyamatos növekedést mutat. A Nemzeti

Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (Nébih) jelentése szerint Magyarországon 2022-ben 22,7 tonna antibiotikumot használtak fel csak a sertéságazatban [6]. A növekedés mögött a világ állati eredetű fehérjék iránti egyre fokozódó kereslete áll; az elmúlt 50 év során e fogyasztás több mint négyszeresére emelkedett. Ez nagyobb létszámú termelőállatot, valamint hatékonyabb, intenzívebb termelési rendszereket igényel, ami együtt jár az antibiotikumok alkalmazásának növekedésével is [1, 7].

Globális szinten az állattenyésztésen belül az antibiotikum-felhasználás mennyisége a sertés-, a baromfi-, majd a szarvasmarha-ágazat csökkenő sorrendjében figyelhető meg. Ezzel párhuzamosan az AMR kialakulása is ezekben a szektorokban a legjelentősebb. Az egyes országok közül a legnagyobb antibiotikum-felhasználás Kína, az Egyesült Államok, Brazília, India és Németország esetén figyelhető meg [7]. 2020-ban az Európai Unióban az állattenyésztésben felhasznált antibiotikumok 32%-át a sertéságazat használta fel, míg a Nébih 2022-es magyarországi jelentése szerint ez 61,9%-ot tett ki [6], aminek jelentős része a kritikusan fontos β-laktám antibiotikumok – különösen a harmadik és negyedik generációs cefalosporinok – csoportjába tartozik, amelyek alkalmazása elősegíti az ESBL enzimeket termelő *E. coli* törzsek kiszelektálódását [8]. Ugyanakkor világszinten a sertésállományokban a leggyakrabban és legnagyobb mennyiségben alkalmazott antibiotikumok elsősorban a penicillinek és a tetraciklinek közül kerülnek ki. Ezek közegészségügyi szempontból kevésbé fontos hatóanyagoknak számítanak, ami részben annak is köszönhető, hogy a hosszú ideje tartó, széles körű alkalmazásuk következtében a humán gyógyászatban háttérbe szorultak, a velük szemben kialakult kiterjedt rezisztencia következtében [9].

Egyes becslések szerint az Egyesült Államokban évente több mint 2,8 millió antibiotikumokra rezisztens bakteriális fertőzést diagnosztizálnak a humán medicinában, amelyek közül mintegy 35 000 halálos kimenetelű. Globális szinten a legelső, 2014-es becslés szerint évente körülbelül 700 000 humán haláleset volt az AMR-hez köthető, ami 2020-ra körülbelül 1,4 millióra nőtt és ha a jövőben nem történnek még hatékonyabb intézkedések, ez a szám 2050-re elérheti akár a 10 milliót is [13–15]. Ez a prognózis jól érzékelteti a probléma súlyát és sürgető jellegét.

Az AMR problémakörének globális felismerése és súlyosságának mérlegelése számos intézkedéshez vezetett világszerte, annak visszaszorítása érdekében. Ennek egyik első jelentős lépéseként 2006. január 1-jétől az Európai Unió betiltotta az antibiotikumok

hozamfokozás céljából történő alkalmazását az állattenyésztésben. Egy másik meghatározó intézkedés az antibiotikumok humánegészségügyi jelentőségük szerinti osztályozása volt az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) Antimikrobiális Tanácsadó Ad Hoc Szakértői Bizottsága (AMEG) által. E rendszer célja, hogy az állatgyógyászatban elsősorban a közegészségügyi szempontból kevésbé fontos hatóanyagokat alkalmazzák, míg a humán gyógyászat számára kiemelten fontos szereket kizárólag végső, indokolt esetben és nagy körültekintéssel használják fel [10]. Az *E. coli* okozta fertőzések kezelésében használt, a közegészségügy számára tartalékolt antibiotikumok közé tartoznak a fluorokinolonok és a kolisztin. Egyes országok, mint például Dánia és az Egyesült Államok, a fluorokinolonok használatát már betiltották a baromfiban előforduló *E. coli* törzsek okozta fertőzések kezelésében. Ennek következményeként az ezen hatóanyagokkal szembeni rezisztencia mértéke jelentősen csökkenni kezdett. Míg 2003-ban Dániában a baromfiból izolált *E. coli* törzsek 10%-a mutatott rezisztenciát ciprofloxacinnal szemben, addig 2006-ra ez az arány 4,5%-ra csökkent [3].

Az AMR terjedésének egyik kulcsfontosságú tényezője az állatok bélcsatornájában élő mikrobiom, amely az antibiotikum-kezelések során gyakran találkozik szubletális dózisú antibiotikumokkal. Ez lehetőséget ad a rezisztens törzsek kiszelektálódására, amelyek a rezisztenciagéneket akár patogén baktériumfajoknak is átadhatják. Ez pedig nemcsak az állatokban, hanem emberekben is potenciálisan életet veszélyeztető fertőzések kialakulásához vezethet [11, 12]. Az első olyan tanulmány 1976-ban készült, amely összefüggést mutatott ki a haszonállatokból izolált és a humán eredetű baktériumtörzsek antibiotikum-rezisztenciája között [19].

Az ARG-k táplálékláncban való hatékony terjedéséhez az szükséges, hogy a baktériumok ne csupán vertikálisan (utódaiknak), hanem horizontálisan (egymás között) is képesek legyenek átadni ezeket a genetikai elemeket. A HGT során a rezisztenciagének nemcsak azonos, hanem eltérő fajba tartozó baktériumok között is átkerülhetnek. E folyamat három fő mechanizmusa a konjugáció, a transzdukció és a transzformáció. A konjugáció során szex-fimbria segítségével létrejött kapcsolat révén történő plazmidátadás történik a donor és a recipiens baktérium között. Transzdukcióról akkor beszélünk, amikor a bakteriofág örökítőanyagába beépülő ARG-t a vírus továbbítja egy másik baktériumba. A transzformáció során a környezetbe került, szabadon jelenlévő DNS-szakaszok bekebelezése történik az élő baktériumsejtek által [20, 21]. Ezek közül a mechanizmusok közül a leggyakoribb és legjelentősebb mechanizmus a konjugáció, amelynek alapfeltétele,

hogy az adott gén mobilis genetikai elemen (MGE) helyezkedjen el – például plazmidon vagy fágon. A kromoszómába ágyazott rezisztenciagének sokkal kisebb eséllyel adódnak át horizontálisan, mivel előbb mobilizálódniuk kell, jellemzően plazmidokra való átkerülés útján, ezért azok elsősorban vertikálisan öröklődnek tovább [22, 23]. A mobilis genetikai elemek, mint például az inzerciós szekvenciák, transzpozonok és integronok kulcsszerepet játszanak a rezisztenciagének terjedésében. Ezek képesek genetikai információt beépíteni, újrapozicionálni, és más baktériumokban kifejeződésre juttatni, különösen akkor, ha plazmidokon találhatók, mivel így sokkal gyorsabban és szélesebb spektrumban terjedhetnek [24, 25]. A közegészségügyi kockázat szempontjából, vagyis hogy az ARG-k mennyire képesek átjutni az állati patogénekből az embereket megbetegítő baktériumokba, a filogenetikai rokonság is fontos iránymutató tulajdonság [26]. Környezeti mintavételek során számos tanulmány mutatott ki ESBL-termelő *E. coli* törzseket vadon élő állatokból, különösen olyan fajokból, amelyek valószínűsíthetően soha nem kerültek közvetlen kapcsolatba antibiotikumokkal. Kiemelt szerepük van ebben a vadon élő madaraknak, mivel vándorlásuk során nagy földrajzi távolságokra képesek eljuttatni rezisztens törzseket, vagy az azokban megtalálható mobilis genetikai elemeket [27–30].

Az ARG-k „szántóföldtől az asztalig” való terjedésének folyamatát kiemelten fontos ismerni abból a szempontból, hogy hol lehet hatékony beavatkozásokkal mérsékelni az ARG-k és a rezisztens patogén baktériumok emberi szervezetbe jutását, valamint a potenciálisan súlyos fertőzések kialakulását. Az állatok bélsarukkal nagy mennyiségben képesek üríteni az ARG-ket, amelyek a bélsárral szennyezett környezetbe, így a talajba, a szennyvízbe, a felszíni vizekbe, végső soron pedig akár az öntözés révén a mezőgazdasági növényekbe is bekerülhetnek. Ezeket a növényeket takarmányként az állatok közvetve vagy közvetlenül elfogyaszthatják, így kialakul egy visszacsatolt, ciklikus folyamat, amelyben az ARG-k folyamatos körforgásban maradnak [16–18].

A fent leírtakat kiválóan összekapcsolja az úgynevezett „*One Health*”, azaz Egy Egészség koncepció, amely azt hangsúlyozza, hogy az emberek, állatok, növények és a közös környezetük egészsége elválaszthatatlanul összefügg. Ez a megközelítés az antimikrobiális rezisztencia esetében is kulcsfontosságú, hiszen a rezisztens fertőzések forrása nemcsak az emberi antibiotikum-használat lehet, hanem bizonyítottan hozzájárul ehhez az állatgyógyászatban alkalmazott antibiotikumok használata is [31]. Ennek felismeréseként az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2017-ben globális cselekvési tervet

dolgozott ki az AMR visszaszorítása érdekében, amiben a *One Health* szemlélet minden egyes szintjén különböző stratégiai célokat határozott meg [32].

A jövő egyik legfontosabb feladata, hogy hatékony alternatívákat találjunk az antibiotikumok kiváltására vagy azok kiegészítésére, mivel az új antibiotikumok felfedezési üteme jelentősen elmarad a multirezisztens baktériumtörzsek szelektálódásának és elterjedésének sebességétől [16]. Az egyik legígéretesebb lehetőség a bakteriális fertőzést megelőző vakcinák jelentik, amelyek alkalmazása bizonyítottan jelentős mértékben hozzájárul az antibiotikum-használat csökkentéséhez. Bár a vakcinák nem nyújtanak 100%-os védelmet, gyakorlati jelentőségük vitathatatlan, különösen azon kórokozók esetében, amelyekkel szemben a terápiás lehetőségek korlátozottak vagy magas fokú rezisztenciát mutatnak [33]. A vakcinázás hatékonyságát jól szemlélteti a sertések proliferatív enteropathiájának menedzsmentje, ahol több telepen is jelentős mértékben csökkent az antibiotikumok felhasználása a vakcinázási protokoll bevezetését követően [34].

## 2.2. Az *Escherichia coli* nemzetség jelentősége

Az *E. coli* baktérium az *Enterobacteriaceae* családon belül az *Escherichia* nemzetségbe tartozik. Gram-negatív, pálca alakú baktérium, amely aerob, illetve fakultatív anaerob anyagcserét folytat. Egy fakultatív patogén faj, vagyis a legtöbb törzs normál esetben nem patogén, azonban bizonyos hajlamosító tényezők jelenlétében, mint például az immunhiányos állapot, képes megbetegedést okozni. A bélmikrobiom kolonizációja már a születést követő percekben megkezdődik, és ennek jelentős részét képezik az *E. coli* törzsek. Vannak azonban olyan változatok, amelyek evolúciójuk során virulenciafaktorokat kódoló géneket szereztek, amelyek lehetővé teszik számukra a szervezetben való nagyobb térnyerést, valamint specifikus kórképek kialakítását. Ezeket a törzseket patotípusokként emlegetjük [35, 36]. Az *E. coli* közegészségügyi jelentősége nemcsak patogenitásában rejlik, hanem abban is, hogy a környezetben és az élelmiszerlánc szinte minden pontján jelen van. Ennek következtében hatékony rezisztenciagén-közvetítőként szolgálhat az élelmiszertermelő állatok és az emberek között [26]. A speciális virulenciafaktorokkal rendelkező *E. coli* törzsek két fő csoportra oszthatók, amelyek az intestinális és extraintestinális kórképet okozó patotípusok. Az intestinális kórképekhez hat patotípus tartozik: az enterotoxikus (*ETEC*), az enterohemorrhagiás (*EHEC*), az enteroinvazív (*EIEC*), az enteroaggregatív (*EAEC*), az enteropatogén (*EPEC*), valamint a diffúzan tapadó (*DAEC*) patotípus. A leggyakoribb extraintestinális megbetegedéseket okozó típusok közé tartozik a húgyúti fertőzésekért felelős uropatogén *E. coli* (*UPEC*), a szepszishez társuló *E. coli*

(*SEPEC*), az újszülöttek meningitiszért felelős *E. coli* törzs (*NMEC*), valamint a baromfifélékben előforduló madárpatogén *E. coli* (*APEC*) [37, 38].

Ezeket a patotípusokat rendszerint két felszíni antigén kombinációja alapján sorolják be, amik az „O" antigén (lipopoliszacharid, LPS) és a „H" antigén (flagelláris, csillófehérje). Az ezek alapján történő osztályozást szerotípusnak nevezzük [39]. A törzsek patogenitásának megítélésében segítséget nyújt a filogenetikai csoportosítás is. Eszerint négy fő csoport különböztethető meg: A, B1, B2 és D. Az extraintestinális patogén törzsek túlnyomó többsége a B2 és D csoportba sorolható, míg a kommenzalista (ártalmatlan) törzsek jellemzően az A és B1 csoportba tartoznak. Az intestinális patogének az A, B1 vagy D csoportból kerülnek ki [38, 40].

Az extraintestinális patogén *E. coli* (*ExPEC*) törzsek fakultatív patogének, amelyek gyakran az állatok és emberek bélmikrobiomjának természetes részeként vannak jelen. Klinikai jelentőségük akkor válik hangsúlyossá, amikor olyan specifikus helyekre jutnak el, mint például a húgyutak, a véráram vagy a központi idegrendszer, ahol képesek kifejteni patogenitásukat. Virulenciájuk alapját azok a virulenciafaktorok képezik, amelyeket gyakran mobilis genetikai elemek (plazmidok, transzpozonok) kódolnak. Ez lehetővé teszi számukra, hogy ezeket a géneket más, környezetükben élő baktériumoknak is átadják. Ezt az is alátámasztja, hogy e törzsek eredetileg kommenzalista baktériumok lehettek, de horizontális géntranszfer útján virulenciafaktorokat hordozó genetikai szakaszokat szereztek [38, 41, 42]. Egy afrikai vizsgálat rávilágított a virulenciagének ilyen típusú terjedésének jelentőségére *E. coli* törzsekben [43]. Az ExPEC törzsek által okozott leggyakoribb megbetegedések a húgyúti fertőzések, amelyeket jellemzően az UPEC törzsek okoznak. Az ambuláns kórházi betegek húgyúti fertőzéseinek körülbelül 80%-ban ezek a törzsek mutathatók ki, és a nozokomiális húgyúti fertőzések jelentős részében is ugyanezeket azonosítják. Az UPEC törzsek specifikus virulenciafaktoraik révén képesek intracellulárisan is bejutni a hámsejtekbe, ahol szaporodásuk révén tartós fertőzést képesek fenntartani [44–46]. Ha ezek a törzsek túlzottan elszaporodnak a húgyutakban, károsíthatják az uroepitelt, és a véráramba jutva szepszist idézhetnek elő, de bizonyos esetekben a bélből kiindulva is hasonló következmények alakulhatnak ki [47]. Egy másik súlyos és potenciálisan életet veszélyeztető kórkép az ExPEC törzsek által okozott NMEC, amely szintén összefügghet szepszis kialakulásával. A jelenlegi ismeretek szerint a véráramba bejutó *E. coli* NMEC törzsek a vér-agy gát endotélsejtjeihez kötődve egy specifikus receptorhoz (Caspr-1) kapcsolódnak, és ezen keresztül képesek behatolni a központi idegrendszerbe, ahol

gyulladást idéznek elő. A baromfiban előforduló APEC törzsek pedig súlyos, nagy morbiditású és mortalitású megbetegedéseket okoznak. Más patogénekkel, mint például *Mycoplasma* fajokkal társulva szepszist, valamint savóshártyagyulladást idézhetnek elő [48].

Az intestinális patogén *E. coli* (InPEC), más néven hasmenéses *E. coli* (DEC) törzsek világszerte elterjedtek, és különböző enteritiszes, hasmenéssel járó kórképeket okoznak. Az *ETEC* törzsek a bél kolonizációját követően profúz, vizes jellegű hasmenéssel járó gyulladást okoznak. Ez a baktérium által termelt kétféle toxin, a hőstabil (ST) és a hőre labilis (LT) enterotoxin hatásának tudható be, amelyek ugyan nem károsítják közvetlenül a bélhámsejteket, de fiziológiás működésüket megzavarva a szekréció fokozásán keresztül okoznak tüneteket [49–51]. Az *EPEC* törzsek ezzel szemben nemcsak a sejtek működését befolyásolják, hanem masszív adhézióval kötődnek a hámsejtekhez az intimin nevű fehérje segítségével, ezzel a hám integritását is károsítják. Ez a bélhám hiperpláziájához és gyulladásához vezet, ami szintén hasmenéssel jár [52]. Az *EHEC* törzsek patogenitása egy különleges, Vero toxin (más néven Shiga toxin, STX) termeléséhez kötődik, amely többek között az endotélsejtek áteresztőképességét fokozza. Ennek következtében sertésekben ödémabetegség alakulhat ki, amelynek látványos tünete a test különböző pontjain kialakuló vizenyő [53]. Az *EAEC* törzsek esetében a betegség kialakulásában valószínűleg a bél kolonizációja, a sejtekhez való adhézió és a toxintermelés együttesen játszanak szerepet, és a fertőzés hasmenéses tünetekkel jár [54]. Az *EIEC* törzsek különlegessége abban rejlik, hogy a legtöbb *E. coli* törzzsel ellentétben valódi intracelluláris kórokozók. Bejutnak a vastagbél epitéliumába, ott szaporodnak, majd sejtről sejtre terjednek, miközben enterotoxinokat is termelnek, amelyek összességében jelentős mértékű hasmenést idéznek elő. A DAEC törzsek patomechanizmusa jelenleg még nem teljesen tisztázott, de feltételezhetően ezek is hasmenéses megbetegedéseket okoznak [39].

### 2.3. Az antimikrobiális rezisztencia mechanizmusai *Escherichia coli* törzsekben

Az antimikrobiális rezisztencia kialakulásának mechanizmusai között megkülönböztetünk természetes (*intrinsic*) és szerzett (*acquired*) rezisztenciát. A természetes rezisztencia az adott baktériumfaj összes törzsére jellemző, és független az antibiotikumokkal való korábbi találkozástól. *E. coli* esetében ennek legkézenfekvőbb példája a Gram-negatív baktériumokra jellemző külső membrán, amely vastag lipopoliszacharid (LPS) rétegéből adódóan alacsony permeabilitást mutat, különösen a hidrofil hatóanyagokkal szemben [55]. Ezzel szemben a szerzett rezisztencia olyan, az

antibiotikum-expozíció következtében kialakuló védekezési forma, amely evolúciós előnyt biztosít a baktériumnak. A rezisztencia kialakulása spontán genetikai változásoknak (mutációk), illetve horizontális géntranszfernek köszönhető. Az antibiotikumok stresszfaktorként hatnak a baktériumra, amelynek következtében megnövekszik a mutációs ráta az osztódás során. Ez pedig növeli annak esélyét, hogy olyan hasznos mutációk alakuljanak ki, amelyek elősegítik a túlélésüket [56]. Az egyik leggyakoribb szerzett rezisztencia-mechanizmus az *E. coli* esetében az antibiotikumot lebontó enzimek termelése. Ezen belül a legjelentősebbek a β-laktám antibiotikumok ellen termelődő β-laktamázok, amelyek közül a leghatékonyabb típusokat ESBL enzimeknek nevezzük [57]. A β-laktamázok az antibiotikum molekulán belüli β-laktám gyűrűt hidrolizálják, azaz megszakítják annak szerkezetét. Ennek következtében a molekula elveszíti sejtfalszintézist gátló képességét [58]. Az *E. coli* sejtfala eleve csökkent áteresztőképességű bizonyos hatóanyagokkal szemben, de a baktérium képes tovább csökkenteni ezt a permeabilitást azáltal, hogy a külső membrán porin csatornáinak expresszióját csökkenti, vagy azok szelektivitását módosító mutációkat hordoz. Ezek a porinok fontos bejutási kapuk a hidrofil antibiotikumok számára, így módosításuk jelentősen csökkenti az antimikrobiális szerek hatékonyságát [59].

Egy másik fontos rezisztenciamechanizmus az efflux pumpák megnövekedett expressziója és sejtfelszínre történő kihelyezése. Ezek a speciális membránfehérjék képesek aktívan kipumpálni a sejten belülre jutott molekulákat, ezáltal csökkentve intracelluláris koncentrációjukat, így minimalizálva azok káros hatását [60]. Az *E. coli* által hordozott efflux pumpák öt nagy családba sorolhatók, amelyek eltérő szerkezeti és működési jellemzőkkel rendelkeznek. Ezek közé tartozik az *ATP Binding Cassette* (ABC – ATP-kötő kazetta), amely ATP-hidrolízis révén aktívan juttatja ki a sejt belsejéből a káros anyagokat; a *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE) több gyógyszer és toxikus vegyület extrudálását végző pumpák, amelyek proton- vagy nátriumgradiens segítségével működnek; a *Small Multidrug Resistance* (SMR) kis méretű multirezisztencia pumpák, amelyek főként kis, lipofil molekulákat távolítanak el; a *Major Facilitator Superfamily* (MFS) fő facilitátor szupercsalád, amely elektrokémiai gradiens által hajtott transzportereket foglal magában; valamint a *Resistance Nodulation Division* (RND) rezisztencia noduláció divízió család, amely főként Gram-negatív baktériumokban jellemző, és a külső membránon átívelő többkomponensű pumpák révén széles spektrumú szubsztrátokat képesek eltávolítani [61].

Egy széles körben elterjedt efflux mechanizmus az *E. coli*-ban előforduló *emrAB-tolC* rendszer, amely egy többkomponensű efflux pumpa. Ez két MFS családba tartozó alegységből, az *emrA*-ból és *emrB*-ből, valamint egy külső membránfehérjéből (*tolC*) áll. A rendszer képes többek között a fluorokinolon típusú antibiotikumok sejten kívülre történő eltávolítására is [62].

## 2.4. Kiterjedt spektrumú β-laktamázok (ESBL)

Az ESBL-t termelő baktériumokat először az 1980-as években írták le. Ekkor vált nyilvánvalóvá, hogy a β-laktamázokkal szemben korábban hatékony cefalosporinok szakszerű és hatékony alkalmazása ellenére is kialakulhat rezisztencia. Rövid időn belül megjelentek olyan baktériumtörzsek, amelyek új típusú β-laktamázokat termeltek, és képesek voltak hidrolizálni a második és harmadik generációs cefalosporinokat is. Az első ilyen ARG-k, amelyeket azonosítottak, a *TEM-1* és az *SHV-1* gének voltak. Ezek azóta számos mutáció révén tovább fejlődtek, és az ARG-k osztályozása alapján jelenleg 11 fő családba soroljuk ezeket az ESBL-enzimeket [63, 64]. A legelterjedtebb és legnagyobb közegészségügyi jelentőséggel bíró géncsalád a *CTX-M*-típus, ezen belül különösen a *CTX-M-1* gén, amelynek előfordulása számos európai országban, például Németországban és Görögországban is domináns [65, 66]. További gyakori géntípusok közé tartozik a *CMY-2* gén, az *SHV-12* gén, valamint a *TEM* és az *OXA* családba tartozó génváltozatok [67, 68]. Az ESBL-termelő enzimek elsősorban a Gram-negatív baktériumokban fordulnak elő, különösen az *E. coli* és a *Klebsiella* fajok körében. Ezek az enzimek képesek hidrolizálni nemcsak a penicillineket és a cefalosporinokat, hanem a monobaktámokat is, ugyanakkor a karbapenemek ellen általában hatástalanok. A β-laktamáz inhibitorok (pl. klavulánsav, tazobaktám) bizonyos esetekben csökkentik hatékonyságukat. Ez különbözteti meg az ESBL-enzimeket az AmpC-típusú β-laktamáz enzimektől, amelyek jellemzően kevésbé érzékenyek a β-laktamáz gátló szerekre [65, 69–71].

A β-laktamázokat két fő szempont szerint csoportosítják, mégpedig molekuláris és funkcionális alapon. A molekuláris osztályozás során a β-laktamázokat aminosav-szekvencia alapján négy fő osztályba sorolják: A, B, C és D, az ABC nagybetűivel jelölve. Ezzel szemben a funkcionális besorolás az enzimek szubsztrát-specificitásán és inhibitor-érzékenységén alapul. Eszerint az I. csoportba tartoznak a cefalosporinázok (pl. *ampC* gén), a II. csoportba az ESBL-ek, a III. csoportba pedig a metallo-β-laktamázok, amelyek fémiont igényelnek működésükhöz [58, 72]. Az ESBL-ek közül a *CTX-M*-típusú gének a legelterjedtebbek, nevüket a cefotaxim-hidrolízisének képességéről kapták (cefotaximáz).

Ezek a gének többségében plazmidon helyezkednek el, ami lehetővé teszi a horizontális géntranszfert és gyors terjedésüket különböző baktériumtörzsek között. A jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján mintegy 172 különböző *CTX-M*-variánst ismerünk, amely jól példázza az antibiotikumokhoz való folyamatos bakteriális alkalmazkodást, valamint az ARG-k globális elterjedését [72].

## 2.5. Új generációs szekvenálás (NGS)

A baktériumok antibiotikumokkal szembeni érzékenysége kétféle megközelítéssel vizsgálható, nevezetesen fenotípusos és genotípusos módszerekkel. A fenotípusos érzékenység például korongdiffúziós vagy mikrodilúciós módszerekkel határozható meg, amelyet a genotípusos vizsgálat jól kiegészít az ARG-k kimutatása segítségével. Ez utóbbi vizsgálat egyik legmodernebb eszköze a teljes, vagy más néven új generációs genom szekvenálás, amely részletes információt nyújt a törzsek genetikai hátteréről. A fenotípusos vizsgálatok ugyanakkor továbbra is referencia-vizsgálatként szolgálnak, amelyekkel a genomszekvenálás eredményei összevethetőek [5].

A szekvenálás az elmúlt évtizedek egyik legdinamikusabban fejlődő technológiai területe, amely jelentős mértékben hozzájárul az AMR genetikai hátterének mélyebb megértéséhez [69]. A szekvenálás lényege a nukleinsavak (DNS vagy RNS) nukleotid sorrendjének meghatározása, amelyek az élőlények genetikai információját hordozzák. Baktériumok esetében ez rendszerint a DNS-t érinti, amelyet előzetes DNS-izolálással nyerünk ki a vizsgált törzsekből. A teljes genom szekvenálás (WGS) önmagában nem elegendő, mivel a nyers szekvencia adatokat bioinformatikai elemzésnek kell alávetni, hogy értelmezhető információvá váljanak. A genom szekvenálás és annak informatikai feldolgozása együttesen alkotja a genomika tudományterületét [73].

A szekvenálás története az 1970-es években indult a Sanger-szekvenálással, majd folytatódott a shotgun szekvenálással. Ezek a technikák kezdetben csak kisebb DNS-szakaszok egyidejű meghatározását tették lehetővé, így egy teljes genom szekvenálása hosszadalmas és költséges folyamat volt. A számítástechnológia fejlődésével megjelent a teljes genomra kiterjedő shotgun szekvenálás, amely mérföldkőnek számított, hiszen ezzel sikerült elsőként egy teljes baktérium, a *Haemophilus influenzae* genomját meghatározni [74–76]. Az első NGS technológiák közé tartozik a Roche 454 rendszer, amely a nukleotidok beépülésekor felszabaduló pirofoszfátok detektálásán alapszik. További kiemelt jelentőségű rendszerek a HiSeq és a MiSeq, amelyek a szintézissel történő

szekvenálás (SBS) elvét alkalmazzák [77]. Szintén fontos technológia az *Ion Torrent*, amely az úgynevezett félvezető szekvenálást alkalmazza az újonnan beépülő nukleotidokhoz társuló pH-változások mérésén keresztül [78].

Az NGS mára a mikrobiológia számos területén elterjedt módszer lett. Kiemelt előnyt jelent azoknál a nehezen tenyészthető mikroorganizmusoknál, amelyek klasszikus rutinmódszerekkel nehezen azonosíthatók [79]. Az NGS technológia virulenciagének detektálására is széles körben alkalmazott; gyakori például az *E. coli* által termelt Shiga-toxin génszakaszának szekvenálása [80]. Az NGS nemcsak virulenciagének, hanem ARG-k vizsgálatára is kiválóan alkalmas, akár a virulenciagénekkel párhuzamosan. Az így nyert adatok segítségével következtetni lehet arra is, hogy az állatállományokban kiszelektálódó rezisztens törzsek potenciálisan mennyire virulensek lehetnek emberben, és mekkora közegészségügyi kockázatot jelentenek [5]. Jelen dolgozatban az NGS módszer alkalmazása elsősorban a rezisztenciagének kimutatására irányul, amely minden valószínűség szerint közegészségügyi szempontból a legjelentősebb felhasználási területe, mind klinikai, mind epidemiológiai aspektusok figyelembevételével [81]. Az antibiotikum-rezisztencia vizsgálatának hagyományos módja a fenotípusos meghatározás, például a korongdiffúziós teszt vagy a leveshígításos módszer. Az NGS ezekhez képest egy alternatív és korszerű megközelítést kínál, amely a baktérium genotípusának ismeretében, jó közelítéssel előre jelezheti a fenotípusos rezisztenciát egyes antibiotikumokkal szemben. Az utóbbi években egyre több tanulmány hasonlítja össze a klasszikus fenotípusos tesztek eredményeit az NGS alapú predikciókkal, és ezek az összehasonlítások nagyrészt megbízható egyezést mutatnak [82].

## 3. CÉLKITŰZÉSEK

Dolgozatunk célja a hazai, nagylétszámú sertésállományokból izolált, multirezisztens *E. coli* törzsek antimikrobiális rezisztencia profiljának átfogó feltérképezése volt, különös tekintettel az ESBL-termelő izolátumokra. Elsődleges törekvésünk az volt, hogy fenotípusos előszűrést követően genotípusos módszerek együttes alkalmazásával olyan részletes képet nyerjünk, amely segít feltárni a rezisztencia kialakulásának és fennmaradásának hátterét, valamint a rezisztenciagének hordozási mintázatát.

Ennek érdekében először fenotípusos vizsgálatokkal meghatároztuk a β-laktamáz- és ESBL-termelő törzsek arányát, és felmértük, hogy a különböző korcsoportokból származó izolátumokban milyen eltérések mutathatók ki. A fenotípusosan ESBL-pozitív törzsek genetikai hátterét ezt követően NGS segítségével vizsgáltuk, amely lehetőséget adott a főként *CTX-M* és *TEM* családba tartozó gének azonosítására, valamint az AmpC-mediált rezisztencia-mechanizmusok elkülönítésére. A szekvenálási eredmények feldolgozása során célunk volt a rezisztenciagének széles spektrumának azonosítása, így az aminoglikozid-, tetraciklin-, fluorokinolon-, polimixin-, trimetoprim-szulfonamid-, makrolid- és fenikol-rezisztencia hátterének feltárása, valamint az efflux pumpák és a regulátor gének jelenlétének értékelése.

Fontos célkitűzésünk volt annak meghatározása is, hogy a kimutatott gének milyen hordozóelemeken – kromoszómán, plazmidon vagy MGE-hez kötötten – fordulnak elő, hiszen a lokalizáció döntően befolyásolja a horizontális géntranszfer lehetőségét és így a rezisztencia terjedésének dinamikáját. Az NGS-eredmények és a fenotípusos vizsgálatok összevetésével igyekeztünk feltárni, hogy mennyiben magyarázzák a genetikai mechanizmusok a fenotípusosan tapasztalt rezisztenciát, illetve hol jelentkezhetnek olyan módszertani korlátok, amelyek fals pozitív vagy fals negatív eredményekhez vezethetnek.

Végső soron a dolgozat célja az volt, hogy részletes képet adjon a hazai sertésállományokban jelen lévő rezisztencia helyzetéről, és hozzájáruljon annak megértéséhez, hogy milyen tényezők játszanak szerepet a multirezisztens *E. coli* törzsek fennmaradásában és terjedésében. Az eredmények nemcsak állategészségügyi szempontból bírnak jelentőséggel, hanem az élelmiszerlánc-biztonság és a humán egészség védelmének vonatkozásában is, így hozzájárulhatnak a jövőbeli monitorozási és kockázatcsökkentési stratégiák megalapozásához.

# 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

## 4.1. A vizsgálatba bevont törzsek eredete

A minták gyűjtése 2023 végén történt, egy nyugat-dunántúli, egy dél-dunántúli és két dél-alföldi nagylétszámú sertéstelepről, a telepeket ellátó állatorvosok segítségével, mely mintavétel a rutindiagnosztikai vizsgálatok része volt. Az így vett mintákat kaptuk meg további felhasználásra, amely minták széntartalmú, Amies-típusú transzport táptalajú mintavevő (Biolab Zrt., Budapest, Magyarország) rendszer segítségével kerültek beszállításra az Állatorvostudományi Egyetem Járványtani és Mikrobiológiai Tanszékre. Az ott izolált baktériumtörzsek színtenyészetét kaptuk meg további vizsgálatokra. A baktériumtörzseket Microbank gyöngyös módszerrel (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada) fagyasztva tároltuk -80 °C-on.

## 4.2. Minimális gátló koncentráció (MIC) érték meghatározás

A szekvenálásra kerülő törzsek kiválasztását megelőzően a MIC meghatározását végeztük el, a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) módszertani irányelvei szerint [56], A rezisztencia küszöbértékeket (breakpointokat) szintén a CLSI ajánlásai alapján határoztuk meg [56].

A -80 °C-on tárolt baktériumtörzseket a vizsgálatot megelőző napon 3 ml kationos adalékkal dúsított Müller-Hinton táplevesbe (CAMHB) szuszpendáltuk, majd 37 °C-on 18–24 órán át inkubáltuk. A MIC-meghatározás során 96 lyukú mikrotiter lemezeket alkalmaztunk (VWR International, LLC., Debrecen, Magyarország), melyeket lyukanként 90 µl CAMHB-vel töltöttünk meg. A vizsgált antibiotikumokból (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) a CLSI előírásainak megfelelően 1024 µg/ml koncentrációjú törzsoldatokat készítettünk [56]. Ezekből 90 µl-t pipettáztunk a mikrotiter lemezek első oszlopaiba, majd kettes hígítási sort alakítottunk ki. A 10. oszlop után a felesleges folyadékot eltávolítottuk, így minden lyuk végső térfogata 90 µl maradt. A baktériumszuszpenziót 0,5 McFarland értékre állítottuk be Nefelométer segítségével (ThermoFisher Scientific, Budapest, Magyarország), majd minden lyukba 10 µl-nyi mennyiséget oltottunk be, a 11. oszloptól kezdve visszafelé haladva [56]. A MIC-értékek leolvasását a Sensititre™ SWIN™ automatikus leolvasórendszer, valamint a VIZION rendszer 3.4-es verziója (ThermoFisher Scientific, Budapest, Magyarország) segítségével végeztük. A minőségellenőrzést az ATCC 25922 jelű *E. coli* referenciatörzs alkalmazásával biztosítottuk.

### 4.3. Fenotípusos kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) szűrés

Az ESBL-termelés kimutatásához a CLSI által javasolt eljárást alkalmaztuk [83]. A vizsgált baktériumtörzsek MIC-értékét kétféle készítményre határoztuk meg, nevezetesen cefotaximra, illetve cefotaxim-klavulánsav kombinációra. Utóbbi esetében minden hígítás során állandó, 4 µg/ml klavulánsav koncentrációt biztosítottunk. A mikrotiter lemezeket 37 °C-on, termosztátban temperált körülmények között 18–24 órán át inkubáltuk, majd az eredményeket értékeltük. A CLSI definíciója alapján akkor tekinthető egy törzs ESBL-termelőnek, ha az antibiotikum-klavulánsav kombinációval mért MIC-érték legalább háromszoros csökkenést mutat az antibiotikum hatóanyag önálló alkalmazásával szemben. Például, ha a cefotaxim MIC-értéke 32 µg/ml, míg a cefotaxim-klavulánsav kombináció esetében ez 2 µg/ml-re csökken (négyszeres csökkenés), akkor az adott törzs ESBL-termelés gyanúját veti fel. Fontos megjegyezni, hogy a módszer nem tökéletes, bizonyos, klasszikusan nem ESBL-termeléshez kapcsolódó gének – például *ampC* vagy *ampH* – fokozott expressziója β-laktamáz túltermelést idézhet elő, ami hamis pozitív eredményhez vezethet az ESBL-teszt során.

### 4.4. Szekvenálási protokoll

A bakteriális DNS izolálását a Zymo Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) alkalmazásával végeztük, a gyártói protokoll betartásával. A sejtek mechanikus feltárásához gyöngyös homogenizálást alkalmaztunk, amelyet a Qiagen TissueLyzer LT készülékkel (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) hajtottunk végre 50 Hz-en, 5 percen keresztül. A kinyert DNS-mintákat -20 °C-on tároltuk a további felhasználásig. A szekvenálásra szánt minták páros végű olvasatait a Novogene végezte Illumina NextSeq 500 platformon. Az Illumina technológia hídamplifikáción alapuló, páros végű (*paired-end*) megközelítést használ, melynek során a DNS-fragmenseket oligonukleotidokhoz rögzítik, majd a fordított szálak eltávolítását követően fluoreszcens módon jelölt nukleotidokat olvasnak le szekvenálás közben [84, 85].

A DNS-könyvtárak elkészítéséhez az Illumina Nextera XT DNA Library Preparation Kit-et (Illumina, San Diego, USA) alkalmaztuk. A fragmentált DNS-indexeléshez a Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina, San Diego, USA) indexeinek i5 és i7 primerpárjait használtuk. A mintákat 0,2 ng/µl végső koncentrációra hígítottuk 2,5 µl térfogatra, majd hozzáadtunk 5 µl Tagment DNA puffer és 2,5 µl Amplicon Tagment Mix oldatot. A tagmentációs reakciót 55 °C-on 6 percen keresztül inkubáltuk Eppendorf Mastercycler nexus

GX2 termosztátos PCR-készülékben (Eppendorf SE, Hamburg, Németország), majd 10 °C-ra hűtöttük.

A reakció semlegesítéséhez 2,5 µl Neutralize Tagment puffert adtunk, és a keveréket szobahőmérsékleten 5 percig inkubáltuk. A könyvtárépítéshez 7,5 µl Nextera PCR Master Mixet kombináltunk 2,5–2,5 µl indexprimerekkel, majd a tagmentált DNS-t ezzel amplifikáltuk. A PCR-protokoll egy 30 másodperces, 95 °C-on végzett denaturálással indult, majd 12 ciklust tartalmazott (95 °C – 10 mp, 55 °C – 30 mp, 72 °C – 30 mp), végül egy 5 perces elongációs lépés következett 72 °C-on, a reakciót 10 °C-ra hűtéssel zártuk.

Az így keletkezett, indexált könyvtárakat a Geneaid Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech, Hszinpej, Tajvan) segítségével tisztítottuk oszlopos elválasztási módszerrel. A DNS mennyiségi meghatározását Qubit dsDNA HS Assay kittel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) végeztük fluorometriás elven. Az egyedileg indexelt könyvtárakat megfelelő hígítást követően összevegyítettük további feldolgozás céljából.

### 4.5. Bioinformatikai elemzés

A nyers szekvenálási adatok minőségének előzetes értékelését a FastQC v0.11.9 [86], a Fastp v0.23.2-3 [87] és a Bloocoo v1.0.7 [88] szoftverekkel végeztük. Ezek az eszközök lehetővé tették az adapterek, kiegyensúlyozatlan báziseloszlás és gyenge minőségű régiók azonosítását, valamint részben azok javítását. A nem megfelelő szekvenciák eltávolításához a TrimGalore v0.6.6 [89] szoftvert használtuk. A megtisztított, minőségileg ellenőrzött leolvasásokat de novo kontigokká (*contigs*) állítottuk össze két különböző assemblerrel: MEGAHIT v1.2.9 [90] és SPAdes 4.0.0 [91]. A két független összeállítás eredményeit egyesítettük a GAM-NGS v1.1b program [92] segítségével, hogy robusztusabb, megbízhatóbb draft genomszekvenciát kapjunk.

A keletkezett kontigokat a QUAST v5.2 szoftver [93] és a Busco v5 [94] eszközökkel validáltuk, hogy felmérjük az összeszerelés minőségét és teljességét. A genom alapvető tulajdonságait a GenomeScope v2.2 [95] segítségével becsültük meg, amely k-mer eloszlás alapján képes a genomméret, lefedettség és heterozigozitás becslésére. Ezek az információk kritikusak a további bioinformatikai analízis paramétereinek meghatározásához, és megerősítik a szekvenálás megbízhatóságát.

A kontigokban található potenciális nyílt leolvasási kereteket (*open reading frames*, ORF) a Prodigal v2.6.3 [96] program segítségével jósoltuk. Az ezekben található

antimikrobiális rezisztenciagéneket (ARG) a *Resistance Gene Identifier* (RGI) v5.1.0 és az ABRicate [97] szoftverrel azonosítottuk, a *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) [98] adatbázis alapján. Csak azokat a géneket tekintettük relevánsnak, amelyek megfeleltek a CARD szigorú (STRICT) küszöbértékének, és legalább 90%-os szekvenciaazonosságot és lefedettséget mutattak.

A "*coverage*" érték a szekvenálás mélységét jelöli – vagyis hogy egy adott pozíció hány alkalommal került leolvasásra –, míg az "*identity*" azt mutatja meg, hogy a vizsgált és a referenciaszekvencia hány százalékban egyezik meg.

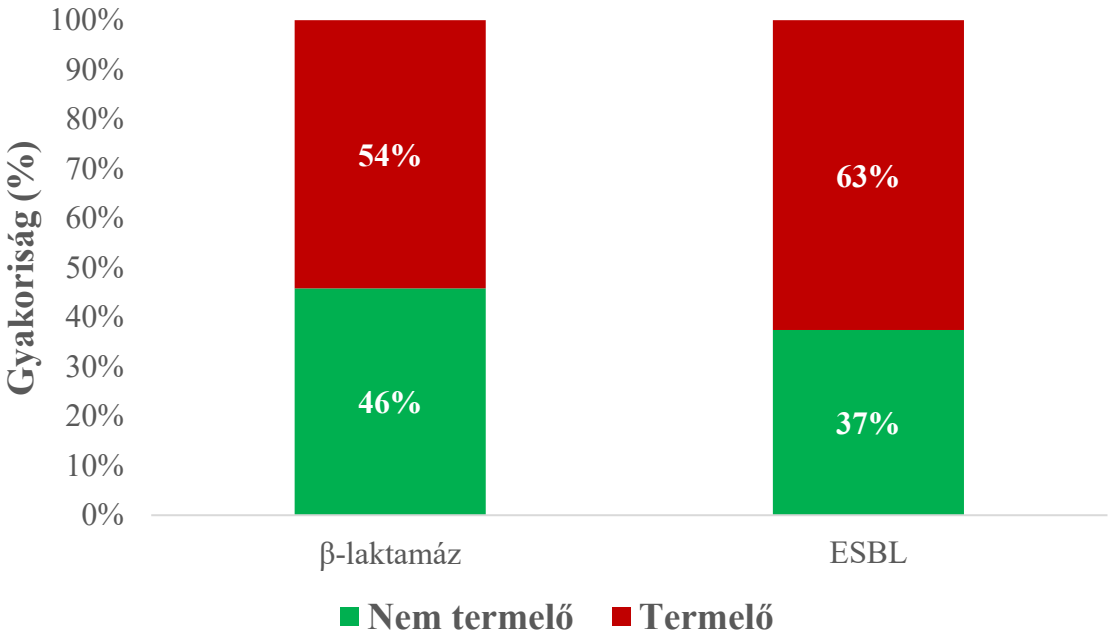
A kimutatott ARG-k mobilis genetikai elemként (MGE) való előfordulását a MobileElementFinder v1.0.3 [99] szoftverrel vizsgáltuk. Egy ARG-t akkor tekintettünk mobilisnak, ha az adott mikroorganizmusra jellemző, adatbázisban szereplő maximális transzpozon-távolságon belül helyezkedett el.

Ezen kívül a kontigok plazmid eredetét a PlasFlow v1.1 [100] program segítségével értékeltük. Mind az MGE-k, mind a plazmidok esetében csak azokat az eredményeket vettük figyelembe, amelyek legalább 10 000 bázispárnyi azonosítást mutattak. A fajazonosítást a CheckM v1.2.2 [101] és a Kraken v1.1.1 [102] programcsomagok segítségével végeztük el.

# 5. EREDMÉNYEK

## 5.1. Fenotípusos szűrési eredmények

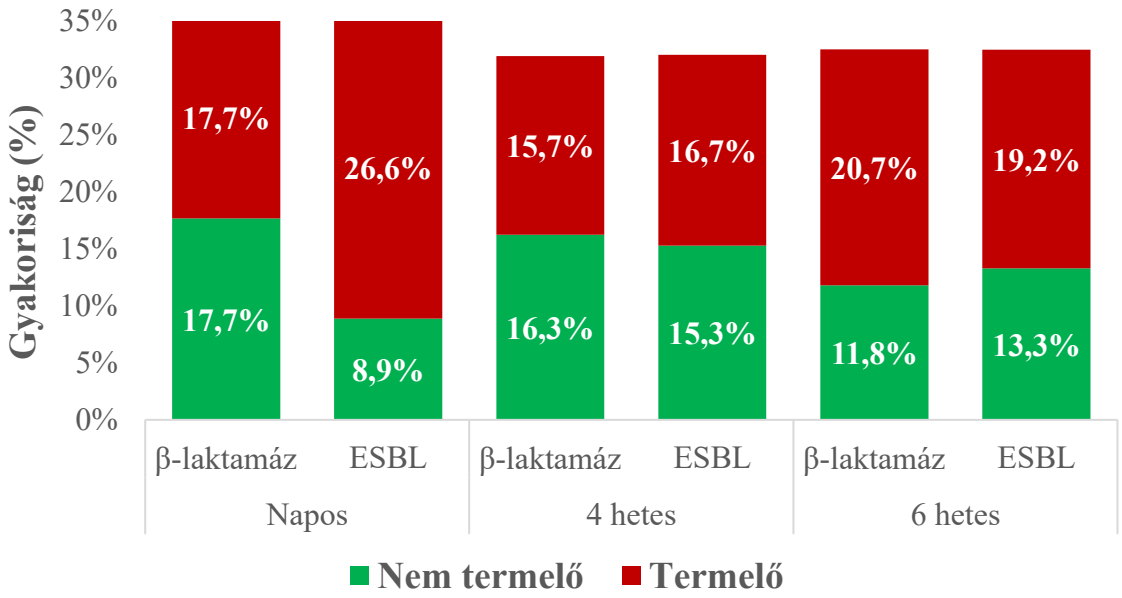
A fenotípusosan vizsgált 203 *E. coli* törzs közül 110 (54%) esetében feltételezhető volt a β-laktamáz enzim termelése, míg 127 törzs (63%) bizonyult kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) termelőnek. Ezzel szemben 93 izolátum (46%) nem mutatott β-laktamáz aktivitást, és 76 törzs (37%) nem sorolható az ESBL-termelők közé. Az eredmények alapján a törzsek több mint fele rendelkezik valamilyen β-laktamáz enzimtermelő képességgel, ami jelentős mértékű antibiotikum-rezisztenciára utal a hazai nagylétszámú sertéstelepekről származó mintákban (**1. ábra**).




**1. ábra** A sertésekből izolált *Escherichia coli* törzsek (*n*=203) közül fenotípusosan β-laktamáz és kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) termelőnek bizonyult izolátumok aránya.

A korcsoportok szerinti bontásban vizsgált *E. coli* törzsek fenotípusos rezisztenciavizsgálata során markáns eltérések voltak megfigyelhetők mind a β-laktamáz-, mind az ESBL-termelés gyakoriságában. A napos malacokból származó minták esetében a β-laktamáz termelő és nem termelő törzsek aránya megegyezett, egyaránt 36 törzset (17,7%) érintett. Ugyanebben a korcsoportban az ESBL-termelők száma 54 volt (26,6%), míg a nem termelőké csupán 18 (8,9%). A 4 hetes malacoknál kevesebb volt az ESBL-termelés aránya, 34 törzs (16,7%) mutatott pozitív fenotípust, míg 31 törzs (15,3%) nem termelt ESBL-t. Ebben a korcsoportban a β-laktamáz termelés tekintetében hasonlóan kiegyenlített megoszlás volt megfigyelhető (32 termelő, 33 nem termelő törzs). A 6 hetes korcsoportban

ismételten magasabb β-laktamáz aktivitás volt jelen, 42 törzs (20,7%) termelt enzimet, szemben a 24 nem termelővel (11,8%). Az ESBL-termelés ebben a korcsoportban 39 törzset (19,2%) érintett, míg a negatív fenotípust 27 törzsnél (13,3%) detektáltuk. Az adatok alapján az ESBL-termelés legmagasabb arányban a napos malacokban fordult elő, míg a β-laktamáz termelés dominanciája a 6 hetes korban volt a legszembetűnőbb (**2. ábra**).

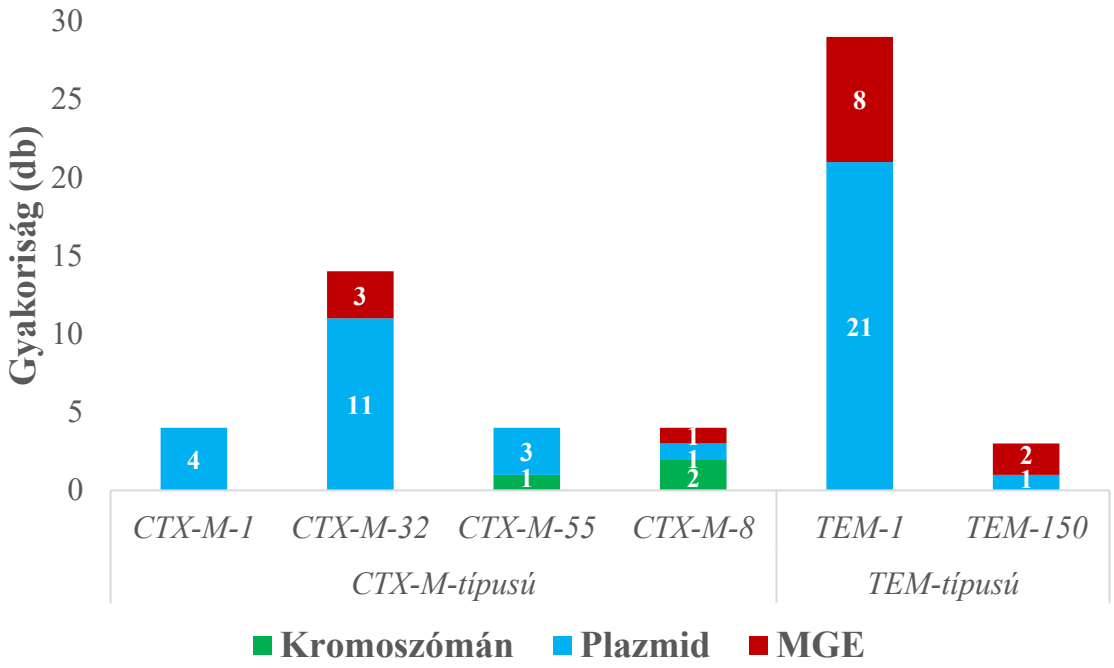



**2. ábra** A sertésekből izolált *Escherichia coli* törzsek (*n*=203) közül fenotípusosan β-laktamáz és kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) termelőnek bizonyult izolátumok csoportosítása életkor szerint.

## 5.2. A kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) termeléshez kapcsolódó genetikai vizsgálati eredmények

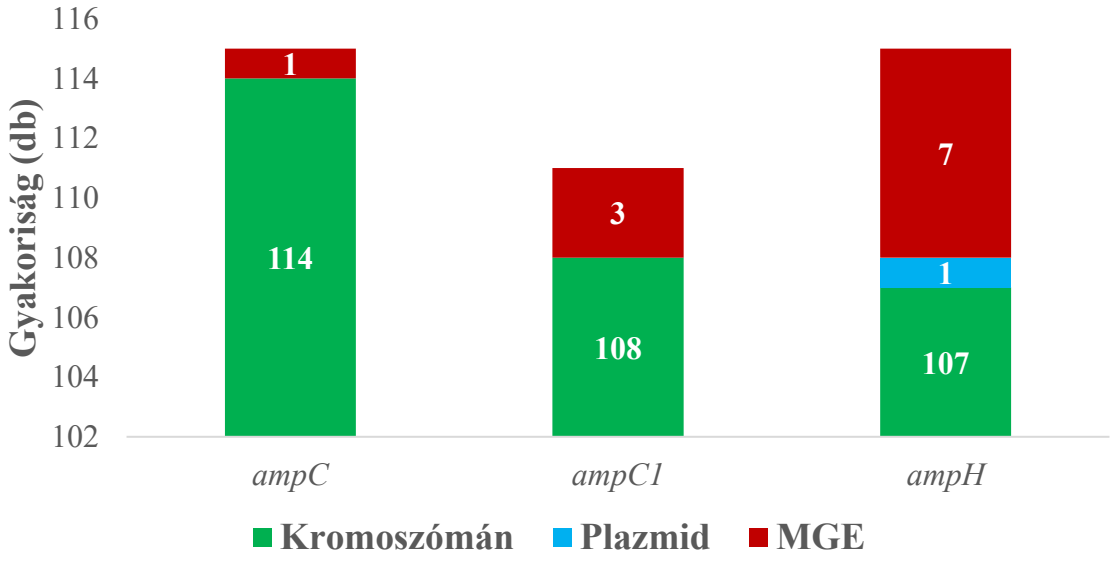
A 127 fenotípusosan ESBL-termelő törzs közül 116 minta kivont DNS-koncentrációja volt megfelelő ahhoz, hogy NGS-el vizsgáljuk. Ezekből a mintákból összesen 82 különböző ARG került azonosításra, amelyek 5427 esetben fordultak elő.

Az ESBL-termelésért felelős géneket 50 mintában (43,1%) tudtuk azonosítani. A CTX-M család variánsai különböző lokalizációkkal fordultak elő, a *CTX-M-1* gént 4 esetben plazmidon; a *CTX-M-32* gént 11 esetben plazmidon, további 3 esetben MGE-ként azonosítottuk; a *CTX-M-55* gén egy esetben kromoszómán, illetve további három esetben plazmidon; a *CTX-M-8* gént pedig két esetben kromoszómán, egy esetben plazmidon, és még egy esetben MGE-hez kapcsolódóan mutattuk ki. A TEM családból a *TEM-1* gént 21 esetben plazmidon mutattuk ki, 8 esetben MGE volt; a *TEM-150* gént 1 esetben plazmidon, 2 esetben pedig MGE-ként azonosítottuk (**3. ábra**).




**3. ábra** A fenotípusosan leválogatott sertés eredetű *Escherichia coli* törzsekben (*n*=127), új generációs szekvenálását követően azonosított, klasszikus kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) termelésért felelős gének gyakorisága.

A többi minta esetén, amelyek fenotípusosan potenciálisan ESBL-termelőnek bizonyultak, a pozitivitás hátterében *ampC*, illetve *ampH* géneket azonosítottunk, amelyek minden mintában jelen voltak. Ezeknek a géneknek az aktivitása klasszikusan β-laktamáz túltermeléshez vezet, ami a fenotípusos ESBL-teszt esetén gyakran fals pozitivitást eredményezhet (**4. ábra**).

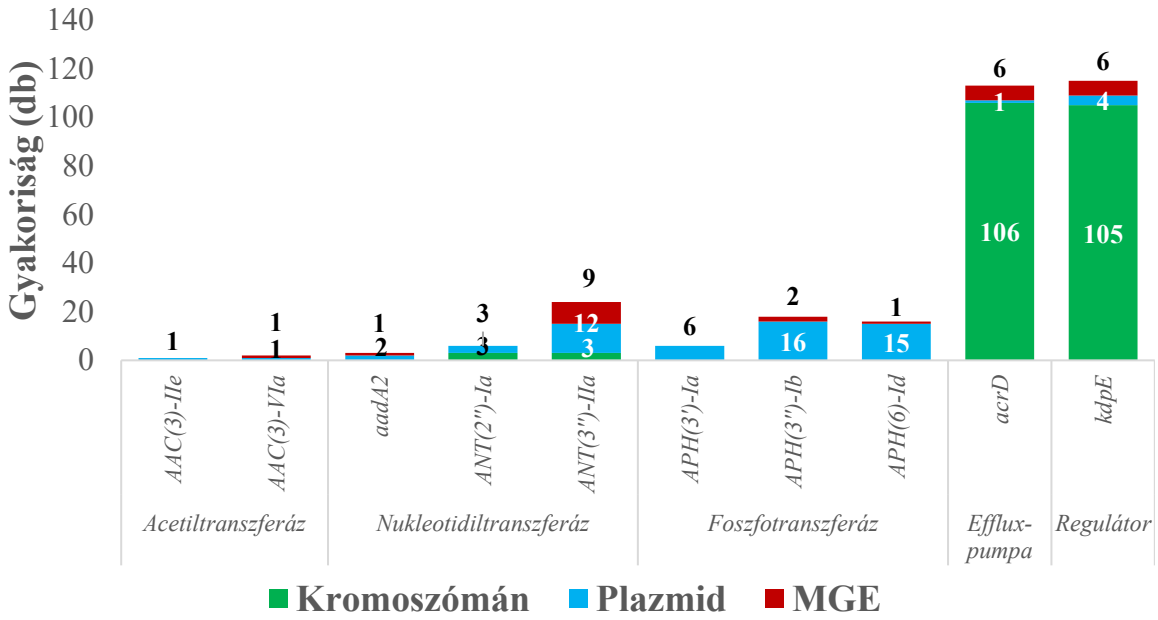



**4. ábra** A leválogatott sertés eredetű *Escherichia coli* törzsekben (*n*=127), új generációs szekvenálását követően azonosított, β-laktamáz túltermelésért felelős gének gyakorisága.

### 5.3. Az egyéb antibiotikum csoportok genetikai vizsgálati eredményei

Az aminoglikozid-rezisztenciához kapcsolódó enzimek széles spektrumát sikerült azonosítani a vizsgált törzsekben. Az acetiltranszferázok közül az *AAC(3)-IIe* gént egy esetben plazmidon, míg az *AAC(3)-VIa* gént egy-egy esetben plazmidon és MGE-ként detektáltuk. A nukleotidiltranszferáz gének közül az *aadA2* gén két esetben plazmidon és egy esetben MGE-ként fordult elő, míg az *ANT(2'')-Ia* gént három törzs kromoszómálisan és három plazmidon hordozta. Az *ANT(3'')-IIa* gén viszonylag gyakori volt, összesen 24 esetben mutattuk ki (3 db kromoszómán, 12 db plazmidon és 9 db MGE). A foszfotranszferáz enzimek közül az *APH(3')-Ia* gén hat esetben plazmidon, az *APH(3'')-Ib* gén 16 esetben plazmidon és két esetben MGE formájában, míg az *APH(6)-Id* gén 15 esetben plazmidon és egy esetben MGE formájában fordult elő (**5. ábra**).

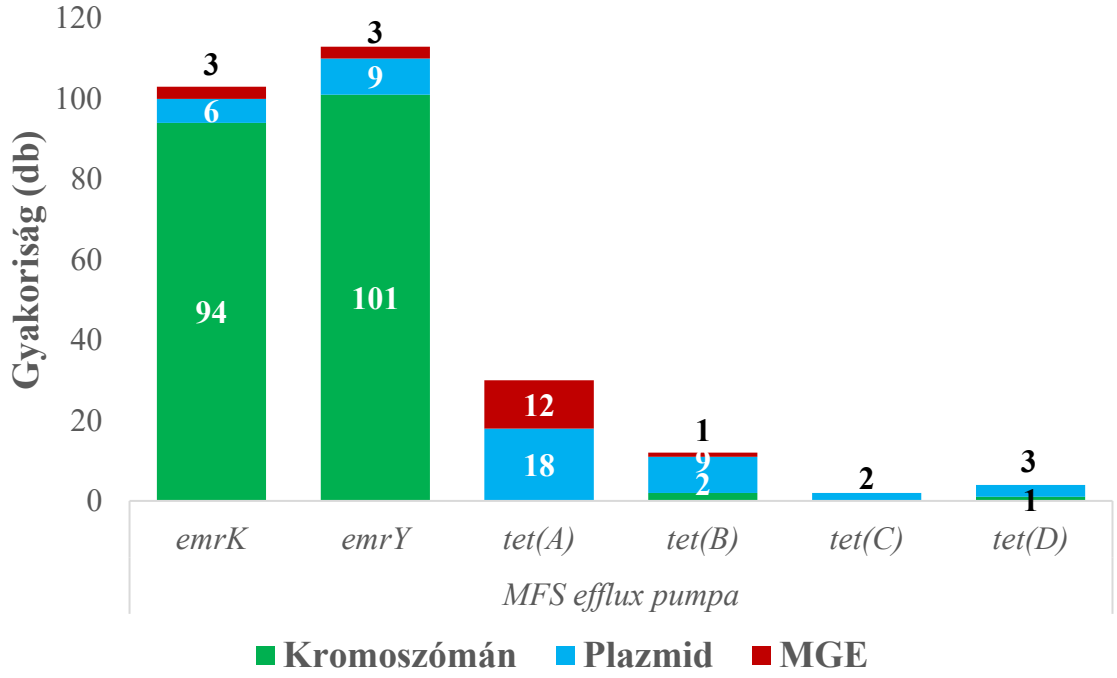
Az aminoglikozidok elleni rezisztenciában kiemelt szerepe van az *acrD* efflux-pumpát szabályozó génnek, amit 106 esetben kromoszómálisan, továbbá egy esetben plazmidon és hat esetben MGE-hez kötődve mutattunk ki. A regulátor *kdpE* gén 105 esetben kromoszómálisan, emellett négy plazmidon és hat MGE lokalizációban fordult elő.




**5. ábra** A fenotípusosan leválogatott sertés eredetű *Escherichia coli* törzsekben (*n*=127), új generációs szekvenálását követően azonosított, kifejezetten aminoglikozid hatóanyagokkal szembeni rezisztencia kialakításáért felelős gének gyakorisága.

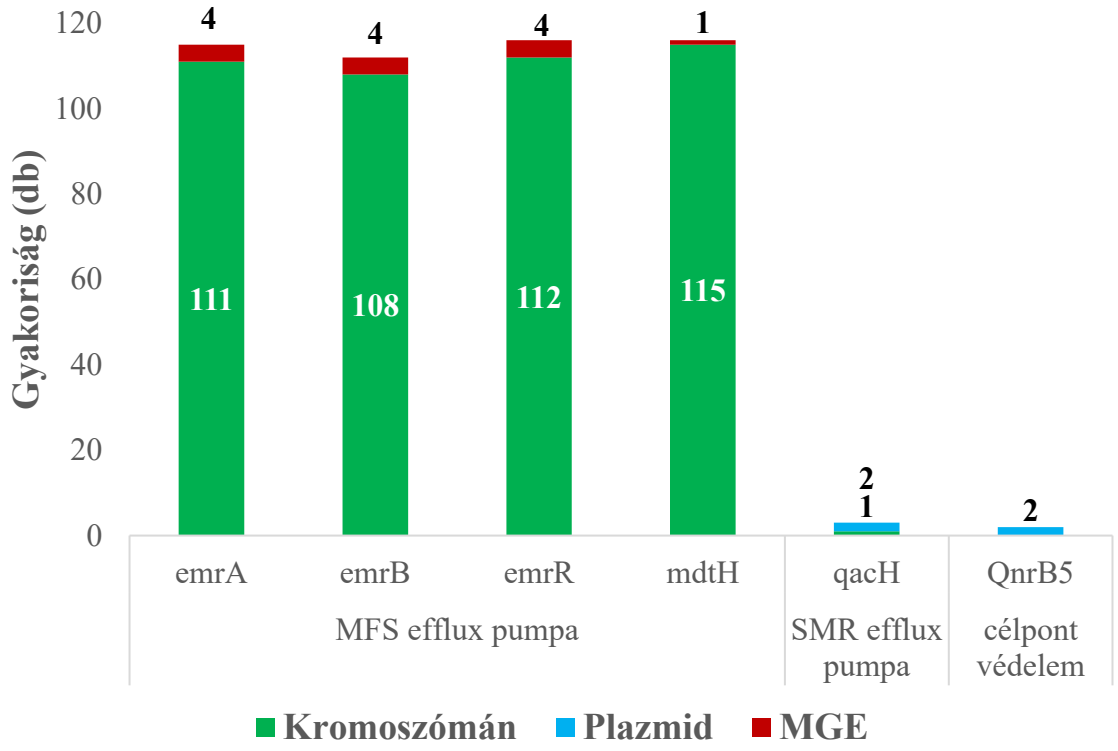
A tetraciklin rezisztenciához kapcsolódó gének efflux pumpákhoz voltak köthetőek. Az *emrK* gén 94 esetben kromoszómán, emellett 6 esetben plazmidon volt és 3 esetben MGE formájában jelent meg. Az *emrY* gén még ennél is gyakoribb volt, 101 esetben

kromoszómálisan, 9 plazmidon jelent meg és 3 MGE-hez kötött formában fordult elő. A *tet* gének közül a leggyakoribb a *tet(A)* volt, amely közül 18 gént plazmidon és 12 gént MGE formájában detektáltunk. A *tet(B)* ritkábbnak bizonyult, 2 esetben kromoszómán, 9 esetben plazmidon fordult elő és egy esetben MGE volt. A *tet(C)* gén kizárólag plazmidon jelent meg két esetben, míg a *tet(D)* gén egy kromoszómális és 3 plazmidos előfordulással volt jelen (**6. ábra**).



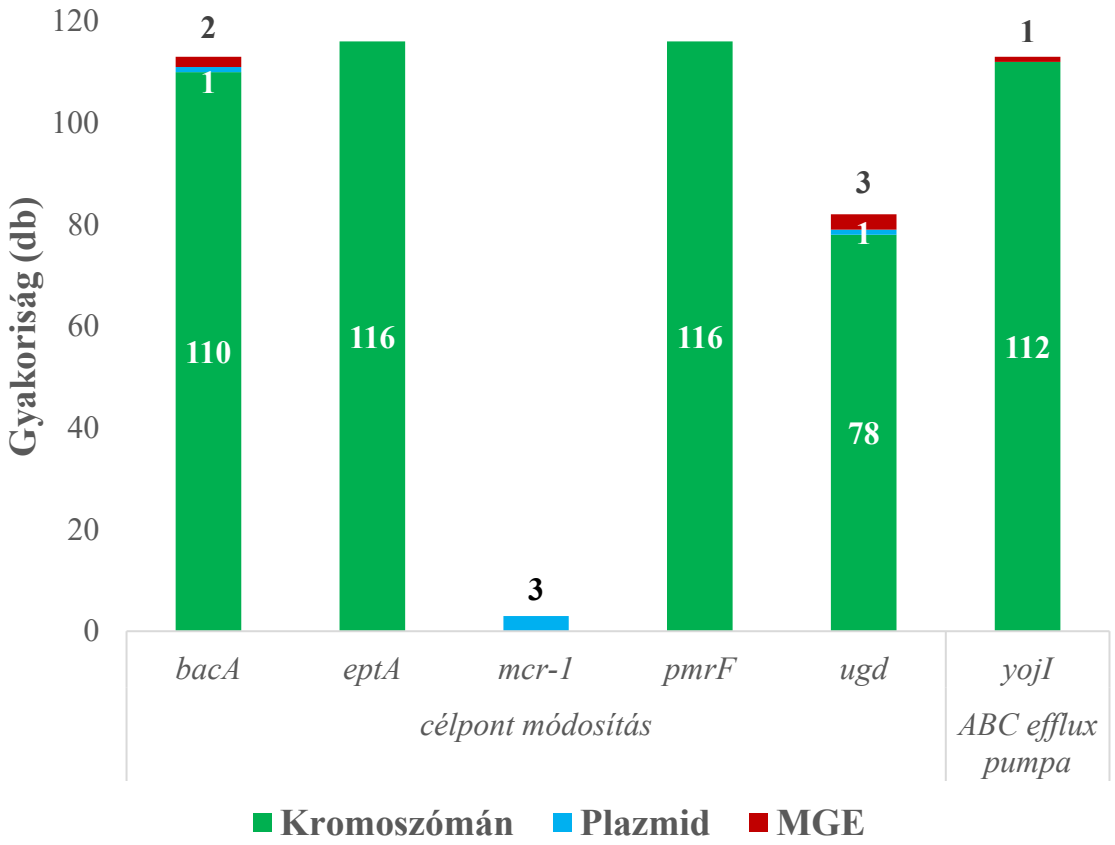

**6. ábra** A fenotípusosan leválogatott sertés eredetű *Escherichia coli* törzsekben (*n*=127), új generációs szekvenálását követően azonosított, kifejezetten tetraciklin hatóanyagokkal szembeni rezisztencia kialakításáért felelős gének gyakorisága.

A fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia génszintű hátterében a célpontvédelemhez kapcsolódó *qnrB5* gént azonosítottuk két esetben, kizárólag plazmidon. A multidrug-efflux pumpa mechanizmusokhoz tartozó *Major Facilitator Superfamily* (MFS) típusú pumpák széles körben előfordultak. Az *emrA* gén 111 esetben kromoszómálisan és 4 esetben MGE-hez kötött formában, az *emrB* gén 108 esetben kromoszómális és 4 esetben MGE előfordulással volt jelen, míg az *emrR* gén 112 esetben kromoszómális és 4 esetben MGE hordozással fordult elő. Az *mdtH* gén minden mintában azonosítható volt. A *Small Multidrug Resistance* (SMR) típusú efflux pumpákhoz köthető *qacH* gén egy kromoszómális és két plazmidos előfordulást mutatott (**7. ábra**).



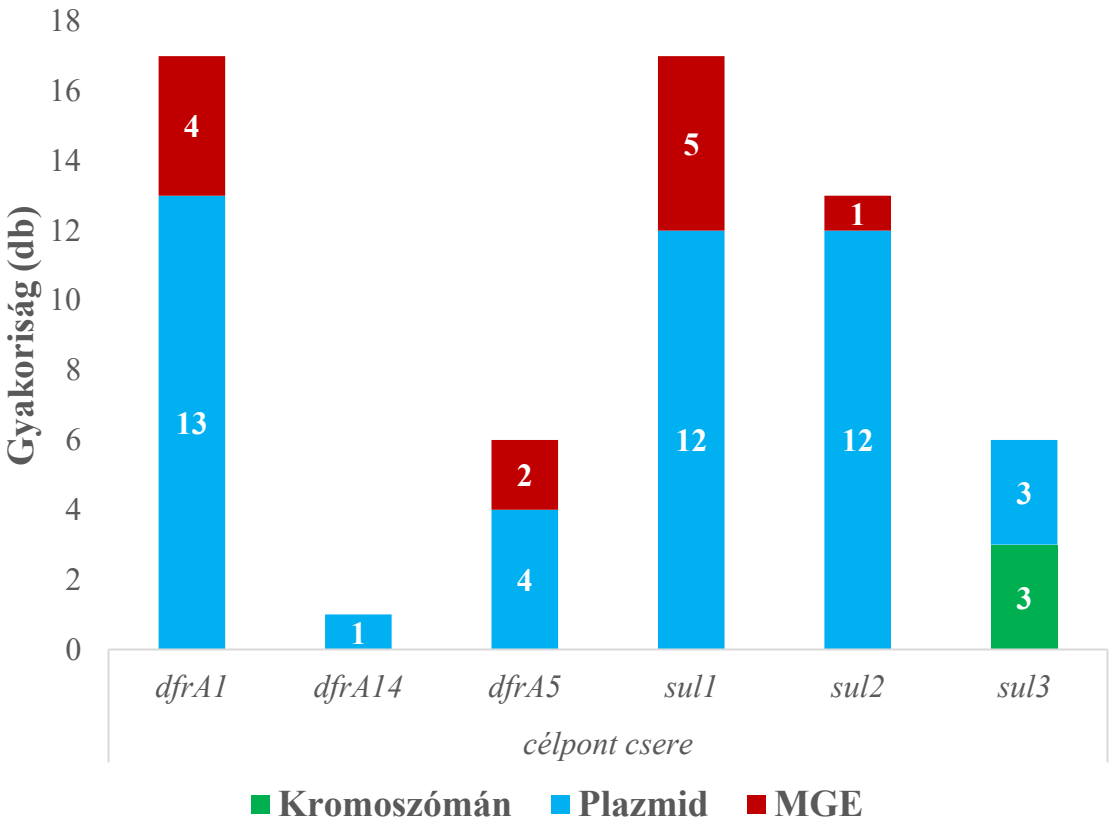

**7. ábra** A fenotípusosan leválogatott sertés eredetű *Escherichia coli* törzsekben (*n*=127), új generációs szekvenálását követően azonosított, kifejezetten fluorokinolon hatóanyagokkal szembeni rezisztencia kialakításáért felelős gének gyakorisága.

A peptid antibiotikumok esetén a célpontmódosításhoz köthető gének közül a *bacA* gén 110 esetben kromoszómán, továbbá egy esetben plazmidon és két esetben MGE-hez társultan fordult elő. Az *eptA* gén és a *pmrF* gén egyaránt 116 mintában, kizárólag kromoszómán volt kimutatható. Az *ugd* gén 78 esetben volt jelen kromoszómán, emellett egy plazmidos és három MGE-hez kapcsolt előfordulást azonosítottunk. A polimixinek (kolisztin) elleni, plazmidon terjedő rezisztenciát jelző *mcr-1* gént három mintában mutattuk ki, mindhárom esetben plazmidon. Az ABC-típusú efflux pumpához tartozó *yojI* gén 112 esetben kromoszómálisan jelent meg, továbbá egy MGE-hez való kapcsolódást is észleltünk (**8. ábra**).



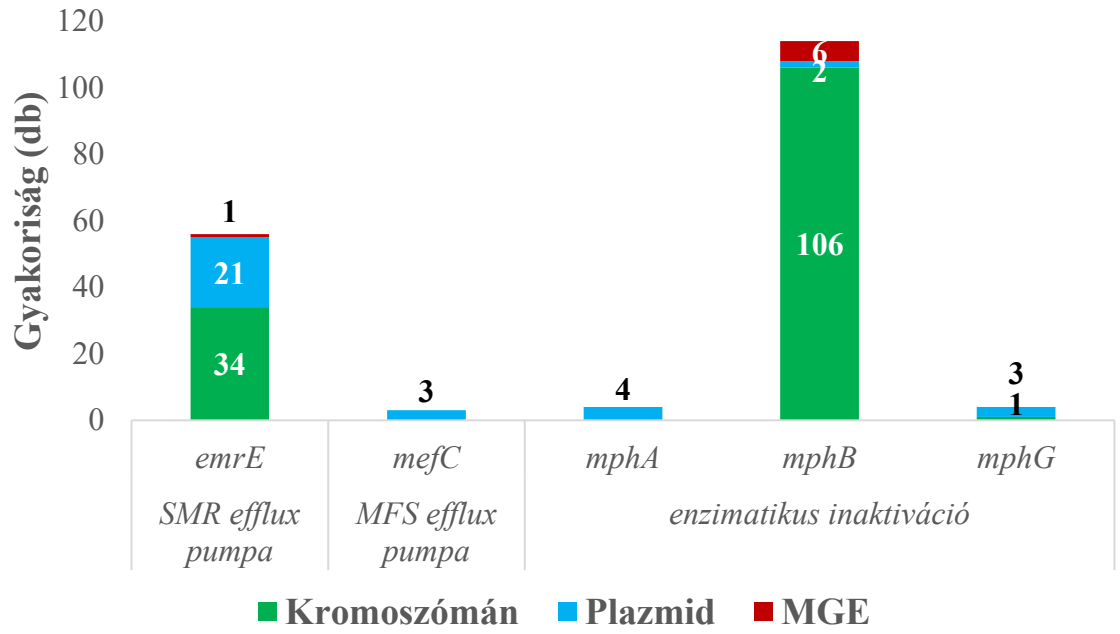

**8. ábra** A fenotípusosan leválogatott sertés eredetű *Escherichia coli* törzsekben (*n*=127), új generációs szekvenálását követően azonosított, kifejezetten peptid hatóanyagokkal szembeni rezisztencia kialakításáért felelős gének gyakorisága.

A trimetoprim rezisztenciához tartozó *dfrA* gének közül a *dfrA1* gén 13 esetben plazmidon és 4 esetben MGE-hez társultan fordult elő; a *dfrA14* gén egy esetben plazmidon volt azonosítható, míg a *dfrA5* gén négy plazmidos és két MGE-hez kötött előfordulást mutatott. A szulfonamid rezisztenciagének közül a *sul1* gént 12 plazmidos és öt MGE-hez kapcsolt, a *sul2* gént 12 plazmidos és egy MGE-hez kötött gyakorisággal mutattuk ki. A *sul3* gént jóval ritkábban, 3 esetben kromoszómálisan és 3 esetben plazmidhoz kötődve azonosítottuk (**9. ábra**).



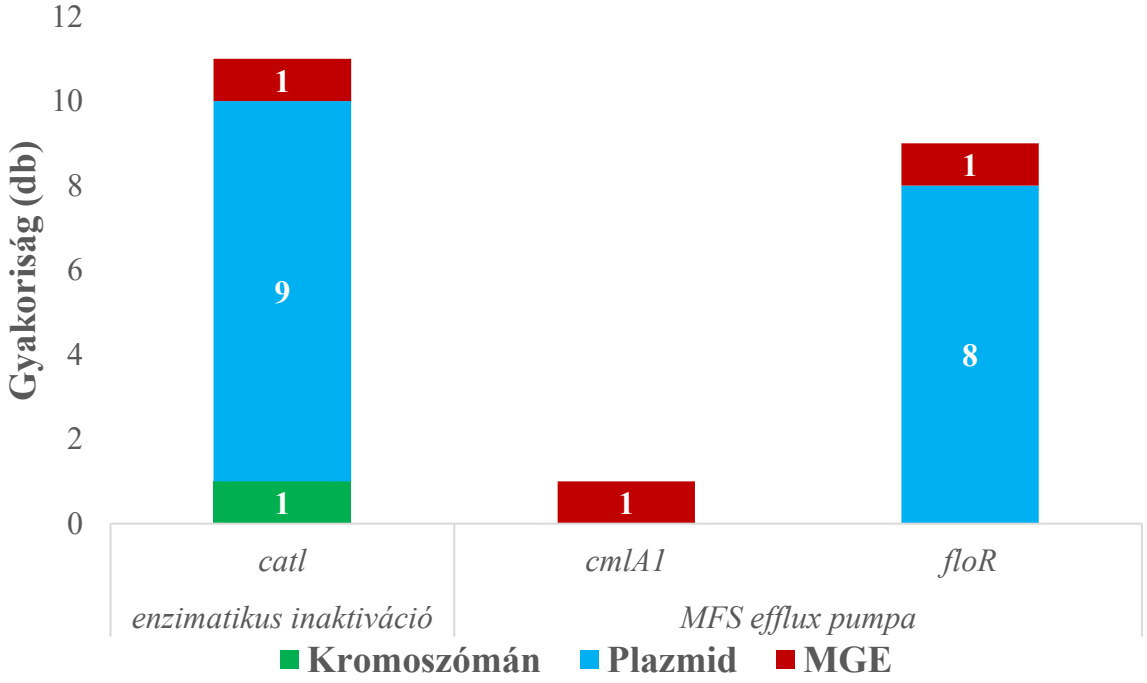

**9. ábra** A fenotípusosan leválogatott sertés eredetű *Escherichia coli* törzsek (*n*=127) új generációs szekvenálását követően azonosított, kifejezetten potenciált szulfonamid (diaminopirimidinek és szulfonamidok) hatóanyagokkal szembeni rezisztencia kialakításáért felelős gének gyakorisága.

A makrolid antibiotikumok tekintetében az *E. coli ab ovo* rezisztens, azonban különösen a plazmidon és MGE formájában jelen lévő gének esetén a horizontális géntranszfer veszélye miatt érdemes megvizsgálni ezt a génkészletet is. Az SMR-típusú efflux pumpacsaládba tartozó *emrE* gén 34 esetben kromoszómán, 21 esetben plazmidon és 1 esetben MGE-hez kötötten volt jelen. Az MFS-típusú efflux pumpához kapcsolt *mefC* gén három esetben plazmidon volt. Az enzimatikus inaktivációt kódoló gének közül a *mphA* gén négy, a *mphB* gén 106 esetben kromoszómán, utóbbi gén további két esetben plazmidon és 6 esetben MGE-hez társulva fordult elő, míg az *mphG* gén egy kromoszómális és három plazmidos előfordulással volt kimutatható (**10. ábra**).




**10. ábra** A fenotípusosan leválogatott sertés eredetű *Escherichia coli* törzsekben (*n*=127), új generációs szekvenálását követően azonosított, kifejezetten makrolid hatóanyagokkal szembeni rezisztencia kialakításáért felelős gének gyakorisága.

A fenikolok enzimatikus inaktivációjához köthető *catI* gén összesen 11 esetben volt kimutatható. Az MFS-típusú efflux pumpákhoz kapcsolódó *cmlA1* gén egyszer fordult elő, míg a *floR* gén 8 esetben plazmidon és 1 esetben MGE-hez kapcsoltan fordult elő (**11. ábra**).

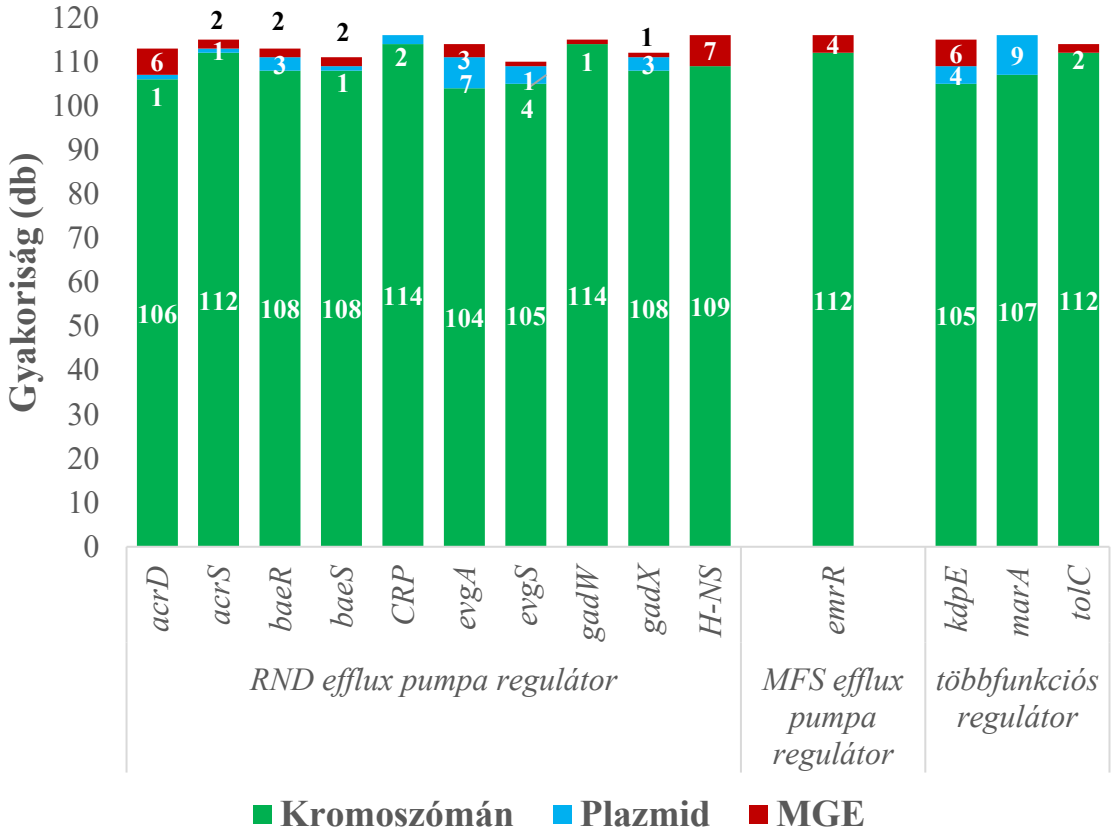



**11. ábra** A fenotípusosan leválogatott sertés eredetű *Escherichia coli* törzsekben (*n*=127), új generációs szekvenálását követően azonosított, kifejezetten fenikol hatóanyagokkal szembeni rezisztencia kialakításáért felelős gének gyakorisága.

A vizsgált törzsekben a regulátor gének széles köre volt azonosítható. Az RND-efflux pumpák szabályozói közül az *acrD* gén (106 kromoszómán, 1 plazmidon, 6 MGE), az *acrS* gén (112 kromoszómán, 1 plazmidon, 2 MGE), valamint a *baeR/baeS* és az *evgA/evgS* génpárok több esetben plazmidon és MGE-n is megjelentek.

Az általános regulátorok közül a *CRP*, a *gadW*, a *gadX* és a *H-NS* gének szinte minden izolátumban jelen voltak. Az MFS-efflux pumpa szabályozásához tartozó *emrR* gén 112 esetben kromoszómán és 4 esetben MGE-kapcsolt formában volt jelen.

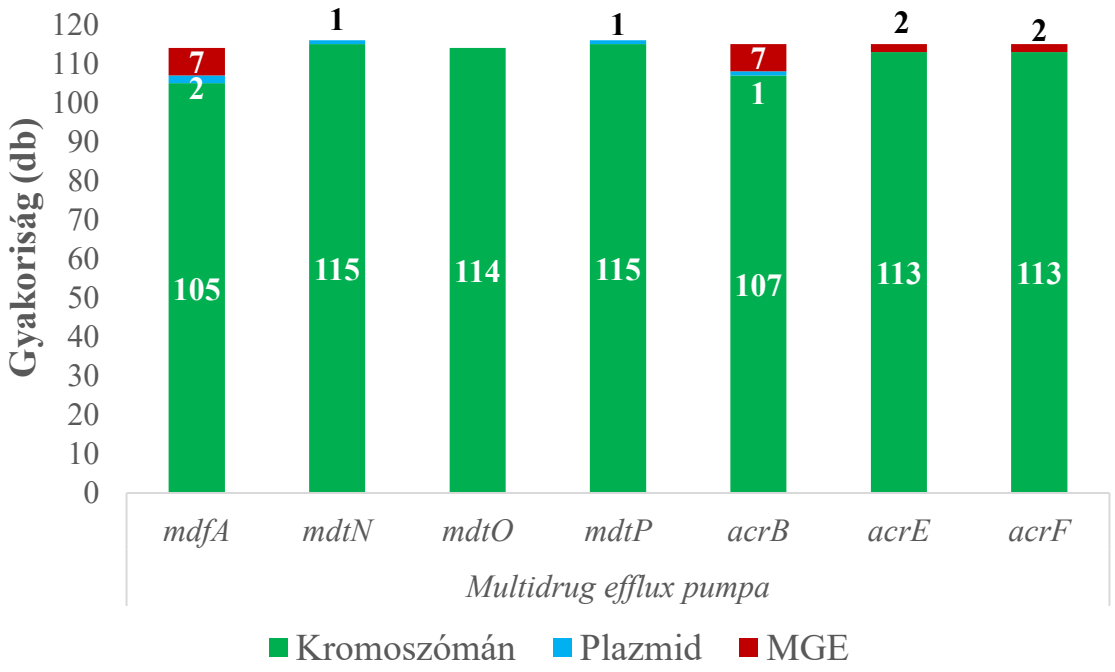
A többfunkciós regulátorok közül a *kdpE* gén (105 kromoszómán, 4 plazmidon, 6 MGE), a *marA* gén (107 kromoszómán, 9 plazmidon) és a *tolC* gén (112 kromoszómán, 2 MGE) is széles körben elterjedtnek bizonyultak (**12. ábra**).




**12. ábra** A fenotípusosan leválogatott sertés eredetű *Escherichia coli* törzsekben (*n*=127), új generációs szekvenálását követően azonosított regulátor gének gyakorisága.

A vizsgált *E. coli* izolátumokban a multidrug efflux pumpák széles köre volt azonosítható. Az MFS-típusú pumpák közül az *mdfA* gén 105 esetben kromoszómális, 2 esetben plazmidos és 7 esetben MGE-hez kötött formában fordult elő. Az *mdtN* gén és az *mdtP* gén egy-egy plazmidon volt azonosítható, míg az *mdtO* gén kizárólag kromoszómálisan volt jelen. Az RND-típusú pumpák közül az *acrB* gén 107 esetben

kromoszómálisan, 1 esetben plazmidon és 7 esetben MGE formájában jelent meg. Az *acrE* és az *acrF* gének 113 esetben kromoszómálisan és 2-2 esetben MGE-hez kapcsoltan voltak kimutathatóak (**13. ábra**).




**13. ábra** A fenotípusosan leválogatott sertés eredetű *Escherichia coli* törzsekben (*n*=127), új generációs szekvenálását követően azonosított, multidrug efflux pumpákat meghatározó gének gyakorisága.

# 6. KÖVETKEZTETÉSEK

A fenotípusos előszűrés során összesen 203 sertés eredetű *E. coli* törzset vizsgáltunk, amelyek 54%-a bizonyult feltételezhetően β-laktamáz termelőnek és 63%-a ESBL termelőnek. Egy európai átfogó vizsgálat kimutatta, hogy a hízó sertésekből illetve a sertéshúsból származó mintákban az ESBL-termelő *E. coli* előfordulása gyakran 30-50% körül mozog [103]. Egy svájci vizsgálat során pedig 50% körüli előfordulást állapítottak meg egy sertéstelepen [104]. Ezek az eredmények közel esnek az általunk megállapított 63%-os gyakorisághoz.

A fiatal életkorban detektált magas ESBL-termelési arány különösen figyelemre méltó napos korban, hiszen itt tapasztaltuk a legmagasabb arányt. Egy lettországi kutatás 4 hetes malacok esetén ugyanakkor 28,2%-os ESBL-előfordulást dokumentált, míg 6 hetes malacok esetén már 35,1%-os eredményt kaptak [105], ezzel szemben mi jóval alacsonyabb, a 4 hetes malacokban 16,7%-os, a 6 hetes malacokban 19,2%-os elődfordulást állapítottunk meg. Bár eredményeink szintén növekvő tendenciát mutattak a két korcsoport között. Hasonló eredményekről számoltak be egy holland kutatás során, ahol szopós malacokban volt a legmagasabb az ESBL-pozitív törzsek aránya, átlagosan 24,2%-kal [106], ami jó korrelációt mutat az általunk tapasztalt napos kori 26,6%-os előfordulással.

Ezek az eredmények összhangban állnak azzal, hogy a rezisztens baktériumokkal történő kolonizáció már a születést követően, nagyon korai életkorban megtörténik, valószínűsíthetően a kocák, a környezet vagy a takarmány útján. A 4 és 6 hetes korcsoportokban tapasztalt alacsonyabb ESBL-termelési arányok alátámasztják azt a hipotézist, miszerint a malacok növekedésével, az immunrendszer fejlődésével, illetve a mikrobiom diverzifikálódásával az ESBL-termelő törzsek kolonizációs aránya mérséklődik [105]. Ugyanakkor a 6 hetes korban észlelt viszonylag magas β-laktamáz aktivitás azt sugallja, hogy a nem-ESBL típusú β-laktamázokat termelő törzsek későbbi életkorban is fennmaradhatnak vagy újra kolonizálódhatnak. Ezek az eredmények rávilágítanak arra, hogy az antibiotikum-rezisztencia kialakulásának és fennmaradásának már a korai életfázisokban meghatározó szerepe van. Ennek megelőzése céljából a biobiztonsági intézkedések (kocák szűrése, istállóhigiénia, takarmány ellenőrzés stb.) elsődleges fontosságúak lehetnek. Emellett érdemes lehet jövőbeli vizsgálatokban figyelmet fordítani az anyai és környezeti minták párhuzamos elemzésére is, annak érdekében, hogy feltárhatók legyenek az ESBL-pozitív törzsek elsődleges forrásai.

Az eredményeink kiemelik az NGS jelentőségét a fenotípusosan ESBL-pozitív izolátumok pontos molekuláris hátterének feltárásában. Bár fenotípusosan 127 törzs mutatott ESBL-termelésre utaló rezisztenciát, amiből 116 törzset szekvenáltunk, valójában csak 50 esetben sikerült klasszikus ESBL-géneket (*CTX-M*, *TEM*) azonosítani. A többi, molekulárisan ESBL-negatív törzsben minden esetben jelen voltak az *ampC* illetve *ampH* gének, amelyek β-laktamáz túltermelése valószínűsíthetően magyarázhatja a fenotípusos pozitivitást. Ezt Roberts és mtsai. (2009) is igazolták ESBL felmérésen alapuló vizsgálatuk során [107]. Kawamura és mtsai. (2022) *E. coli* klinikai izolátumok esetén az *ampC* gén okozta β-laktamáz túltermelését igazolták, amely átfedést mutatott az ESBL-tesztek eredményével [108], ahogy Totté és mtsai. (2025) is kiemelik ennek a jelentőségét [109].

Vizsgálataink során a CTX-M-típusú gének a szekvenált törzsek 26%-ban fordultak elő, míg a TEM-típusú gének a minták 32%-ban voltak jelen. Spanyolországban egy 20 évet átfogó vizsgálat során a *CTX-M*-típusú gének előfordulását 13,5%-ban állapították meg [110]. Hongkongban sertéstelepekről befogott patkányok béltartalmából izolált *E. coli* törzsek 69%-a volt ESBL-termelő. A leggyakoribb gének a *CTX-M-14*, a *CTX-M-15*, a *CTX-M-55* és a *CTX-M-65* típusok voltak [111]. A *CTX-M-55* gént mi is kimutattuk 3,5%-os prevalenciával. A németországi vizsgálatok ehhez képest meglehetősen eltérő eredményeket mutattak, előfordult 100%-os [65] máskor 60%-os [112] illetve 43%-os előfordulás a *CTX-M*-típusra [113]. A prevalencia jelentős mértékű eltérésének oka az eltérő antibiotikum felhasználási szokásokra, illetve az eltérő metodikai módszerekre vezethető vissza, amely vizsgálatok nem csak térben, hanem időben is eltérő időszakokat öleltek fel.

Egy átfogó európai vizsgálat keretében sertéstelepekről gyűjtött mintákban az ESBL-termelő törzsek 45%-a tartalmazott ESBL géneket. A leggyakoribb géntípusok a *CTX-M-1* (57%), a *TEM-52* (21%) és a *CTX-M-14* (11%) géntípusok voltak. A vizsgálat kiterjedt a telepeken dolgozókra és családtagjaikra is, bár náluk alacsonyabb (6%) volt az ESBL-prevalencia, azonban megfigyelhető volt, hogy náluk is ugyanazok az ARG-k jelentek meg, mint az állatokban. Ez közvetett bizonyítékkal szolgál az ARG-k potenciális átvitelének lehetőségére [114]. Kutatásunk során a CTX-M-1 gént 3,4%-os prevalenciával mutattuk ki és minden esetben plazmidon azonosítottuk. Egy másik 2017–2018 közötti európai tanulmány a hízósertésekből izolált *E. coli* törzsek között 38%-os ESBL-prevalenciát mutatott ki. A vizsgált országok közül a legmagasabb értéket Spanyolországban regisztrálták (80,3%), amely egybevág azzal a ténnyel, hogy Spanyolország Európa legnagyobb sertéshústermelője. Magyarországon a vizsgálatunk során genetikai megerősítést követően

43,1%-os prevalenciát mutattunk ki. A leggyakoribb rezisztenciagének a *CTX-M-32*, a *CTX-M-55* és a TEM-1 voltak [115].

Egy dél-koreai vizsgálatban az összesített ESBL-prevalencia 14,4% volt, ezen belül a sertésmintákban 18,4%-ot, míg környezeti mintákban 20,6%-ot detektáltak. Minden ESBL-pozitív izolátumban *CTX-M* típusú gén volt kimutatható, főként a *CTX-M-55*, *CTX-M-14* és *CTX-M-15* típusokat azonosították [116]. Ezek közül a gének közül mi a CTX-M-55 gént azonosítottuk 2,5%-os prevalenciával. A legalacsonyabb ESBL-prevalenciát Mexikóban mutatták ki, ahol egy vizsgálat során az *E. coli* izolátumok 7,3%-a termelt ESBL-t, a leggyakrabban előforduló géncsoport itt is a *CTX-M* volt, 23,3%-os gyakorisággal [26], a mi vizsgálatunk során a *CTX-M* típusú géncsaládra 26,0%-os prevalenciát állapítottunk meg. Egy tájföldi vizsgálat szerint is a *CTX-M-55* gén fordult elő a leggyakrabban [117], egy másik tájföldi vizsgálatban viszont a *CTX-M-1* prevalenciája érte el a legmagasabb szintet [118], bár mi utóbbi gén esetén csupán 3,4%-os prevalenciát mutattunk ki. Ausztriában a leggyakoribb ESBL génként a *TEM-1* (56%) és *CTX-M-1* (13,7%) géneket azonosították [119], ehhez képest mi a *TEM-1* gént 32%-os, a *CTX-M-1* gént 3,4%-os prevalenciával figyeltük meg.

Az aminoglikozid-rezisztencia gének gyakori plazmidon és MGE-hez kötött előfordulása egybevág Trongjit és mtsai. (2021) kutatási eredményeivel, ahol ESBL-termelő *E. coli* sertés eredetű izolátumaiban ugyanazokat a géneket azonosították plazmidon és MGE-hez kötődve [120], mint mi. Egy kínai metagenomikai vizsgálat hozzánk hasonló módon a sertések bélrendszerében sok aminoglikozid-rezisztencia gén jelenlétét igazolta. Bár ezek nem mindig specifikus módon plazmidhoz kötődtek, de eredményük alátámasztja, hogy az aminoglikozid gének széles körben elterjedtek a sertéságazatban [121].

A *tet(A)* gén dominanciája és *a tet(B)* gén jelenléte a sertés eredetű *E. coli* izolátumokban összhangban áll több vizsgálattal. Korábban már sertés eredetű *E. coli* izolátumok esetében a tetraciklin-rezisztencia gének közül a leggyakrabban előforduló génként a *tet(A)* és *tet(B)* gént azonosították, döntően plazmidokon, ami elősegíti a horizontális terjedés lehetőségét [122]. Ezt támasztják alá azok az újabb, sertéstrágya vizsgálati eredmények, amelyben a *tet(A)* gén volt a leggyakrabban azonosított tetraciklin rezisztencia gén [123]. Több országot és állatfajt (köztük sertést) lefedő összehasonlító genomikai elemzés szintén azt találta, hogy a *tet(A)* a leggyakoribb tetraciklin-rezisztenciagén, míg a *tet(B)* változó gyakorisággal, de rendszeresen előfordul [124].

A fluorokinolon rezisztencia tekintetében a *qnrB5* gént két esetben plazmidon azonosítottuk, ami egybevág Yue és mtsai. (2008) eredményeivel, ahol a *qnrB* variánsokat szintén plazmidon mutatták ki sertés eredetű izolátumokban. Az ilyen gének viszonylag ritkán fordulnak elő [125]. A többi efflux pumpa gén (*emrA, emrB, emrR, mdtH*) nagy arányban való jelenléte kromoszómán alapvető, hiszen „*housekeeping*" jellegű védelmet adnak, amelyet az életkori vagy környezeti stresszhatások (takarmány, higiénia, antibiotikum-expozíció) indukálhatnak [126]. A plazmidon és MGE-n hordozott gének arra utalnak, hogy a horizontális géntranszfer lehetősége adott a telepeken, különösen, ha ezek a baktériumok antibiotikum-használat okozta szelekciós nyomásnak vannak kitéve. A fiatal malacok esetén még alakul a bélmikrobiom, és kevesebb a horizontális átadás lehetősége; de ahogy növekednek, és több expozíció éri őket, a mobilis rezisztencia-elemek gyakorisága is és a plazmidon hordozott gének aránya is emelkedhet.

A polimixin rezisztencia tekintetében a három *mcr-1* pozitív izolátum közvetlenül illeszkedik azokhoz a nemzetközi tapasztalatokhoz, miszerint a kolisztin rezisztencia sertésekben ritkább, de döntően plazmidon terjedő formában jelenik meg; a mechanizmust elsőként sertéseken és húsból származó *E. coli*-ban írták le Kínában (Liu és mtsai.) 2016-ban, ami mára globálisan széles körben elterjedt [127]. A széles körben jelen lévő *eptA*, *pmrF* és *ugd* gének kromoszómális dominanciája arra utal, hogy a kolisztinre adott rezisztenciaválasz többségében a lipid-A módosítási útvonalakon alapulhat, amelyeket a kétkomponensű rendszerek (PmrAB, PhoPQ) szabályoznak [128]. A *bacA* gén nagy arányú, főként kromoszómális jelenléte biológiailag várható volt, mivel a gén egy undekaprenil-pirofoszfát-foszfatázt határoz meg, amely a sejtfal lipid-hordozójának újra hasznosításában vesz részt; túlexpressziója klasszikusan bacitracin rezisztenciát okoz *E. coli*-ban, és a gén egyben „*housekeeping*" funkciót lát el a sejtfal-bioszintézisében [129].

A szulfonamid rezisztencia tekintetében a *sul1* és *sul2* gének dominanciája volt jellemző plazmidon, MGE-hez társulva fordultak elő, mely eredmények korábbi sertés-eredetű *E. coli* vizsgálatokkal nagy hasonlóságot mutattak [130]. A *sul3* gén jelenléte ritkább volt, de más sertésállományokra vonatkozó vizsgálati eredmények alapján előfordulása széleskörű a sertéspopulációkban [131]. A diaminopirimidin rezisztencia tekintetében a *dfrA1* gyakorisága és plazmidokhoz, MGE-hez kötött előfordulása összhangban áll azzal, hogy az egyik legjellemzőbb trimetoprim rezisztenciát okozó, gyakran integron-kazetták részeként előforduló gén [132]. Összességében ezek az eredmények erős horizontális géntranszfer lehetőségre utalnak, ami sertéstelepi környezetben az alkalmazott

antibiotikumok szelekciós nyomásával együtt hatékonyan fenntarthatja és terjesztheti ezeket a rezisztenciagéneket [133].

Az *E. coli* makrolidokkal szembeni *ab ovo* rezisztenciája főként a külső membrán alacsony permeabilitásából és az efflux pumpákból ered; ezt alátámasztja, hogy az efflux pumpa komponensek széles körben jelen voltak a mintákban [134]. Ki kell emelni a *mefA* és *mefE* gének jelenlétét, melyek jellemzően Gram-pozitív baktériumokban fordulnak elő, és csak szórványosan írták le Gram-negatív baktériumokban a jelenlétüket. Ezáltal, ebben az esetben potenciálisan mobilis rezisztencia-rezervoárként tekinthetünk ezekre az *E. coli* törzsekre [135].

A fenikolokkal szemben rezisztenciát kialakító gének közül a *catI* gén plazmidos túlsúlya megfelel annak a nemzetközi tapasztalatnak, hogy a klóramfenikol-acetiltranszferáz gének (*CAT*) a leggyakoribb fenikol-rezisztencia mechanizmusok közé tartoznak, és döntően MGE közvetítésével terjednek. Ezt igazoltja az a német kutatás, amelyben a *CAT* gének többsége plazmidon lokalizálódott [136]. A *floR* gén előfordulása különösen fontos, mivel ezt a gént elsősorban állatgyógyászati környezetben (florfenikol használata mellett) szokták azonosítani, és szintén plazmidon szokott elhelyezkedni. Egy vizsgálat eredményei szerint a malacok esetében alkalmazott florfenikol kezelés kiváltja a *floR* gént plazmidon hordozó törzsek szelekcióját [137].

A regulátor génprofil jól mutatja, hogy az *E. coli* rezisztencia háttere nemcsak az egyedi rezisztenciagénekhez kötődik, hanem egy szabályozó hálózatokhoz is. Az AcrAB-TolC rendszer szabályozása (*acrS, tolC, marA*) és a BaeSR/EvgAS kétkomponensű rendszerek egyaránt szerepet játszanak az efflux pumpák és a membrán-permeabilitás szabályozásában, amit több kísérletes tanulmány is alátámasztott *E. coli*-ban [138, 139].

Az MdfA efflux pumpa előfordulási gyakorisága megfelel annak, amit korábban is leírtak, miszerint ez az egyik leguniverzálisabb MFS-típusú transzporter *E. coli*-ban, és hozzájárul számos antibiotikum rezisztenciájához [140]. Az AcrAB-TolC rendszer (*acrB* gén kulcskomponens) a Gram-negatív baktériumok legfontosabb RND-típusú efflux pumpája, amelyről ismert, hogy nemcsak antibiotikumokat, hanem detergenseket és epesavakat is képes kipumpálni a baktériumból [141]. Az *acrE* és *acrF* gének jelenléte az *acrAB* paralógjainak tekinthető, amelyek a szakirodalom szerint redundáns szerepet játszanak, és hozzájárulhatnak a multidrug-rezisztencia fenntartásához [142].

A vizsgálataink alapján egyértelműen látszik, hogy a hazai sertésállományokból izolált *E. coli* törzsek széles rezisztenciagén-repertoárral rendelkeznek, amelyben egyszerre van jelen a klasszikus, plazmidhoz és mobilis genetikai elemekhez kötött horizontális terjedés, valamint a kromoszómális háttérhez kapcsolódó, alapvető sejtvédelmi mechanizmusok. Az enzimatikus inaktiváció, a célpontmódosítás, az efflux pumpák és a globális regulátor hálózatok mind hozzájárulnak ahhoz a komplex rezisztencia fenotípushoz, amely ezeknek a törzseknek a túlélését biztosítja. Az eredmények rávilágítanak arra, hogy a rezisztencia nem egyetlen gén vagy mechanizmus kérdése, hanem egy sokszereplős rendszer, ahol a különböző hatóanyagcsoportok elleni védekezés egymásra épül, és az állattartási környezetben fennálló szelekciós nyomás fenntartja, sőt erősíti is ezeket a mintázatokat.

Összességében megállapíthatjuk, hogy a sertésállományokban jelen lévő multirezisztens *E. coli* törzsek nem csupán állategészségügyi, hanem potenciálisan élelmiszerlánc- és közegészségügyi szempontból is figyelmet érdemelnek, különös tekintettel az ESBL termelésért felelős gének nagyarányú jelenléte és egyéb kritikusan fontos antibiotikumokkal szemben rezisztenciát kialakítani képes rezisztenciagének szerepe miatt. A dolgozat eredményei hozzájárulnak annak jobb megértéséhez, hogyan kapcsolódnak össze a genetikai rezisztencia-mechanizmusok, és hogyan alakítanak ki olyan stabil rezisztenciahálózatot a baktériumok, amelynek megelőzése és felszámolása komoly kihívást jelenthet a jövőben.

# 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az antimikrobiális rezisztencia (AMR) az köz- és állategészségügy egyik legsúlyosabb globális kihívása, amelynek kialakulásában az állattenyésztésben alkalmazott antibiotikumok jelentős szerepet játszanak. Az *Escherichia coli* kiemelt indikátor baktérium az AMR monitorozásában, mivel egyaránt képes kommenzalista és patogén baktériumként megjelenni és számos rezisztenciagént hordozhat, amelyeket nagyon gyakran képes horizontális géntranszfer útján átadni. A jelen vizsgálat célja az volt, hogy a hazai, nagy létszámú sertésállományokból izolált multirezisztens *E. coli* törzsek rezisztenciaprofilját feltárjuk, különös tekintettel a kiterjed spektrumú β-laktamáz (ESBL) termelésre.

Összesen 203 baktérium törzset vizsgáltunk fenotípusos módszerekkel, amelyek közül 110 db β-laktamáz-, illetve 127 db ESBL-termelőnek bizonyult. Az új generációs szekvenálást 116 izolátum esetén végeztük el, amely során 82 különböző rezisztenciagént azonosítottunk, összesen 5427 előfordulással. Az ESBL-termelésért felelős gének közül a *CTX-M* és *TEM* család tagjait sikerült kimutatnunk, míg a fenotípusosan pozitív, de genotípusosan ESBL-negatív törzsekben az *ampC* és *ampH* gének okozta β-laktamáz termelés magyarázta az eredményeinket.

Az egyéb rezisztencia-mechanizmusok közül meghatározó volt az aminoglikozid-modifikáló enzimek (*aadA, APH*), a tetraciklin-rezisztencia gének (*tet(A), tet(B)*) jelenléte, a fluorokinolonokkal szembeni célpontvédelem (*qnrB5*) és efflux pumpák, valamint a polimixinekkel szembeni kromoszómális (*pmrF, eptA, ugd*) és plazmid-mediált (*mcr-1*) mechanizmusok jelenléte. A trimetoprim-szulfametoxazol rezisztencia hátterében *dfrA1, dfrA5, sul1, sul2* géneket azonosítottunk, míg a makrolid és fenikol rezisztencia elsősorban mobilis *mphA, mphB, floR, catI* génekhez kapcsolódott. Az efflux pumpa gének és regulátor gének széles körű kromoszómális előfordulása a rezisztencia-alapmechanizmusok és a környezeti stresszválasz integrált szerepére utal.

Eredményeink alapján a hazai sertésállományokban jelen lévő multirezisztens *E. coli* baktérium populációk olyan komplex genetikai génkészletet hordoznak, amelyben a mobilis rezisztenciagének és a kromoszómális adaptív mechanizmusok egymást erősítve biztosítják a törzsek fennmaradását. Mindezek nemcsak állategészségügyi szempontból jelentenek kihívást, hanem zoonotikus kockázatot is hordoznak, kiemelve a folyamatos monitorozás és az antibiotikum-használat visszaszorításának fontosságát.

## 8. SUMMARY

Antimicrobial resistance (AMR) represents one of the most serious challenges to global public health, with the use of antibiotics in animal husbandry playing a significant role in its emergence. *Escherichia coli* is a key indicator bacterium in AMR monitoring, as it can act both as a pathogen and as a carrier and disseminator of multiple resistance genes. The aim of the present study was to characterize the resistance profiles of multidrug-resistant *E. coli* strains isolated from large-scale pig farms in Hungary, with particular emphasis on extended-spectrum β-lactamase (ESBL) production.

A total of 203 strains were tested phenotypically, of which 110 were β-lactamase producers and 127 were confirmed as ESBL producers. Next-generation sequencing (NGS) was successfully performed on 116 isolates, leading to the identification of 82 distinct resistance genes with a total of 5,427 occurrences. Among the ESBL-encoding genes, members of the *CTX-M* and *TEM* families were detected, while in phenotypically positive but genotypically ESBL-negative strains, β-lactamase production was likely explained by overexpression of *ampC* and *ampH* genes.

Other major resistance mechanisms included aminoglycoside-modifying enzymes (*aadA, APH*), tetracycline resistance genes (*tet(A), tet(B)*), fluoroquinolone target protection (*qnrB5*) and efflux pumps, as well as chromosomal (*pmrF, eptA, ugd*) and plasmid-mediated (*mcr-1*) resistance to polymyxins. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole was primarily associated with *dfrA1, dfrA5, sul1*, and *sul2* genes, whereas macrolide and phenicol resistance was mainly linked to mobile genes such as *mphA, mphB, floR*, and *catI*. The widespread chromosomal presence of efflux pump and regulatory genes highlights the integrated role of intrinsic resistance mechanisms and environmental stress responses.

Overall, our findings demonstrate that multidrug-resistant *E. coli* populations present in Hungarian pig herds carry a complex genetic network in which mobile resistance genes and chromosomal adaptive mechanisms act synergistically to ensure bacterial survival. This combination poses not only a challenge for veterinary medicine but also a potential zoonotic risk, underscoring the importance of continuous monitoring and the prudent reduction of antibiotic use.

# 9. IRODALOMJEGYZÉK


1. Patel SJ, Wellington M, Shah RM, Ferreira MJ (2020) Antibiotic Stewardship in Food-producing Animals: Challenges, Progress, and Opportunities. Clin Ther 42:1649–1658. https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2020.07.004
2. Silva A, Silva V, Pereira JE, Maltez L, Igrejas G, Valentão P, Falco V, Poeta P (2023) Antimicrobial Resistance and Clonal Lineages of Escherichia coli from Food-Producing Animals. Antibiotics (Basel) 12:1061. https://doi.org/10.3390/antibiotics12061061
3. Hammerum AM, Heuer OE (2009) Human Health Hazards from Antimicrobial-Resistant Escherichia coli of Animal Origin. Clinical Infectious Diseases 48:916–921. https://doi.org/10.1086/597292
4. Barlam TF, Cosgrove SE, Abbo LM, MacDougall C, Schuetz AN, Septimus EJ, Srinivasan A, Dellit TH, Falck-Ytter YT, Fishman NO, Hamilton CW, Jenkins TC, Lipsett PA, Malani PN, May LS, Moran GJ, Neuhauser MM, Newland JG, Ohl CA, Samore MH, Seo SK, Trivedi KK (2016) Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. Clin Infect Dis 62:e51-77. https://doi.org/10.1093/cid/ciw118
5. Bonvegna M, Tomassone L, Christensen H, Olsen JE (2022) Whole Genome Sequencing (WGS) Analysis of Virulence and AMR Genes in Extended-Spectrum β-Lactamase (ESBL)-Producing Escherichia coli from Animal and Environmental Samples in Four Italian Swine Farms. Antibiotics (Basel) 11:1774. https://doi.org/10.3390/antibiotics11121774
6. Antibiotikum-felhasználás 2022 - Nébih. https://portal.nebih.gov.hu/-/antibiotikum-felhasznalas-2022. Accessed 7 Apr 2025
7. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. Proc Natl Acad Sci U S A 112:5649–5654. https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112
8. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020
9. Lekagul A, Tangcharoensathien V, Yeung S (2019) Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. Vet Anim Sci 7:100058. https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100058
10. Aerts M, Battisti A, Hendriksen R, Kempf I, Teale C, Tenhagen B, Veldman K, Wasyl D, Guerra B, Liébana E, Thomas-López D, Belœil P (2019) Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food. EFSA J 17:e05709. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5709
11. You Y, Silbergeld EK (2014) Learning from agriculture: understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. Front Microbiol 5:284. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00284
12. Kerek Á, Török B, Laczkó L, Kardos G, Bányai K, Somogyi Z, Kaszab E, Bali K, Jerzsele Á (2023) In Vitro Microevolution and Co-Selection Assessment of Florfenicol Impact on Escherichia coli Resistance Development. Antibiotics (Basel) 12:1728. https://doi.org/10.3390/antibiotics12121728
13. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C (2021) Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. Pathogens 10:1310. https://doi.org/10.3390/pathogens10101310
14. Kerek Á, Németh V, Szabó Á, Papp M, Bányai K, Kardos G, Kaszab E, Bali K, Nagy Z, Süth M, Jerzsele Á (2024) Monitoring Changes in the Antimicrobial-Resistance Gene Set (ARG) of Raw Milk and Dairy Products in a Cattle Farm, from Production to Consumption. Vet Sci 11:265. https://doi.org/10.3390/vetsci11060265
15. Van Oort CM, Ferrell JB, Remington JM, Wshah S, Li J (2021) AMPGAN v2: Machine Learning Guided Design of Antimicrobial Peptides. J Chem Inf Model 61:2198–2207. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c01441
16. Kim J, Ahn J (2022) Emergence and spread of antibiotic-resistant foodborne pathogens from farm to table. Food Sci Biotechnol 31:1481–1499. https://doi.org/10.1007/s10068-022-01157-1
17. Thanner S, Drissner D, Walsh F (2016) Antimicrobial Resistance in Agriculture. mBio 7:e02227-15. https://doi.org/10.1128/mBio.02227-15
18. Ma L, Li B, Jiang X-T, Wang Y-L, Xia Y, Li A-D, Zhang T (2017) Catalogue of antibiotic resistome and host-tracking in drinking water deciphered by a large scale survey. Microbiome 5:154. https://doi.org/10.1186/s40168-017-0369-0
19. Levy SB, FitzGerald GB, Macone AB (1976) Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. Nature 260:40–42. https://doi.org/10.1038/260040a0

20. Founou LL, Founou RC, Essack SY (2016) Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. Front Microbiol 7:1881. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881
21. Leclerc QJ, Lindsay JA, Knight GM (2019) Mathematical modelling to study the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: current state of the field and recommendations. J R Soc Interface 16:20190260. https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0260
22. Vrancianu CO, Popa LI, Bleotu C, Chifiriuc MC (2020) Targeting Plasmids to Limit Acquisition and Transmission of Antimicrobial Resistance. Front Microbiol 11:761. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00761
23. Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K (2015) Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. Front Microbiol 6:242. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00242
24. Karimi Dehkordi M, Halaji M, Nouri S (2020) Prevalence of class 1 integron in Escherichia coli isolated from animal sources in Iran: a systematic review and meta-analysis. Trop Med Health 48:16. https://doi.org/10.1186/s41182-020-00202-1
25. Bush K, Bradford PA (2020) Epidemiology of β-Lactamase-Producing Pathogens. Clin Microbiol Rev 33:e00047-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19
26. Mandujano A, Cortés-Espinosa DV, Vásquez-Villanueva J, Guel P, Rivera G, Juárez-Rendón K, Cruz-Pulido WL, Aguilera-Arreola G, Guerrero A, Bocanegra-García V, Martínez-Vázquez AV (2023) Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Escherichia coli Isolated from Food-Producing Animals in Tamaulipas, Mexico. Antibiotics (Basel) 12:1010. https://doi.org/10.3390/antibiotics12061010
27. Guyomard-Rabenirina S, Reynaud Y, Pot M, Albina E, Couvin D, Ducat C, Gruel G, Ferdinand S, Legreneur P, Le Hello S, Malpote E, Sadikalay S, Talarmin A, Breurec S (2020) Antimicrobial Resistance in Wildlife in Guadeloupe (French West Indies): Distribution of a Single blaCTX–M–1/IncI1/ST3 Plasmid Among Humans and Wild Animals. Front Microbiol 11:1524. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01524
28. Poeta P, Radhouani H, Pinto L, Martinho A, Rego V, Rodrigues R, Gonçalves A, Rodrigues J, Estepa V, Torres C, Igrejas G (2009) Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Escherichia coli of different phylogenetic groups. J Basic Microbiol 49:584–588. https://doi.org/10.1002/jobm.200900066
29. Darwich L, Vidal A, Seminati C, Albamonte A, Casado A, López F, Molina-López RA, Migura-Garcia L (2019) High prevalence and diversity of extended-spectrum β-lactamase and emergence of OXA-48 producing Enterobacterales in wildlife in Catalonia. PLoS One 14:e0210686. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210686
30. Wang J, Ma Z-B, Zeng Z-L, Yang X-W, Huang Y, Liu J-H (2017) The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. Zool Res 38:55–80. https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2017.003
31. CDC (2024) About One Health. In: One Health. https://www.cdc.gov/one-health/about/index.html. Accessed 17 Jul 2024
32. Aidara-Kane A, Angulo FJ, Conly JM, Minato Y, Silbergeld EK, McEwen SA, Collignon PJ, WHO Guideline Development Group (2018) World Health Organization (WHO) guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. Antimicrob Resist Infect Control 7:7. https://doi.org/10.1186/s13756-017-0294-9
33. Hoelzer K, Bielke L, Blake DP, Cox E, Cutting SM, Devriendt B, Erlacher-Vindel E, Goossens E, Karaca K, Lemiere S, Metzner M, Raicek M, Collell Suriñach M, Wong NM, Gay C, Van Immerseel F (2018) Vaccines as alternatives to antibiotics for food producing animals. Part 1: challenges and needs. Vet Res 49:64. https://doi.org/10.1186/s13567-018-0560-8
34. Bak H, Rathkjen PH (2009) Reduced use of antimicrobials after vaccination of pigs against porcine proliferative enteropathy in a Danish SPF herd. Acta Vet Scand 51:1. https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-1
35. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT (2004) Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol 2:123–140. https://doi.org/10.1038/nrmicro818
36. Martinez-Medina M (2021) Special Issue: Pathogenic Escherichia coli: Infections and Therapies. Antibiotics (Basel) 10:112. https://doi.org/10.3390/antibiotics10020112
37. Russo TA, Johnson JR (2000) Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of Escherichia coli: ExPEC. The Journal of Infectious Diseases 181:1753–1754. https://doi.org/10.1086/315418

38. Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmiecik A, Frej-Madrzak M, Ksiazczyk M, Bugla-Ploskonska G, Choroszy-Krol I (2019) Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from different sources: recent reports. Gut Pathog 11:10. https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0
39. Nataro JP, Kaper JB (1998) Diarrheagenic Escherichia coli. Clin Microbiol Rev 11:142–201
40. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E (2000) Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. Appl Environ Microbiol 66:4555–4558
41. Köhler C-D, Dobrindt U (2011) What defines extraintestinal pathogenic Escherichia coli? Int J Med Microbiol 301:642–647. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.006
42. Lo Y, Zhang L, Foxman B, Zöllner S (2015) Whole-genome sequencing of uropathogenic Escherichia coli reveals long evolutionary history of diversity and virulence. Infect Genet Evol 34:244–250. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.06.023
43. Founou LL, Founou RC, Allam M, Ismail A, Essack SY (2022) Genome Analysis of ESBL-Producing Escherichia coli Isolated from Pigs. Pathogens 11:776. https://doi.org/10.3390/pathogens11070776
44. Terlizzi ME, Gribaudo G, Maffei ME (2017) UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. Front Microbiol 8:1566. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566
45. Desvaux M, Dalmasso G, Beyrouthy R, Barnich N, Delmas J, Bonnet R (2020) Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal Escherichia coli. Frontiers in Microbiology 11:. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065
46. Nielubowicz GR, Mobley HLT (2010) Host-pathogen interactions in urinary tract infection. Nat Rev Urol 7:430–441. https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.101
47. Owrangi B, Masters N, Kuballa A, O'Dea C, Vollmerhausen TL, Katouli M (2018) Invasion and translocation of uropathogenic Escherichia coli isolated from urosepsis and patients with community-acquired urinary tract infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 37:833–839. https://doi.org/10.1007/s10096-017-3176-4
48. Mora A, López C, Herrera A, Viso S, Mamani R, Dhabi G, Alonso MP, Blanco M, Blanco JE, Blanco J (2012) Emerging avian pathogenic Escherichia coli strains belonging to clonal groups O111:H4-D-ST2085 and O111:H4-D-ST117 with high virulence-gene content and zoonotic potential. Vet Microbiol 156:347–352. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.033
49. Turner SM, Chaudhuri RR, Jiang Z-D, DuPont H, Gyles C, Penn CW, Pallen MJ, Henderson IR (2006) Phylogenetic comparisons reveal multiple acquisitions of the toxin genes by enterotoxigenic Escherichia coli strains of different evolutionary lineages. J Clin Microbiol 44:4528–4536. https://doi.org/10.1128/JCM.01474-06
50. Jobling MG, Holmes RK (2006) Heat-Labile Enterotoxins. EcoSal Plus 2:. https://doi.org/10.1128/ecosalplus.8.7.5
51. Vaandrager AB (2002) Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C. Mol Cell Biochem 230:73–83
52. Higgins LM, Frankel G, Connerton I, Gonçalves NS, Dougan G, MacDonald TT (1999) Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. Science 285:588–591. https://doi.org/10.1126/science.285.5427.588
53. Melton-Celsa AR (2014) Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. Microbiol Spectr 2:10.1128/microbiolspec.EHEC-0024–2013. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013
54. Vial PA, Robins-Browne R, Lior H, Prado V, Kaper JB, Nataro JP, Maneval D, Elsayed A, Levine MM (1988) Characterization of enteroadherent-aggregative Escherichia coli, a putative agent of diarrheal disease. J Infect Dis 158:70–79. https://doi.org/10.1093/infdis/158.1.70
55. Reygaert WC (2018) An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS Microbiol 4:482–501. https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482
56. Davies J, Davies D (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiol Mol Biol Rev 74:417–433. https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10
57. Massova I, Mobashery S (1998) Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding Proteins and β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother 42:1–17
58. Bush K, Jacoby GA (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 54:969–976. https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09

59. Kumar A, Schweizer HP (2005) Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. Adv Drug Deliv Rev 57:1486–1513. https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.004

60. Li X-Z, Nikaido H (2009) Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update. Drugs 69:1555–1623. https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000

61. Piddock LJV (2006) Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. Clin Microbiol Rev 19:382–402. https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006

62. Tanabe M, Szakonyi G, Brown KA, Henderson PJF, Nield J, Byrne B (2009) The multidrug resistance efflux complex, EmrAB from Escherichia coli forms a dimer in vitro. Biochem Biophys Res Commun 380:338–342. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.081

63. Paterson DL, Bonomo RA (2005) Extended-Spectrum β-Lactamases: a Clinical Update. Clin Microbiol Rev 18:657–686. https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005

64. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S (1983) Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. Infection 11:315–317. https://doi.org/10.1007/BF01641355

65. Meissner K, Sauter-Louis C, Heiden SE, Schaufler K, Tomaso H, Conraths FJ, Homeier-Bachmann T (2022) Extended-Spectrum ß-Lactamase-Producing Escherichia coli in Conventional and Organic Pig Fattening Farms. Microorganisms 10:603. https://doi.org/10.3390/microorganisms10030603

66. Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH (2012) Extended-spectrum β-lactamase-producing and AmpC-producing Escherichia coli from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. Clinical Microbiology and Infection 18:646–655. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03850.x

67. García-Cobos S, Köck R, Mellmann A, Frenzel J, Friedrich AW, Rossen JWA (2015) Molecular Typing of Enterobacteriaceae from Pig Holdings in North-Western Germany Reveals Extended- Spectrum and AmpC β-Lactamases Producing but no Carbapenem Resistant Ones. PLoS One 10:e0134533. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134533

68. Athanasakopoulou Z, Reinicke M, Diezel C, Sofia M, Chatzopoulos DC, Braun SD, Reissig A, Spyrou V, Monecke S, Ehricht R, Tsilipounidaki K, Giannakopoulos A, Petinaki E, Billinis C (2021) Antimicrobial Resistance Genes in ESBL-Producing Escherichia coli Isolates from Animals in Greece. Antibiotics (Basel) 10:389. https://doi.org/10.3390/antibiotics10040389

69. Pungpian C, Angkititrakul S, Chuanchuen R (2022) Genomic characterization of antimicrobial resistance in mcr-carrying ESBL-producing Escherichia coli from pigs and humans. Microbiology 168:001204. https://doi.org/10.1099/mic.0.001204

70. Bradford PA (2001) Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clin Microbiol Rev 14:933–951. https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001

71. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 39:1211–1233. https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211

72. ur Rahman S, Ali T, Ali I, Khan NA, Han B, Gao J (2018) The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. Biomed Res Int 2018:9519718. https://doi.org/10.1155/2018/9519718

73. Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP (2015) Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. Pathology 47:199–210. https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000235

74. Staden R (1979) A strategy of DNA sequencing employing computer programs. Nucleic Acids Res 6:2601–2610. https://doi.org/10.1093/nar/6.7.2601

75. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. Science 269:496–512. https://doi.org/10.1126/science.7542800

76. Metzker ML (2010) Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet 11:31–46. https://doi.org/10.1038/nrg2626

77. Mardis ER (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. Trends Genet 24:133–141. https://doi.org/10.1016/j.tig.2007.12.007

78. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M (2012) Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. J Biomed Biotechnol 2012:251364. https://doi.org/10.1155/2012/251364

79. Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, Biagtan M, Bashir H, Yu G, Salamat SM, Somasekar S, Federman S, Miller S, Sokolic R, Garabedian E, Candotti F, Buckley RH, Reed KD, Meyer TL, Seroogy CM, Galloway R, Henderson SL, Gern JE, DeRisi JL, Chiu CY (2014) Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing. N Engl J Med 370:2408–2417. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1401268

80. Knobloch JK-M, Niemann S, Kohl TA, Lindner U, Nitschke M, Sayk F, Solbach W (2014) Whole-genome sequencing for risk assessment of long-term Shiga toxin-producing Escherichia coli. Emerg Infect Dis 20:732–733. https://doi.org/10.3201/eid2004.131782

81. Stoesser N, Batty EM, Eyre DW, Morgan M, Wyllie DH, Del Ojo Elias C, Johnson JR, Walker AS, Peto TEA, Crook DW (2013) Predicting antimicrobial susceptibilities for Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates using whole genomic sequence data. J Antimicrob Chemother 68:2234–2244. https://doi.org/10.1093/jac/dkt180

82. Gordon NC, Price JR, Cole K, Everitt R, Morgan M, Finney J, Kearns AM, Pichon B, Young B, Wilson DJ, Llewelyn MJ, Paul J, Peto TEA, Crook DW, Walker AS, Golubchik T (2014) Prediction of Staphylococcus aureus Antimicrobial Resistance by Whole-Genome Sequencing. J Clin Microbiol 52:1182–1191. https://doi.org/10.1128/JCM.03117-13

83. Clinical and Laboratory Standards Institute (2018) CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 11. th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

84. Muzzey D, Evans EA, Lieber C (2015) Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. Curr Genet Med Rep 3:158–165. https://doi.org/10.1007/s40142-015-0076-8

85. Mihály Z, Győrffy B (2011) Következő generációs szekvenálási technológiák kifejlődése és alkalmazásai = Next generation sequencing technologies (NGST) development and applications. Orvosi Hetilap 152:55–62

86. Andrews S (2012) FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/. Accessed 25 Apr 2022

87. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics 34:i884–i890. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560

88. Benoit G, Lavenier D, Lemaitre C, Rizk G (2014) Bloocoo, a memory efficient read corrector

89. Krueger F (2022) Trim Galore

90. Dinghua MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph | Bioinformatics | Oxford Academic. https://academic.oup.com/bioinformatics/article/31/10/1674/177884. Accessed 25 Apr 2022

91. Vasilinetc I, Prjibelski AD, Gurevich A, Korobeynikov A, Pevzner PA (2015) Assembling short reads from jumping libraries with large insert sizes. Bioinformatics 31:3262–3268. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv337

92. Vicedomini R, Vezzi F, Scalabrin S, Arvestad L, Policriti A (2013) GAM-NGS: genomic assemblies merger for next generation sequencing. BMC Bioinformatics 14 Suppl 7:S6. https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-S7-S6

93. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G (2013) QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics 29:1072–1075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086

94. Manni M, Berkeley MR, Seppey M, Simao FA, Zdobnov EM (2021) BUSCO update: novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes

95. Vurture GW, Sedlazeck FJ, Nattestad M, Underwood CJ, Fang H, Gurtowski J, Schatz MC (2017) GenomeScope: fast reference-free genome profiling from short reads. Bioinformatics 33:2202–2204. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx153

96. Hyatt D, Chen G-L, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. BMC Bioinformatics 11:119. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119

97. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, Tyson GH, Zhao S, Hsu C-H, McDermott PF, Tadesse DA, Morales C, Simmons M, Tillman G, Wasilenko J, Folster JP, Klimke W (2019) Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. Antimicrob Agents Chemother 63:e00483-19. https://doi.org/10.1128/AAC.00483-19

98. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen A-LV, Cheng AA, Liu S, Min SY, Miroshnichenko A, Tran H-K, Werfalli RE, Nasir JA, Oloni M, Speicher DJ, Florescu A, Singh B, Faltyn M, Hernandez-Koutoucheva A, Sharma AN, Bordeleau E, Pawlowski AC, Zubyk HL, Dooley D, Griffiths E, Maguire F, Winsor GL, Beiko RG, Brinkman FSL, Hsiao WWL, Domselaar GV, McArthur AG (2020) CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. Nucleic Acids Res 48:D517–D525. https://doi.org/10.1093/nar/gkz935

99. Johansson MHK, Bortolaia V, Tansirichaiya S, Aarestrup FM, Roberts AP, Petersen TN (2021) Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in Salmonella enterica using a newly developed web tool: MobileElementFinder. J Antimicrob Chemother 76:101–109. https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390

100. Krawczyk PS, Lipinski L, Dziembowski A (2018) PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. Nucleic Acids Res 46:e35. https://doi.org/10.1093/nar/gkx1321

101. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. Genome Res 25:1043–1055. https://doi.org/10.1101/gr.186072.114

102. Wood DE, Salzberg SL (2014) Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. Genome Biology 15:R46. https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46

103. Bergšpica I, Kaprou G, Alexa EA, Prieto M, Alvarez-Ordóñez A (2020) Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) Producing Escherichia coli in Pigs and Pork Meat in the European Union. Antibiotics (Basel) 9:678. https://doi.org/10.3390/antibiotics9100678

104. Fournier C, Nordmann P, Pittet O, Poirel L (2021) Does an Antibiotic Stewardship Applied in a Pig Farm Lead to Low ESBL Prevalence? Antibiotics 10:574. https://doi.org/10.3390/antibiotics10050574

105. Gāliņa D, Balins A, Valdovska A (2021) The Prevalence and Characterization of Fecal Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli Isolated from Pigs on Farms of Different Sizes in Latvia. Antibiotics (Basel) 10:1099. https://doi.org/10.3390/antibiotics10091099

106. Dohmen W, Dorado-García A, Bonten MJM, Wagenaar JA, Mevius D, Heederik DJJ (2017) Risk factors for ESBL-producing Escherichia coli on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. PLOS ONE 12:e0174094. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174094

107. Robberts FJL, Kohner PC, Patel R (2009) Unreliable Extended-Spectrum β-Lactamase Detection in the Presence of Plasmid-Mediated AmpC in Escherichia coli Clinical Isolates. Journal of Clinical Microbiology 47:358–361. https://doi.org/10.1128/jcm.01687-08

108. Kawamura M, Ito R, Tamura Y, Takahashi M, Umenai M, Chiba Y, Sato T, Fujimura S (2022) Overproduction of Chromosomal ampC β-Lactamase Gene Maintains Resistance to Cefazolin in Escherichia coli Isolates. Microbiol Spectr 10:e0005822. https://doi.org/10.1128/spectrum.00058-22

109. Totté JE, Quiblier C, Nolte O, Hinic V, Wunderink HF, Egli A, Mancini S (2025) Phenotypic susceptibility profiles of AmpC- and/or extended-spectrum beta-lactamase-(co)producing Escherichia coli strains. JAC Antimicrob Resist 7:dlaf091. https://doi.org/10.1093/jacamr/dlaf091

110. Aguirre L, Vidal A, Seminati C, Tello M, Redondo N, Darwich L, Martín M (2020) Antimicrobial resistance profile and prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), AmpC beta-lactamases and colistin resistance (mcr) genes in Escherichia coli from swine between 1999 and 2018. Porcine Health Manag 6:8. https://doi.org/10.1186/s40813-020-00146-2

111. Uea-Anuwong T, Biggel M, Cernela N, Hung WW, Lugsomya K, Kiu LH, Gröhn YT, Boss S, Stephan R, Nüesch-Inderbinen M, Magouras I (2024) Antimicrobial resistance and phylogenetic relatedness of extended-spectrum ß-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli in peridomestic rats (Rattus norvegicus and Rattus tanezumi) linked to city areas and animal farms in Hong Kong. Environ Res 251:118623. https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118623

112. Dahms C, Hübner N-O, Kossow A, Mellmann A, Dittmann K, Kramer A (2015) Occurrence of ESBL-Producing Escherichia coli in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. PLoS One 10:e0143326. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143326

113. Friese A, Schulz J, Laube H, von Salviati C, Hartung J, Roesler U (2013) Faecal occurrence and emissions of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus (laMRSA) and ESbl/AmpC-producing E. coli from animal farms in Germany. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 126:175–180

114. Dohmen W, Bonten MJM, Bos MEH, Marm S van, Scharringa J, Wagenaar JA, Heederik DJJ (2015) Carriage of extended-spectrum β-lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs. Clinical Microbiology and Infection 21:917–923. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.032

115. (2020) The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. EFSA J 18:e06007. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6007

116. Kim YA, Kim H, Seo YH, Park GE, Lee H, Lee K (2021) Prevalence and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum-β-Lactamase (ESBL)-Producing Escherichia coli From Multiple Sectors of the Swine Industry in Korea: A Korean Nationwide Monitoring Program for a One Health Approach to Combat Antimicrobial Resistance. Ann Lab Med 41:285–292. https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.3.285

117. Trongjit S, Chuanchuen R (2021) Whole genome sequencing and characteristics of Escherichia coli with co-existence of ESBL and mcr genes from pigs. PLoS One 16:e0260011. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260011

118. Changkaew K, Intarapuk A, Utrarachkij F, Nakajima C, Suthienkul O, Suzuki Y (2015) Antimicrobial Resistance, Extended-Spectrum β-Lactamase Productivity, and Class 1 Integrons in Escherichia coli from Healthy Swine. J Food Prot 78:1442–1450. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-445

119. Bernreiter-Hofer T, Schwarz L, Müller E, Cabal-Rosel A, Korus M, Misic D, Frankenfeld K, Abraham K, Grünzweil O, Weiss A, Feßler AT, Allerberger F, Schwarz S, Szostak MP, Ruppitsch W, Ladinig A, Spergser J, Braun SD, Monecke S, Ehricht R, Loncaric I (2021) The Pheno- and Genotypic Characterization of Porcine Escherichia coli Isolates. Microorganisms 9:1676. https://doi.org/10.3390/microorganisms9081676

120. Trongjit S, Chuanchuen R (2021) Whole genome sequencing and characteristics of Escherichia coli with co-existence of ESBL and mcr genes from pigs. PLoS One 16:e0260011. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260011

121. Zhou Y, Fu H, Yang H, Wu J, Chen Z, Jiang H, Liu M, Liu Q, Huang L, Gao J, Chen C (2022) Extensive metagenomic analysis of the porcine gut resistome to identify indicators reflecting antimicrobial resistance. Microbiome 10:39. https://doi.org/10.1186/s40168-022-01241-y

122. Bryan A, Shapir N, Sadowsky MJ (2004) Frequency and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in Genetically Diverse, Nonselected, and Nonclinical Escherichia coli Strains Isolated from Diverse Human and Animal Sources. Appl Environ Microbiol 70:2503–2507. https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2503-2507.2004

123. Urumova V, Stefanova R, Dobreva D (2025) Investigation on antimicrobial resistance rates in commensal Escherichia coli isolates from broilers originating from Bulgaria (2020-2024). Archives of Veterinary Medicine 18:145–159. https://doi.org/10.46784/e-avm.v18i1.461

124. Kaspersen HP, Brouwer MS, Nunez-Garcia J, Cárdenas-Rey I, AbuOun M, Duggett N, Ellaby N, Delgado-Blas J, Hammerl JA, Getino M, Serna C, Naas T, Veldman KT, Bossers A, Sunde M, Mo SS, Jørgensen SB, Ellington M, Gonzalez-Zorn B, La Ragione R, Glaser P, Anjum MF (2024) Escherichia coli from six European countries reveals differences in profile and distribution of critical antimicrobial resistance determinants within One Health compartments, 2013 to 2020. Euro Surveill 29:2400295. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.47.2400295

125. Yue L, Jiang H-X, Liao X-P, Liu J-H, Li S-J, Chen X-Y, Chen C-X, Lü D-H, Liu Y-H (2008) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli*. Veterinary Microbiology 132:414–420. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.05.009

126. Pasqua M, Grossi M, Scinicariello S, Aussel L, Barras F, Colonna B, Prosseda G (2019) The MFS efflux pump EmrKY contributes to the survival of Shigella within macrophages. Sci Rep 9:2906. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39749-3

127. 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

128. Aghapour Z, Gholizadeh P, Ganbarov K, Bialvaei AZ, Mahmood SS, Tanomand A, Yousefi M, Asgharzadeh M, Yousefi B, Kafil HS (2019) Molecular mechanisms related to colistin resistance in Enterobacteriaceae. Infect Drug Resist 12:965–975. https://doi.org/10.2147/IDR.S199844

129. El Ghachi M, Derbise A, Bouhss A, Mengin-Lecreulx D (2005) Identification of multiple genes encoding membrane proteins with undecaprenyl pyrophosphate phosphatase (UppP) activity in Escherichia coli. J Biol Chem 280:18689–18695. https://doi.org/10.1074/jbc.M412277200
130. Wu S, Dalsgaard A, Hammerum AM, Porsbo LJ, Jensen LB (2010) Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among Escherichia coli from pigs, pig carcasses and human. Acta Vet Scand 52:47. https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-47
131. Byrne-Bailey KG, Gaze WH, Kay P, Boxall ABA, Hawkey PM, Wellington EMH (2009) Prevalence of Sulfonamide Resistance Genes in Bacterial Isolates from Manured Agricultural Soils and Pig Slurry in the United Kingdom. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 53:696–702. https://doi.org/10.1128/aac.00652-07
132. Mazurek J, Bok E, Stosik M, Baldy-Chudzik K (2015) Antimicrobial Resistance in Commensal Escherichia coli from Pigs during Metaphylactic Trimethoprim and Sulfamethoxazole Treatment and in the Post-Exposure Period. International Journal of Environmental Research and Public Health 12:2150–2163. https://doi.org/10.3390/ijerph120202150
133. Sunde M (2005) Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in Escherichia coli isolated from meat and meat products of Norwegian origin. J Antimicrob Chemother 56:1019–1024. https://doi.org/10.1093/jac/dki377
134. Delcour AH (2009) Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. Biochim Biophys Acta 1794:808–816. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005
135. Iannelli F, Santoro F, Santagati M, Docquier J-D, Lazzeri E, Pastore G, Cassone M, Oggioni MR, Rossolini GM, Stefani S, Pozzi G (2018) Type M Resistance to Macrolides Is Due to a Two-Gene Efflux Transport System of the ATP-Binding Cassette (ABC) Superfamily. Front Microbiol 9:. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01670
136. Blickwede M, Schwarz S (2004) Molecular analysis of florfenicol-resistant Escherichia coli isolates from pigs. J Antimicrob Chemother 53:58–64. https://doi.org/10.1093/jac/dkh007
137. Holman DB, Gzyl KE, Kommadath A (2024) Florfenicol administration in piglets co-selects for multiple antimicrobial resistance genes. mSystems 9:e0125024. https://doi.org/10.1128/msystems.01250-24
138. Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H (2015) The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. Clin Microbiol Rev 28:337–418. https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14
139. Pasqua M, Grossi M, Scinicariello S, Aussel L, Barras F, Colonna B, Prosseda G (2019) The MFS efflux pump EmrKY contributes to the survival of Shigella within macrophages. Sci Rep 9:2906. https://doi.org/10.1038/s41598-019-39749-3
140. Edgar R, Bibi E (1997) MdfA, an Escherichia coli multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. J Bacteriol 179:2274–2280. https://doi.org/10.1128/jb.179.7.2274-2280.1997
141. Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H (2015) The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. Clin Microbiol Rev 28:337–418. https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14
142. Lau SY, Zgurskaya HI (2005) Cell division defects in Escherichia coli deficient in the multidrug efflux transporter AcrEF-TolC. J Bacteriol 187:7815–7825. https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7815-7825.2005

## 10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném tisztelettel kifejezni hálámat témavezetőmnek, Dr. Kerek Ádámnak, rendkívüli segítőkészségéért és példamutató szakmai támogatásáért. Külön hálás vagyok azért, hogy kérdéseimre gyakran még aznap választ kaptam, valamint a pontos, korrekt útmutatásért, amely nélkül a dolgozat elkészítése távol sem lett volna ilyen zökkenőmentes. Nagy biztonságot nyújtott számomra az a következetesség és precizitás, amellyel a munkát végig kísérte, és nem utolsósorban azt is köszönöm, hogy felajánlotta és támogatásával lehetővé tette e fontos és izgalmas téma kidolgozását.

Köszönet illeti az egész Gyógyszertani és Méregtani Tanszéket a dolgozat elkészítéséhez nyújtott alapvető gyógyszertani tudás színvonalas és precíz átadásáért, amely megalapozta a kutatási munka szakmai hátterét. Hálás vagyok továbbá a labor munkatársainak, különösen azoknak, akik a mintáimat szekvenálták és technikai támogatást nyújtottak, nélkülük a vizsgálati eredmények nem jöhettek volna létre.

Végül szeretném kifejezni mély hálámat szüleimnek az anyagi támogatásért, folyamatos bátorításukért és építő jellegű tanácsaikért, amely nyugodt munkavégzést tett lehetővé, valamint minden barátomnak és hozzátartozómnak, akik bátorításukkal hozzájárultak a dolgozat elkészítéséhez.

# Témavezetői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Kerek Ádám**, mint témavezető nyilatkozom, hogy **Nagyházi Balázs, ötödik** évfolyamos hallgató „**Hazai nagylétszámú sertésállományokból izolált, multirezisztens *Escherichia coli* törzsek kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) termelésének vizsgálata új generációs szekvenálással**” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2025. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött TDK dolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2025. október hó 01. nap.

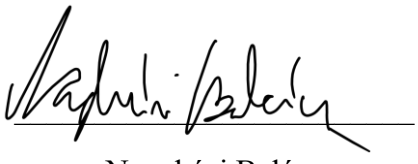
.....

Dr. Kerek Ádám
témavezető

# Hallgatói nyilatkozat

Alulírott, **Nagyházi Balázs** nyilatkozom arról, hogy a tudományos munkám során az alábbi feladatokat végeztem el, mint saját munka: szakirodalmi áttekintés, aktív részvétel az izolált baktérium törzsek fenotípusos érzékenység vizsgálatában, továbbá a leszűrt baktérium törzsek DNS-ének kivonásában. Ezt követően az eredmények kiértékelésében, azok értelmezésébe való bekapcsolódás és kimutatások készítése.

Kelt: Budapest, 2025. október 01.



Nagyházi Balázs
hallgató