

Állatorvostudományi Egyetem

Patológiai Tanszék

Malacokból izolált *Escherichia coli* törzsek
virulenciagénjeinek és fenotípusos
antibiotikum érzékenységének passzív
surveillance adatokon alapuló vizsgálata

Szentgyörgyi Virág

Témavezető: Dr. Albert Ervin, egyetemi adjunktus

Patológiai Tanszék

2024

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések jegyzéke.....	2
2.	Bevezetés.....	3
3.	Irodalmi áttekintés.....	6
3.1.	Virulencia faktorok, patotípusok.....	6
3.2.	Antimikrobiális rezisztencia.....	7
4.	Célkitűzés.....	9
5.	Anyag és módszertan.....	10
5.1.	Adatgyűjtés.....	10
5.2.	Virulencia faktor gén vizsgálatok.....	10
5.3.	NTEC mPCR3.....	11
5.4.	Fenotípusos antibiotikum-érzékenységi adatok.....	12
6.	Eredmények.....	15
6.1.	Virulencia faktorok.....	15
6.2.	Hemolízis.....	16
6.3.	Korcsoport bontás.....	16
6.4.	NTEC eredmények.....	18
6.5.	Fenotípusos antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok.....	20
6.6.	MIC.....	20
6.7.	DDT.....	20
7.	Megbeszélés.....	22
7.1.	Virulencia faktorok.....	22
7.2.	Antimikrobiális rezisztencia.....	24
7.3.	Rezisztencia trendek.....	24
7.4.	Hiányosságok orvosolása a sertés vonatkozású <i>E. coli</i> AST kutatásban.....	25
8.	Következtetések.....	25
9.	Összefoglalás.....	26
10.	Summary.....	28
11.	Irodalomjegyzék.....	29
12.	Köszönetnyilvánítás.....	36

1. Rövidítések jegyzéke

AIDA: Adhesin involved in diffuse adherence	EUCAST: Európai Antimikrobiális Érzékenységvizsgálati Bizottság (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
AMR: Antimikrobiális rezisztencia (Antimicrobial Resistance)	F4, F5, F6, F18, F41: Fimbriális antigének
AST: Antibiotikum-érzékenységi vizsgálat (Antimicrobial Susceptibility Testing)	FLL: Flórfenikol
BSAC: Brit Antimikrobiális Kemoterápiás Társaság (British Society for Antimicrobial Chemotherapy)	GEN: Gentamicin
CA-SFM: A Francia Mikrobiológiai Társaság Antibiogram Bizottsága (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie)	LTb: Hőlabilis toxin (Heat-Labile Toxin B)
CAZ: Ceftazidim	MIC: Minimális gátló koncentráció (Minimum Inhibitory Concentration)
CDT: Cytolethal Distending Toxin	MPCR: Multiplex PCR
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute	NTEC: Nekrotoxikus <i>Escherichia coli</i> (Necrotoxic <i>Escherichia coli</i>)
CNF: Cytotoxic Necrotizing Factor	NWT: Nem-vad-típus (Non-Wild Type)
COL: Kolisztin	Paa: Porcine attaching and effacing factor
DDT: Korongdiffúziós teszt (Disc Diffusion Test)	PCR: Polimeráz láncreakció (Polymerase Chain Reaction)
DOX: Doxiciklin	SPT: Spektinomycin
EAE: Enterocyte attachment and effacement	STaP, STb: Hőstabil toxinok (Heat-Stable Toxins a and b)
EAST1: Enteroaggregative heat-stable toxin	STEC: Shigatoxin termelő <i>Escherichia coli</i> (Shigatoxigenic <i>Escherichia coli</i>)
ECOFF: Epidemiological Cut-Off Value	TET: Tetraciklin
EFSA: European Food Safety Authority	TECOFF: Tentatív epidemiológiai határérték (Tentative Epidemiological Cut-Off Value)
ENR: Enrofloxacin	VAST: Veterinary Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EPEC: Enteropatogén <i>Escherichia coli</i> (Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>)	WT: Vad-típus (Wild Type)
ETEC: Enterotoxikus <i>Escherichia coli</i> (Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>)	

2. Bevezetés

A patogén *Escherichia coli* (*E. coli*) baktériumok a szopós és választott malacok megbetegedéseinek egyik leggyakoribb kórokozói [1]. Az általuk okozott újszülöttkori és választás utáni hasmenés, illetve az ödéma betegség jelentős gazdasági károkkal jár, mint minden, a felszívódás és a takarmány értékesülés romlásával járó kórkép, mert a malacnevelés során a takarmányozás teszi ki a költségek nagy részét.

Theodor Escherich, német bakteriológusról kapta a nevét az *Escherichia* nemzetség, aki először izolálta ezt baktériumot újszülöttek székletéből. Az *E. coli* az *Enterobacteriaceae* család tagja, Gram-negatív, fakultatív anaerob baktérium, a bélflóra természetes alkotóeleme, azonban egyes törzsei patogén potenciállal rendelkeznek.

Sertésekben az *E. coli* okozta hasmenés diagnózisa történhet tünetek, kórbonctani elváltozások, szövettan, tenyésztés, és molekuláris vizsgálatok alapján. A klinikai tünetek korcsoporttól és patotípustól egyaránt függenek, előfordul enyhébb, szubklinikai lefolyás, klinikai fertőzés esetén jellemző a hasmenés, dehidratáció, letargia, takarmány hasznosulás romolása, heveny esetben ödéma, idegrendszeri tünetek, de előfordulhat, hogy tünetek megjelenése előtt elhullik az állat, főleg fiatal korban.

Az *Enterobacteriaceae* család tagjait el lehet különíteni tenyésztés, festődés illetve biokémiai tulajdonságok alapján. Az alábbi tulajdonságokban megegyezik a család: Gram-negatív, glükóz fermentáló, oxidáz-negatív, kataláz-pozitív, fakultatív anaerob, MacConkey agaron tenyésznek, spórát nem alakítanak ki. Az *E. coli* telepek közönséges, véres illetve szelektív táptalajon jellemzően sima, néha durva illetve mukoid telepeket képeznek, a patogén törzsek véres agaron jellemzően hemolizálnak. Egyes csoportok fémes csillogású telepeket hoznak létre ha eosin-metilénkék agaron növekednek. Az *E. coli* a bélsatornában előforduló egyéb enterobaktériumoktól a biokémiai tulajdonságai alapján különítjük el; jellemzően laktóz-pozitív, (kivételesen találkozni laktóz-negatív törzsekkel), indolt képez, metilvörös próbában pozitív [2].

Szerotipizálásra, azaz egyes szerotípusok elkülönítésére, az agglutinációs tesztek használhatók, melyek az 'O' (szomatikus, poliszacharid), 'H' (flagellar), és 'K' (capsular) antigének detektálásával működnek. A szomatikus antigének LPS (lipopoliszacharid) természetűek, és a sejt felszínén helyezkednek el. A flagelláris antigének fehérje, a capsular antigének pedig poliszacharid

természetűek. A szerotipizálásnak ma is nagy szerepe van az egyes fertőző betegségek azonosításában, azonban az NTP (non-typable pathogenic) *E. coli* törzsek jelenlétéből adódóan terjed a virotipizálás, azaz virulencia faktorok alapján történő azonosítás [3].

Az enteropatogén *E. coli* törzsek virulencia faktorok révén képesek megbetegedést okozni, ezeket három fő kategóriába soroljuk: toxinok, adhéziós struktúrák és inváziós faktorok, ezek mind szerepet játszanak a különböző enterális vagy extraintestinalis megbetegedések patomechanizmusában, illetve a virulencia faktorok és a kórképek patomechanizmusa alapján kategorizáljuk a törzseket patotípusokba [4].

Egyre jobban elterjedt módszer mind detektálás mind az izolátumok azonosítása terén a PCR illetve multiplex PCR [5].

A közelmúltban [1], a patogén *E. coli* törzsek virulencia faktorinak, és az általuk okozott betegségek patomechanizmusának részletesebb ismeretében precízebb diagnosztikai és vakcina fejlesztési módszerek váltak elérhetővé, szemben a hagyományos szerotipizálási módszerekkel.

A sertéságazatban, különösen a élelmiszer termelő állatok kezelése során kiemelkedő fontosságú az antibiotikumok célzott és mértékletes felhasználása, mert a terjedő antimikrobiális rezisztenciához (AMR) nagy mértékben hozzájárul az antibiogramm és megfelelő indikáció hiányában, inkonzekvensen alkalmazott széles-spektrumú antibiotikum használat. A hazai sertésételepeken jelen lévő *E. coli* törzsek monitorozásával nyomon tudjuk követni a kialakulásban lévő rezisztencia tendenciákat, és segíteni tudjuk a klinikumban dolgozó állatorvosokat, hogy laboratóriumi eredmények alapján ki tudják választani a hatékony antibiotikumokat.

Számos szervezet létezik humán vonalon antibiotikum-érzékenységi vizsgálat (Antimicrobial Susceptibility Testing; AST) protokollok kidolgozására, ilyen szervezet a Klinikai és Laboratóriumi Szabványügyi Intézet (Clinical and Laboratory Standards Institute; CLSI), az Európai Antimikrobiális Érzékenységvizsgálati Bizottság (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing ; EUCAST), a Brit Antimikrobiális Kemoterápiás Társaság (British Society for Antimicrobial Chemotherapy; BSAC) és a Francia Mikrobiológiai Társaság Antibiogram Bizottsága (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie; CA-SFM). Ezzel szemben specifikusan állatgyógyászati téren jelenleg csak a CLSI, 1993-ban alakult, Állatorvosi Albizottság az Antimikrobiális Érzékenységi Vizsgálatokért egysége (Veterinary Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing; VAST) tölt be jelentős szerepet. Az első

AST szabványok publikálása óta a CLSI-VAST több mint 260 antibiotikum-baktérium-faj kombinációra dolgozott ki határértékeket, illetve rendszeresen adnak ki állatorvosok számára AST standard dokumentumokat. (VET01, VET01S) [6]. Az Európai Antimikrobiális Érzékenységvizsgálati Bizottság (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; EUCAST) célja elsősorban humán patogén kórokozók nyomonkövetése, és epidemiológiai határértékek (Epidemiological Cut-Off Value, ECOFF) kidolgozása. Zoonotikus illetve élelmiszer eredetű patogének AMR monitorozása céljából adaptáljuk leggyakrabban állatorvosi felhasználásra az ECOFF-okat. Míg az ECOFF-ok segítenek nyomonkövetni a kialakulásban lévő rezisztencia mechanizmusokat, nem használhatók fel közvetlenül klinikai vonatkozásban [7–9].

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Virulencia faktorok, patotípusok

A patogén *E. coli* törzseket, az általuk okozott tünetek alapján Intesztinális illetve Extraintesztinális kategóriákba soroljuk. Az Intesztinális kategórián belül az Enterotoxikus *E. coli* (ETEC), Verotoxikus/Shigatoxikus *E. coli* (VTEC, STEC), Enteropatogén *E. coli* (EPEC), illetve a Nekrotoxikus *E. coli* (NTEC) patotípusok vannak jelen a szopós és választott malac állományokban.

Az alábbi táblázat (1. táblázat) tartalmazza a releváns, szopós és választott malacokban *E. coli* előidézte kórképeket, a rájuk jellemző patotípusokat, illetve virulencia faktorokat [2].

1. Táblázat: Szopós és választott malacok *E. coli* előidézte kórképei

Kor	Kórkép	Patotípus	Adhezinek	Exotoxinok
Szopós	Újszülött malacok coli-hasmenése	ETEC	F4, F6, (F5, F41) fimbria	LT, StaP, STb, EAST1, α -hemolizin
Választott	Választott malacok coli-hasmenése	ETEC	F4, F18ac fimbria, AIDA	STa, STb, LT, Stx(VT), EAST1, α -hemolizin
		EPEC	EAE intimin	EAST1
		NTEC	P, S fimbria	CNF
	Ödéma betegség	STEC/VTEC	F18ab fimbria, AIDA	Stx2e (VT2e), EAST1, α -hemolizin

Az enterotoxikus *E. coli* (ETEC) törzsek különösen jelentős csoportját képezik a szopós és választott malacok hasmenését okozó *E. coli* törzseknek [10]. Az ETEC által kiváltott hasmenés két alapvető feltétele a bélhámsejtekhez való tapadás és a toxin termelés. Toxinjai a hőlabilis enterotoxin LT (*elt*) és a hőstabil enterotoxinok STa és STb (*sta*, *stb*), amelyek az elektrolit-egyensúly felborítása révén idéznek elő hasmenést [11]. A bélfalhoz kitapadást adhéziós fimbrirák, az F4 (*faeG*) az F18ac (*fedA*), valamint az F5 (*fanC*), F6 (*fasA*) és F41 (*fim41A*) biztosítják [12]. A szopós malacok és a választott malacok ETEC törzsei eltérnek az F18ac (*fedA*) hordozásban; a

fimbriával kapcsolódó bél-receptor csak választási korban, illetve takarmányváltás hatására jelenik meg [4]. A sertés patogén *E. coli* törzsek ETEC patotípusba sorolásának kritériuma, hogy egy izolátum legalább egy enterotoxin gént és egy fimbria gént hordozzon [13].

Az ETEC mellett az enteropatogén *E. coli* (EPEC) törzsek is szerepet játszanak a választott malacok hasmenésének kórfejlődésében[14]. Az EPEC törzsek hordoznak egy ún. patogenitási szigetet, „locus for enterocyte effacement” (LEE) régiót [15], amit olyan gének alkotnak, amelyek lehetővé teszik az „attaching and effacing” (AE), azaz mikroboholy elhalást okozó elváltozásokat [5, 16].

Az ödémabetegségért felelős *E. coli* (EDEC, vagy STEC) törzsekre az F18ab fimbria (*fedA*) hordozás és a Shiga-toxin termelés jellemző, amelyek érkárosodást és ezáltal ödéma kialakulást eredményeznek [1].

A nekrotoxikus *E. coli* (NTEC) törzsek elterjedtsége és szerepe fiatal sertések kórokozójaként jelenleg kevésbé ismert. A kétezres évek elején magyar kutatók kezdeményeztek kutatásokat ebben a témában [17], a közelmúltban pedig Németországban [18] folytak vizsgálatok. Emellett francia és belga kutatók [19] egy multiplex PCR-módszert fejlesztettek az NTEC-re jellemző gének kimutatására.

Újabban a jól kategorizált *E. coli* patotípus rendszert kiegészítik a ‘hibrid’ patotípusok, amelyek enterális és extraintesztinális virulencia faktorokkal is rendelkeznek. Számos kutatásban találtak a választott malacok hasmenésére jellemző ETEC és az ödéma betegségekre jellemző STEC törzsek virulencia faktorait hordozó ETEC/STEC hibrid törzseket.[20–23]

3.2. Antimikrobiális rezisztencia

Az *E. coli* AMR szempontból az egyik legkutatottabb baktérium; kommenzalista jellegéből adódóan állandóan jelen van a gasztrointesztinális traktusban és környezetében; rendkívül plasztikus a genomja, illetve plazmidon is kódol rezisztencia géneket, ennek köszönhetően könnyen alakít ki és ad tovább rezisztencia mechanizmusokat, és rezervoárként szolgálhat látens rezisztencia géneknek [6]. Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (European Food Safety Authority; EFSA) különböző forrásokból állandóan folytat rutin AMR monitoring céljából kommenzalista illetve ESBL termelő *E. coli* mintavételt.

Sertés patogén *E. coli* AMR monitorozás kapcsán a bevezetőben említett CLSI és EUCAST szervezetek által kiadott protokollok relevánsak számunkra. Az *in vitro* érzékenységi vizsgálatokat hagyományosan korongdiffúziós (DDT) módszerrel végezték. Az antibiotikummal átitatott korong

körül kialakult gátlási zóna méretétől függ, hogy a baktériumot érzékenynek tekintették-e az adott hatóanyaggal szemben. Bár a DDT egy gyors és gazdaságos módja az AMR monitorozásnak, szubjektívebb és kevésbé pontos, mint a ma már az AST-ben gyakrabban alkalmazott MIC. A minimális gátló koncentráció (MIC) az adott antibiotikum legalacsonyabb koncentrációja ($\mu\text{g/mL}$ -ben kifejezve), amely képes megakadályozni egy adott baktériumtörzs növekedését.

Mind DDT mind MIC eredmények elbírálására állnak rendelkezésre határértékek, ami alapján kategorizáljuk az izolátumokat. Az eredmények csak akkor bírálhatók el az adott szervezet által meghatározott határértékekkel, ha a szervezet által kiadott protokoll szerint történt a mintafeldolgozás és AST. Eltérés például a meghatározott táptalaj összetételben megváltoztathatja az antibiotikum *in vitro* aktivitását, ezzel minimum kérdésessé téve az eredmény értékelhetőségét [6].

A CLSI által évente kiadott CLSI-VET01 adott állatfajra, baktériumra és hatóanyagra meghatároz klinikai határértékeket, amik alapján érzékeny (S), mérsékelten érzékeny (I), illetve rezisztens (R) az adott törzs. Az EUCAST fenntart egy nyilvánosan hozzáférhető adatbázist, amelyben epidemiológiai határértékeket (Epidemiological Cut-Off Value, ECOFF) határoznak meg, DDT illetve MIC eloszlások alapján. Klinikai kontextus hiányában, például AMR monitorozáshoz, ez alapján az izolátum wild-type (WT), illetve non-wild-type (NWT) besorolású. A z ECOFF arra szolgál, hogy a szerzett fenotipusos rezisztencia mechanizmusokkal rendelkező izolátumokat elkülönítsék a WT izolátumoktól [24]. A WT és NWT szubpopulációk általában bimodális, vagy az elterjedt rezisztenciamechanizmusoktól függően, trimodális illetve multimodális MIC vagy gátlási zónaátmérő-eloszlással jellemezhetők. A bimodális eloszlások esetében az alacsonyabb MIC-értékekkel vagy nagyobb zónaátmérőkkel rendelkező szubpopuláció a WT, míg a magasabb MIC-értékekkel vagy kisebb zónaátmérőkkel rendelkező szubpopuláció a NWT. Amennyiben csak unimodális MIC- vagy zónaátmérő-eloszlások vannak, az adott baktérium általában WT. Esetenként a klinikai határértékek és az ECOFF-ok megegyezhetnek, azonban CLSI klinikai határérték meghatározásnál kritérium, hogy a határérték nem vághatja ketté a WT görbét [25].

Patogén *E.coli* AMR kutatások terén nehézséget okoz, hogy a kutatások nem követik a CLSI, EUCAST, illetve CVMP (Állatgyógyászati Készítmények Bizottsága, Committee for Veterinary Medicinal Products) irányelveket, és sertés CLSI határértékek hiányában felhasználnak humán határértékeket, illetve klinikai fogalmak, azaz rezisztens és érzékeny kategóriákat használnak *in vitro* eredmények elbírálására [8, 26, 27].

4. Célkitűzés

Az *Escherichia coli* jelentős állategészségügyi és gazdasági szerepet tölt be Magyarország sertéságazatában, ezért az alábbi kutatási célokat tűztük ki; Elsődlegesen, hogy a rendelkezésünkre álló passive surveillance adatok alapján felmérjük a hazai sertéslepeken jelenlévő *E. coli* törzsek virulencia faktorait. Ezt követően, a virulencia faktorok elemzése alapján meghatározzuk a patotípusok eloszlását. Azon izolátumok esetében, amelyekben egyetlen vizsgált virulencia faktor se kimutatható, egy általunk tervezett mPCR-rel vizsgáljuk az NTEC (nekrotoxikus *E. coli*) virulencia faktor gének jelenlétét. Végül, az antibiotikum-érzékenységi adatok elemzésével nyomon követjük a 2020 és 2022 között kialakulófélben lévő antimikrobiális rezisztencia (AMR) trendeket.

5. Anyag és módszertan

5.1. Adatgyűjtés

A vizsgálat alapját képező adatok passzív surveillance keretében gyűjtött mintákból származnak, tehát a mintagyűjtés nem előre megtervezett, hanem a laboratóriumba beérkező, rutinszerűen feldolgozott izolátumok adatain alapul. Bár a nem-reprezentatív mintavétel korlátozhatja az eredmények általánosíthatóságát, ez a megközelítés gazdaságos és hatékony módja az epidemiológiai tendenciák feltérképezésének, feltéve, hogy az eredmények értékelésekor figyelembe vesszük a mintavétel sajátosságait. Ez a módszer humán- és állategészségügyi laboratóriumokban is gyakran alkalmazott, mivel gyorsan, és nagy mennyiségű adathoz jutunk. Az így gyűjtött adatok segítségével átfogó képet kaphatunk a vizsgált *E. coli* törzsek virulencia faktor gén készletéről és antimikrobiális érzékenység profiljairól.

5.2. Virulencia faktor gén vizsgálatok

A vizsgálatba bevonás kritériuma volt, hogy az izolátum rendelkezzen PCR-panel eredménnyel, azaz az mPCR1 és mPCR2 eredményét tudjuk értékelni. A duplikátumok és a hiányos adatsorok kiszűrése után 866 adatsorral dolgoztunk. Az adatok 2020 és 2022 között érkeztek a laborba, ahol a rutin, sertés eredetű *E. coli* virulenciagén-panelben két multiplex mPCR-rel vizsgálták az izolátumokat.

Az mPCR1 pannellel az alábbi géneket keresték: *faeG* (F4 fimbria), *fanC* (F5 fimbria), *fasA* (F6 fimbria), *fedA* (F18 fimbria), *fim41A* (F41 fimbria), *sta* (StaP toxin), *stb* (STb toxin), *elt* (LTb toxin), *stx2* (Stx2e toxin)[28]. Az mPCR2 pannellel az alábbi géneket keresték: *astA* (EAST1 toxin), *paa* (Paa faktor), *aidA* (AIDA-I faktor), *eae* (EAE faktor), az *E. coli* kimutatására két marker: *lacZ* (laktáz gén) és *yaiO* (fajspecifikus gén) volt alkalmazva [28].

A 866 izolátum virulencia adataihoz a leletközlésekből és a laboratóriumi egységek (mikrobiológiai labor, PCR laboratórium) saját rendszereiből kikerestem, ahol rendelkezésre állt, a malacok korát, a származási helyet, és a beküldött minta típusát (pl: végbéltampon, pool, hulla). Négy tágabb életkor kategóriával dolgoztam: ahol a beküldő alapján be lehetett azonosítani, szopós illetve választott kategória, ahol nem lehetett beazonosítani, ott 'bizonytalan' kategória, ahol pedig nem jelöltek meg kort a beküldőn 'nincs adat' kategórába került a minta.

Az így keletkezett adathalmazt egy táblázatban foglaltam össze, amely tartalmazta: Az izolátum iktatószámát; a laborba érkezés dátumát; a származási helyet; a beküldött minta típusát; ahol

ismert volt, a malac pontos életkorát, illetve ahol csak hozzávetőleges adat állt rendelkezésre, ott életkori kategóriát; az izolátum virulencia faktorait és, hogy a törzs hemolizált-e. Az ismert virulencia faktorok alapján besoroltam a mintákat patotípusokba.

5.3. NTEC mPCR3

Amennyiben az mPCR-ek nem mutattak ki vizsgált virulencia faktort, és az adott minta fizikailag hozzáférhető volt, visszakerestem, és lefuttattunk rajta egy általunk tervezett, NTEC virulencia faktor géneket kereső, mPCR3-at. A 83 darab mPCR3-al vizsgált izolátumban S fimbria, P fimbria, CNF1 (citotoxikus nekrotizáló faktor; cytotoxic necrotizing factor) génekre szűrtünk.

Az alábbi táblázat (2. táblázat) foglalja magában az mPCR3-hoz tervezett primereket [19, 29].

2. Táblázat: NTEC gének kimutatásához tervezett primerek; a tervezés folyamán felhasznált szakirodalom [19, 29]

Primer	Kimutatott virulencia-gén	Primer szekvencia	PCR termék méret
cnf1-F	cnf (CNF1)	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG	498 bp
cnf2-R		CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT	
M2-sfaD-E-Fw	sfaD (S fimbria)	CTCCGGAGA ACTGGGTGCATCTTAC	410 bp
M2-sfaD-E-Rev		CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	
M2-papC-Fw	papC (P fimbria)	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG	328 bp
M2-papC-Rev		ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	

Az első mPCR3 után 14 izolátumban detektáltunk NTEC-re utaló géneket, ezeken elvégeztünk még egy megerősítő mPCR3-at.

5.4. Fenotípusos antibiotikum-érzékenységi adatok

Kigyűjtöttem és excelben rendszereztem a laborban 2020 és 2022 között készült rutin *E. coli* AMR vizsgálatok eredményeit, amik a beküldő igényeitől függően MIC illetve DDT módszerrel készültek. A vizsgálatok idején az alábbi antibiotikumokkal folytak AMR vizsgálatok a laborban (3. táblázat).

3. Táblázat: A laborban a kutatás ideje alatt vizsgált antibiotikumok, a vizsgálat módja szerint

DDT	amoxicillin, amoxicillin-klavulánsav, apramicin, ceftiofur, cefquinom, doxiciklin, enrofloxacin, florfenikol, flumekvin, gentamicin, kolisztin, linkospektin, marbofloxacin, neomicin, spektinomicin, spiramicin, streptomycin, trimetoprim-szulfametoxazol
MIC-E-150 panel	amoxicillin-klavulánsav, ampicillin, ceftiofur, kolisztin, enrofloxacin, erythromycin, flórfenikol, gentamicin, penicillin, spektinomicin, trimetoprim-szulfametoxazol, spektinomicin, tetraciklin, tiamulin, tilmikozin, tulatromicin
MIC-E-298 panel	ampicillin, ceftazidim, cefkvinom, ceftiofur, kolisztin, cefotaxim, doxiciklin, enrofloxacin, flórfenikol, gentamicin, gamitromicin, neomicin, spektinomicin, trimetoprim-szulfametoxazol, tildipirozin, tetraciklin, tiamulin, tilmikozin, tulatromicin

Mind a DDT [30] mind a MIC vizsgálatok a CLSI VET01 (2016) előírások alapján folytak.

A DDT eredményeket az eredményközlőkről bevitettem egy excel-táblába, így az adatelemzéskor 3 táblázattal dolgoztam; a kigyűjtött DDT eredményekkel (723 adatsor), illetve a két típusú MIC panel eredményeivel (462, illetve 430 adatsor). A MIC panel eredményeket kombináltam egy táblázatba.

Vad illetve nem vad típus kategóriába soroláskor a 2024.09.06.-én érvényes MIC (5. táblázat) és DDT (4. táblázat) EUCAST ECOFF adatbázist használtam.

A "tentatív epidemiológiai határérték" (TECOFF) olyan ideiglenes ECOFF, amit akkor használnak, ha a rendelkezésre álló adatok még nem elegendőek egy végleges ECOFF meghatározáshoz. A TECOFF érték legalább három elfogadható eloszlás alapján kerül megállapításra, míg egy végleges ECOFF értékhez legalább öt vagy több eloszlás szükséges [31].

4. Táblázat: EUCAST *Escherichia coli* DDT ECOFF-ok; 'Megfigyelések száma': az EUCAST által elemzett, az adott mikroorganizmus-antimikrobiális kombinációhoz gyűjtött egyedi mérések vagy adatok száma

EUCAST <i>Escherichia coli</i> DDT eloszlások, 2024.09.06.	Korong koncentráció (µg)	Megfigyelések száma	(T)ECOFF
Amoxicillin (AX)	10	506	(10)
Amoxicillin-klavulánsav (AMC)	30	3475	14
Gentamicin (GEN)	10	42970	16
Neomicin (NEO)	10	569	(13)
Trimetoprim-szulfametoxazol (T/S)	25	10984	22

5. Táblázat: EUCAST *Escherichia coli* MIC ECOFF-ok; 'Megfigyelések száma': az EUCAST által elemzett, az adott mikroorganizmus-antimikrobiális kombinációhoz gyűjtött egyedi mérések vagy adatok száma

EUCAST <i>Escherichia coli</i> MIC eloszlások, 2024.09.06.	Megfigyelések száma	(T)ECOFF
Amoxicillin-klavulánsav (AMC)	10137	(8)
Ampicillin (AMP)	105483	8
Ceftazidim (CAZ)	15036	1
Ceftiofur (CET)	36858	1
Kolisztin (COL)	6014	2
Cefotaxim (CTX)	10487	0.25
Doxiciklin (DOX)	7894	8
Enrofloxacin (ENR)	3039	0.125
Flórfenikol (FLL)	16192	16
Gentamicin (GEN)	78136	2
Neomicin (NEO)	3946	8
Spetinomicin (SPT)	3689	64
Trimetoprim-szulfametoxazol (T/S)	3689	64
Tetraciklin (TET)	18917	8

Az adatok tisztázásakor szempont volt az adott antibiotikumra vizsgált izolátumok száma, az antibiotikum relevanciája a sertésgyógyászat terén. Egy adatbázisba kombináltam a virulencia faktor vizsgálatok eredményeit, és az AMR vizsgálatok eredményeit, tehát amely izolátum rendelkezett rendelkezett mPCR1 és mPCR2, vagy mPCR3 eredménnyel, ahhoz hozzáfűztem az AMR vizsgálati eredményeket. Így a 866 virulencia génekkel összefüggő adatsorból 642 sorhoz (74%) társult valamilyen módszerrel kapott AMR eredmény. Az alábbi táblázat (6. táblázat) foglalja össze az adatelemzés során felhasznált antibiotikumokat és a hozzájuk tartozó adatpontot.

6. Táblázat: Adat elemzéshez felhasznált antibiotikumok és a hozzájuk tartozó adatpont.

Módszer	Antibiotikum	Adatpont (db)
DDT	Amoxicillin (AX DDT)	129
	Amoxicillin-klavulánsav (AMC DDT)	129
	Gentamicin (GEN DDT)	132
	Neomicin (NEO DDT)	445
	Trimetoprim-szulfametoxazol (T/S DDT)	130
MIC	Amoxicillin-klavulánsav (AMC)	268
	Ampicillin (AMP)	460
	Ceftazidim (CAZ)	188
	Ceftiofur (CET)	455
	Kolisztin (COL)	456
	Cefotaxim (CTX)	190
	Doxiciklin (DOX)	189
	Enrofloxacin (ENR)	453
	Flórfenikol (FLL)	456
	Gentamicin (GEN)	452
	Neomicin (NEO)	188
	Spetinomicin (SPT)	459
	Trimetoprim-szulfametoxazol (T/S)	459
	Tetraciklin (TET)	452

6. Eredmények

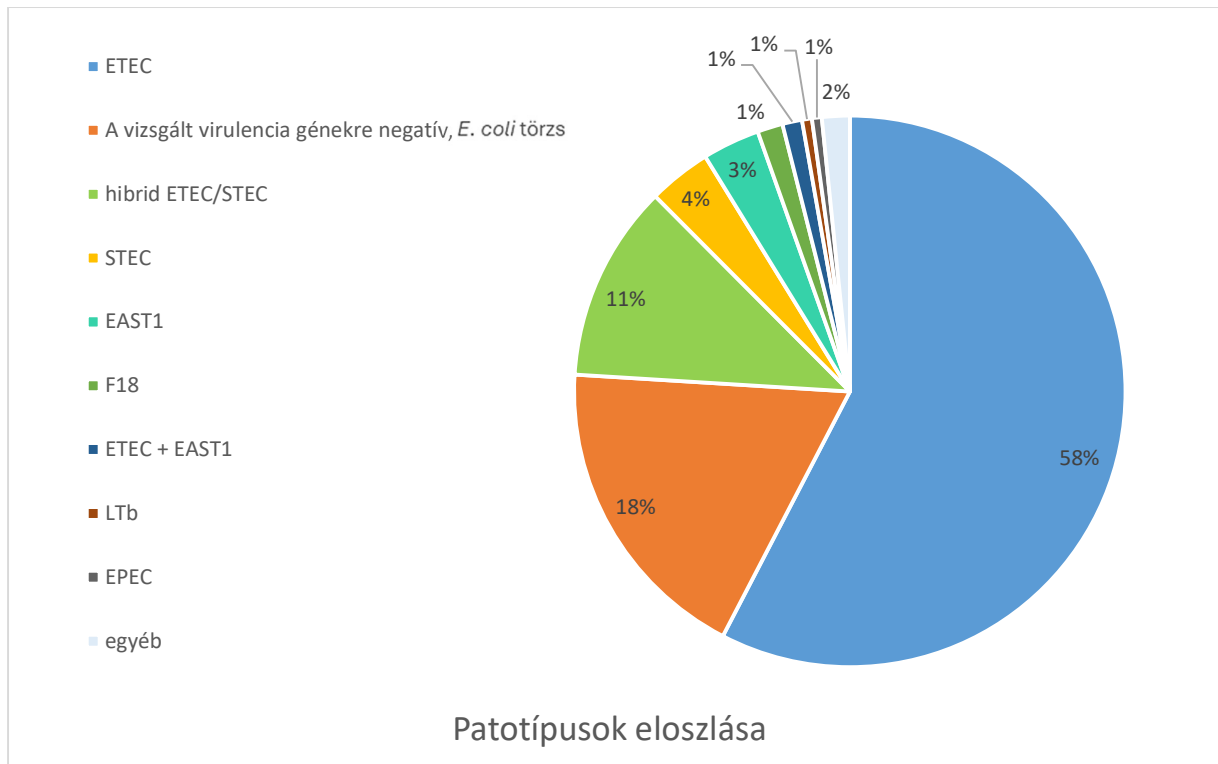
6.1. Virulencia faktorok

Az mPCR1 és mPCR2 vizsgálatok alapján a 866 mintából 707 darab, azaz 82% hordozott legalább egyet a vizsgált virulencia faktor génekből, és 159 darab, azaz 18% egyet se. Az alábbi táblázatban (7. táblázat) látható az egyes vizsgált géneket hordozó törzsek számszerű és százalékos eloszlása.

7. Táblázat: a vizsgált géneket hordozó törzsek számszerű és százalékos eloszlása

Virulencia faktor gének	Hordozó izolátumok száma	Hordozó izolátumok százalékos aránya
<i>faeG</i> (F4)	165	19%
<i>fanC</i> (F5)	1	0%
<i>fasA</i> (F6)	74	9%
<i>fedA</i> (F18)	409	47%
<i>fim41A</i> (F41)	2	0%
<i>sta</i> (STaP)	526	61%
<i>stb</i> (STb)	588	68%
<i>elt</i> (LTb)	176	20%
<i>stx2e</i> (Stx2e)	131	15%
<i>aida</i> (AIDA-I)	6	1%
<i>eae</i> (EAE)	7	1%
<i>paa</i> (Paa)	1	0%
<i>astA</i> (EAST1)	43	5%
<i>stx1</i> (Stx1)	0	0%
<i>stx2</i> (Stx2)	52	6%

A patotípusba sorolás után a következő eloszlást kaptuk:



1. Ábra: Patotípusok és be patotípusba nem sorolható törzsek virulencia faktorainak százalékos eloszlása kör-diagrammon (az egyéb címke a teljes elemszámból 1%-ot el nem érő patotípusokat és egyedi virulenci faktorokat takarja).

6.2. Hemolízis

714 béta-hemolizáló törzs volt (82%), és 152 ami nem mutatott hemolízist (18%). 197 minta származott ismert szopós malacból, ebből 72 törzs (37%) béta-hemolizált. 418 minta származott ismert választott malacból, ebből egy kivételével az összes, azaz 417 törzs béta-hemolizált. A 159, a vizsgált virulencia faktor génekre negatív mintából 64 darab (40%) mutatott béta-hemolízist.

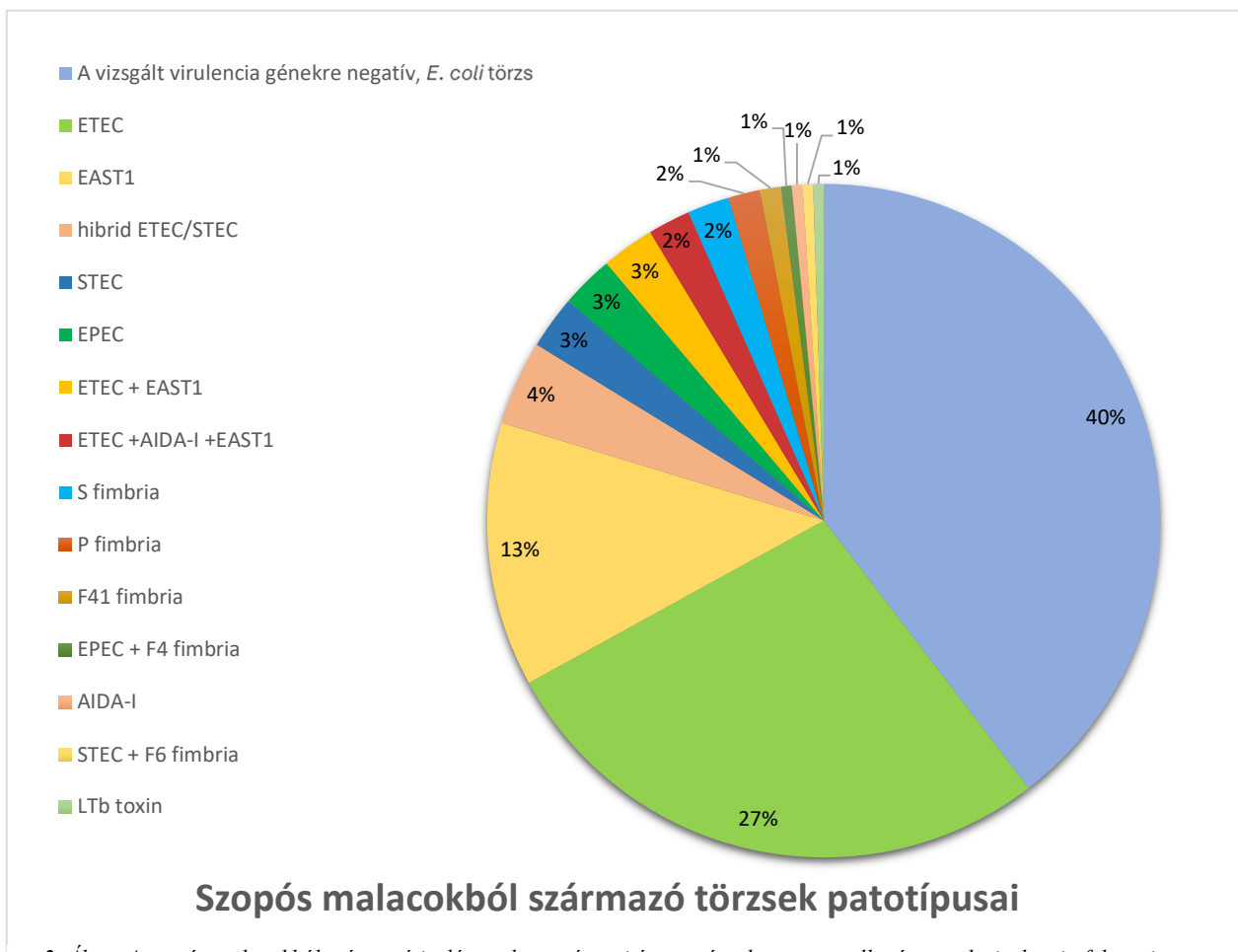
6.3. Korcsoport bontás

6.3.1.1. Szopós malacok korcsoport kategória

Külföldi szakirodalomhoz hasonlóan [32, 33], az EAST1 virulencia faktor szignifikánsan van jelen a szopós malacok *E. coli* törzsei között. Kutatásunkban ezt a virulencia faktor gént önmagában a szopós malacokból származó izolátumok 13%-a hordozta, és más virulencia faktor génekkel kombinációban az izolátumok 5%-a; két esetben *stb* (STb), és 1-1 esetben *stb* (STb), *sta* (STaP), *elt* (LTb), és *faeG* (F4) génekkel. A törzsek 34% illetve 23%-a hordozott STb és STaP toxin gént más génekkel kombinálva. Fimbriák közül leggyakrabban az F4 fimbria génje fordult elő, az

izolátumok 15%-ában, STaP, STb, LTb toxin génekkel kombinálva, és egy esetben EAE génnel kombinációban. Meglepő módon viszonylag nagy számban fordult elő F18 fimbríát kódoló gén, minden esetben STaP és STb toxin génekkel, és 5 izolátumban F6 és Stx2e génekkel kombinációban. 5 izolátum hordozott *aidA*-t (AIDA), 6 *eae*-t (EAE), és egy minta *eae-paa* (Paa) kombinációt.

A 197 darab, ismert szopós malacból származó minta 44%-a nem hordozott mPCR1 és mPCR2-vel vizsgált virulencia faktort, 55 darabot tudunk tovább vizsgálni NTEC virulencia faktotokra. Az alábbi ábrán (2. ábra) látható a szopós korcsoportból származó minták patotípus eloszlása.

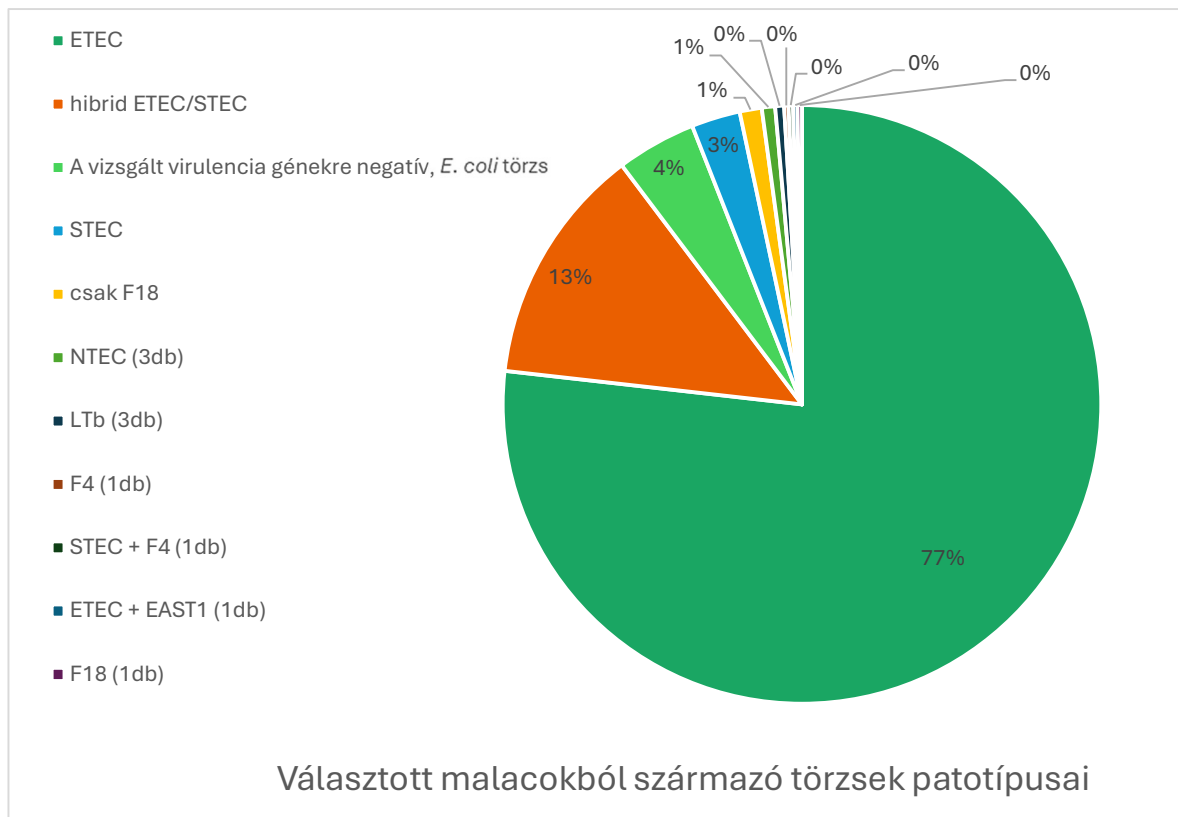


2. Ábra: A szopós malacokból származó izolátumok patotípusai és patotípusba nem sorolható törzsek virulencia faktorai százalékos arányban, kör diagrammon ábrázolva

6.3.1.2. Választott malacok

A választott malacokból származó izolátumok között mi a az F18 fimbría gén hordozást figyeltük meg túlnyomó többségben, az izolátumok 65% hordozta, mindig valamely toxin génnel kombinációban. A legjellemzőbb toxin gének az *stb* és *sta* voltak, így a leggyakrabban előforduló

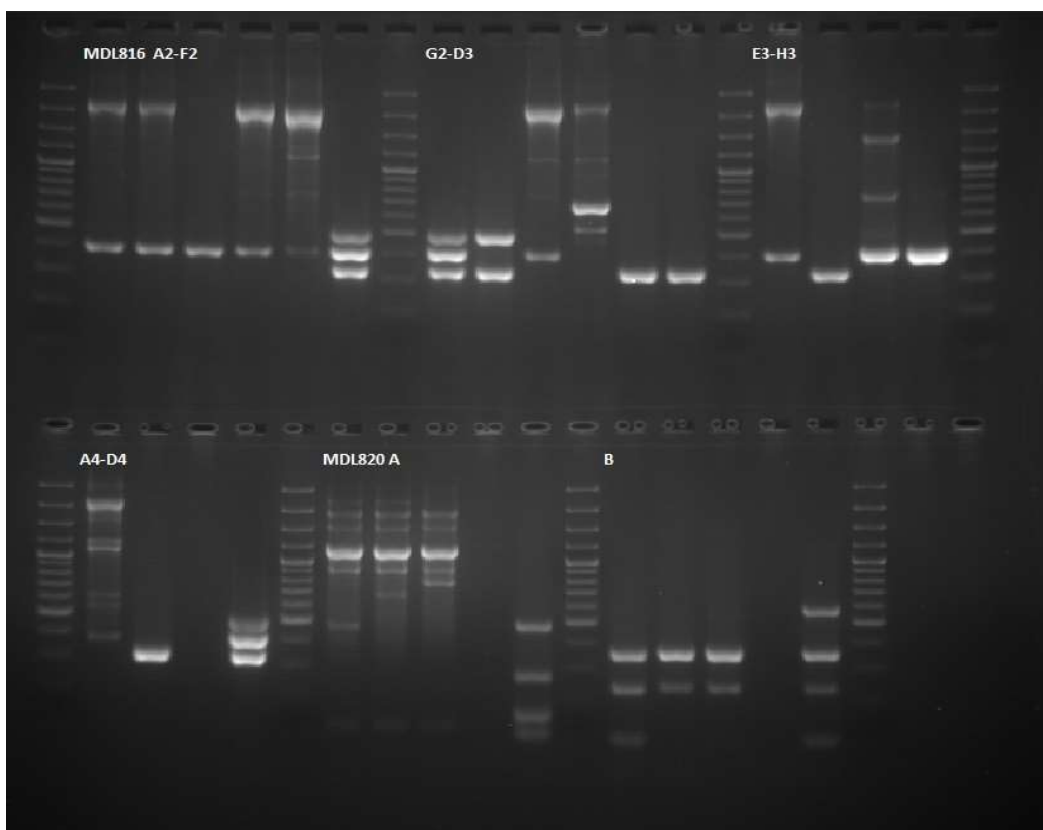
virulencia gén kombináció a *fedA-sta-stb* volt. Az ödéma betegséggel asszociált Stx2 toxin génjét az izolátumok 23% hordozta. A 418 választott malacból származó minta csupán 5%-a, 21 darab nem hordozott mPCR1 és mPCR2-vel vizsgált virulencia gént, ebből 9 izolátum volt meg fizikailag a laborban amin NTEC génekre tudtunk szűrni. . Az alábbi ábrán (3. ábra) látható a patotípusok eloszlása.



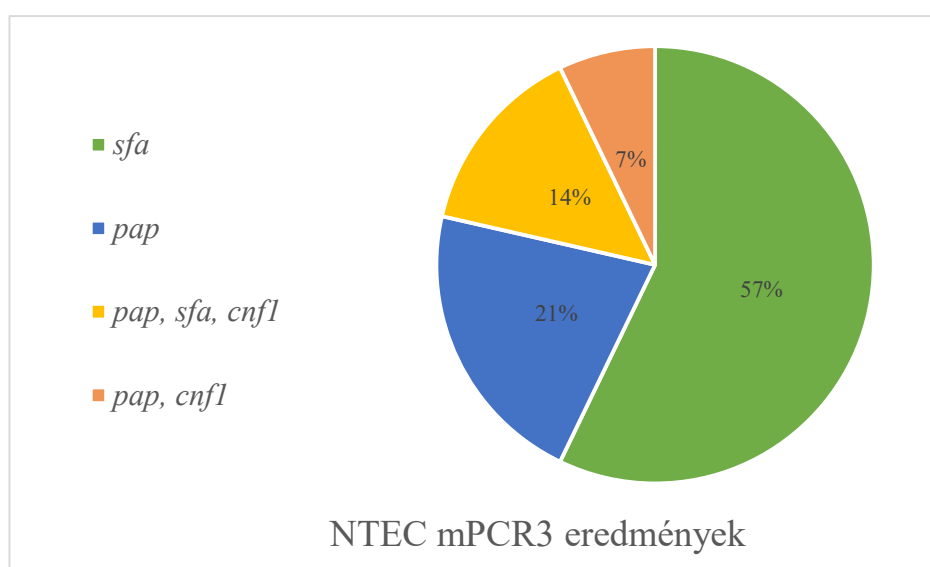
3. Ábra: Választott malacokból származó törzsek patotípus megoszlása, címkek szerint csökkenő sorrendben

6.4. NTEC eredmények

A 83 darab, vegyes korosztályokból származó, mPCR3-al vizsgált mintából csupán 14-ben találtunk az NTEC patotípusra jellemző géneket; 8 izolátum hordozta az *sfa* gént, ami az S fimbriát kódolja, 3 hordozta a *pap* gént, ami a P fimbriát kódolja, 2, ugyanarról a helyszínről származó izolátum hordozott *pap-sfa-cnfl* gén kombinációt, ahol a *cnfl* gén a CNF-t kódolja, és egy, szintén erről a helyszínről származó izolátum *pap-cnfl* kombinációt hordozott. Nem volt olyan izolátum amely csak a *cnfl* gént hordozta, más NTEC virulencia faktorok nélkül. Ahhoz, hogy egy törzset NTEC patotípusba soroljunk, kritérium, hogy hordozza a CNF-et kódoló *cnfl* gént [17], tehát a 83-ból 3 izolátum NTEC, és 11, NTEC-el ugyan asszociált, de ebbe a patotípusba be nem sorolható kategóriába esik.



1. Kép: Az NTEC génekre vizsgált törzsek korábbi eredményeit megerősítő mPCR3 teszt gélfotója; Termékméretük növekvő sorrendben: *papC* (*P. fimbria* gén) 328 bp, *sfaD* (*S. fimbria* gén) 410 bp, *cnf* (*CNF1* gén) 498 bp.



4. Ábra: mPCR3 vizsgálati eredmények, az NTEC patotípussal asszociált virulenciafaktorok kombinációi és megoszlása; *sfa* (*S. fimbria* gén), *pap* (*P. fimbria* gén), *cnf1* (*CNF* gén)

6.5. Fenotípusos antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok

A fenotípusos antibiotikum-érzékenységi vizsgálatok során jelentős eltéréseket figyeltünk meg az egyes antibiotikumokkal szembeni vad-típusú (Wild Type, WT) és nem-vad-típusú (Non-Wild Type, NWT) törzsek aránya között.

6.6. MIC

A mikrohígítási módszerrel végzett vizsgálatok során a csak az ampicillin és a tetraciklin esetén volt a minták több mint fele az NWT kategóriában. A legmagasabb NWT arányt mutató antibiotikumok a következők voltak (csökkenő sorrendben): ampicillin (AMP), 73% NWT; tetraciklin (TET), 67% NWT; enrofloxacin (ENR), 47% NWT; spetinomicin (SPT), 46% NWT; trimetoprim szulfametoxazol (T/S), 43% NWT; doxiciklin (DOX), 36% NWT.

Flórfenikollal szemben mind a 459 vizsgált minta WT kategóriába esett, ezen kívül az amoxicillin-klavulánsav (AMC) és a ceftazidim (CAZ) esetén volt nagy WT arány; 96% illetve 95%.

6.7. DDT

A korongdiffúzióval vizsgált minták esetén a NWT aránya a következő (csökkenő sorrendben): gentamicin (GEN DDT) 57% NWT; neomicin (NEO DDT) 51% NWT; amoxicillin-klavulánsav (AMC DDT) 50% NWT; amoxicillin (AX DDT) 13% NWT; trimetoprim szulfametoxazol (T/S) 12% NWT.

A MIC és DDT módszerrel is vizsgált antibiotikumok esetén a módszerek közötti WT:NWT arány eltérése magyarázható az eltérő származási hellyel, és ezáltal a telepeken az eltérő antibiotikum használatával.

8. Táblázat: A vizsgált antibiotikumokhoz tartozó mintaszám, WT és NWT minták száma, WT és NWT százalékos megoszlása. A DDT utótaggal jelölt antibiotikumok korongdiffúziós módszerrel, a többi mikrohígítási módszerrel készült mintákra vonatkozik.

	Antibiotikumhoz tartozó adatpont (db)	WT száma	WT százalék	NWT száma	NWT százalék
AX DDT	129	112	87%	17	13%
AMC	268	258	96%	10	4%
AMC DDT	129	65	50%	64	50%
AMP	460	122	27%	338	73%
CAZ	188	178	95%	10	5%
CET	455	420	92%	35	8%
COL	456	406	89%	50	11%
CTX	190	177	93%	13	7%
DOX	189	121	64%	68	36%
ENR	453	242	53%	211	47%
FLL	459	459	100%	0	0%
GEN	452	350	77%	102	23%
GEN DDT	132	57	43%	75	57%
NEO	188	167	89%	21	11%
NEO DDT	445	218	49%	227	51%
SPT	459	246	54%	213	46%
T/S DDT	130	114	88%	16	12%
T/S	459	261	57%	198	43%
TET	452	148	33%	304	67%

7. Megbeszélés

7.1. Virulencia faktorok

Kutatásunk alapján, hazánkban is, az európai [9, 18] és a közép európából [33] származó törzsekhez hasonlóan az ETEC patotípus, és az ezzel asszociált virulencia faktor gének; *fedA* (F18), *sta* (STa), *stb* (STb); dominálnak.

A nem-hemolizáló törzsek változatos virulenciakészlettel rendelkeztek, az EAST1 virulencia faktor génje fordult elő leggyakrabban, 24%-ban, ez több mint kétszerese egy osztrák kutatás [27] eredményének (10,2%), és további kérdéseket vet fel az EAST1 virulencia faktor patogén szerepéről.

E. coli EPEC virulencia faktorok vizsgálatánál hazai vonatkozásban ki kell emelni Dr. Malik Anna 2006-ban kiadott PhD értekezését [16]; többek között magyar származású, választási hasmenésben elhullott malac mintákakat vizsgáltak *eae*-re; 11,7%-ban találtak EAE géneket, amikhez az esetek kicsit több mint felében társult *paa*. Ehhez képest mi a 866 vegyes korcsoportú mintából csupán 7 *eae* pozitív izolátumot (>1%) kaptunk, ebből egy-egy társult *aidA* és *paa*-val. Ez a különbség valószínűleg magyarázható a minták származásával.

Kutatásunkban a szopós malacokból származó izolátumok viszonylag nagy arányban, 13%-ban hordoztak csak EAST1-t kódoló gént. A szakirodalomban az EAST1 hasmenést kiváltó szerepe nem egyértelmű [34, 35], de több cikk [36, 37] és a mi kutatásunk is alátámasztja, hogy gyakran fordul elő más virulenciafaktorokkal, például AIDA-val, vagy ETEC asszociált toxinokkal, és ezek patogén hatását szinergizmusban erősítheti.

Világszerte a nagyüzemi sertéstelepeken [20, 22, 38, 39], és Magyarországon is nő az ETEC/STEC hibrid törzsek előfordulásának gyakorisága, amik a későbbiekben zoonotikus potenciáljukból adódóan jelenthetnek problémát az élelmiszerláncban [40], illetve jelenleg nem jellemző, hogy a hibrid a két patotípus klinikai tüneteit keverten váltsa ki, még kísérleti körülmények között sem [41], de nem szabad mellőzni a keveredő virulenciakészletek és ezáltal új patogén patotípusok elterjedésének veszélyét [39, 42].

Azáltal, hogy az mPCR1 és mPCR2-re negatív törzseken további vizsgálatokat végeztünk, elkezdtük feltérképezni a jövőben potenciálisan nagyobb jelentőséggel bíró, és zoonotikus nekrotoxikus jelleget hordozó, a magyar sertésállományban jelenlévő *E. coli* törzseket. Tekintve, hogy az *E. coli* genetikai variabilitásáról hírhedt, a genomon kódolt virulencia gének mellett

könnyűszerrel vesz át és hordoz plazmidon kódolt virulencia és rezisztencia géneket [43], és a törzsek túlnyomó többségének kommenzalista jellegéből adódóan, egy-egy, jelenleg jelentéktelennek tűnő virulencia faktor is komoly állategészségügyi és gazdasági problémát okozhat. Tóth et al. 2000-ben kiadott cikkében vizsgált hasmenéses választott malacokat, akkor az izolátumok 5,9%-ában találtak NTEC jellegű *E. coli*-t, mi a kutatásunk során kevesebb mint 1%-ban (3 minta) találtunk NTEC-et, ez alapján biztató, hogy az NTEC virulencia faktorok nem terjedtek el jobban. A nekrotoxikus génekre tervezett mPCR3 célja, hogy megkönnyítse és költséghatékonyabbá tegye az NTEC törzsek nyomonkövetését [17].

Adatbázisunkba 69 olyan izolátum szerepel amin lefutott mind az mPCR1, mPCR2 és mPCR3, és minden vizsgált virulencia génre negatív volt. Ezeknél a mintáknál felmerül a kérdés, hogy az *E. coli* csak mint melléklet jött-e ki, vagy valóban általunk nem vizsgált virulenciagéneket hordoznak.

7.2. Antimikrobiális rezisztencia

7.2.1. Eredményeink értelmezése

Kutatásom megkezdésekor a virulencia faktor gének felderítése volt fókuszban, ennek folyamán merült fel a virulencia gének és a fenotípusos antibiotikum érzékenység összefüggése a korcsoport szerinti bontásban. A legnagyobb nehézséget a rendelkezésre álló adatok variabilitása jelentette; beküldő szerint változott a dokumentáció részletessége és a kért antibiogramm jellege, emiatt bizonyos hatóanyagokhoz kevés adatpont tartozott, és ezeket nem tudtuk bevenni a kutatásba. A beküldők hiányos kitöltéséből adódóan a minták túlnyomó többségére vonatkozóan nem állt rendelkezésre leírás a klinikai tünetekről, vagy a telepen felhasznált antibiotikumokról. Ennek fényében, és a sertésekre alkalmazható CLSI VAST klinikai antibiotikum rezisztencia határértékek hiányában kutatásunk eredményei nem alkalmazhatók közvetlenül klinikai helyzetben, és megnehezítik a más publikációk eredményeivel való közvetlen összehasonlítást, bár az esetek többségében a klinikai és epidemiológiai eredmények nem térnek el egymástól [9].

7.3. Rezisztencia trendek

Az előző bekezdés gondolatmenetét követve, ahol szükséges, a megemlített szakirodalomban a rezisztens és érzékeny, klinikai kifejezéseket, a nem-vad-típus és vad-típus epidemiológiai fogalmakkal egyenértékűnek veszem.

Más kutatásokhoz hasonlóan, ampicillinnel, tetraciklinnel és enrofloxacinnal szemben találtunk leggyakrabban fenotípusos rezisztenciát [9, 27, 44, 45].

Magyarországon Dr. Szmolka Annamária 2011-ben megjelent PhD értekezésében [43] munkacsoportjával vizsgálta, többek között, választott malacokból származó ETEC mintákon a fenotípusos antibiotikum rezisztenciát, a mi kutatásunktól jelentősen eltérő eredményekkel; Leggyakrabban szulfametoxazollal (91%), tetraciklinnel (84%) és streptomocinnal (80%) szemben bizonyultak rezisztensnek a vizsgált mintáik. A legnagyobb elérés az ampicillin érzékenység terén van, a mi, ampicillinre vizsgált ETEC izolátumaink 80% NWT volt, míg a 2011-es magyar minták csak 13%-a mutatott fenotípusos rezisztenciát. Hasonlóan magas érzékenységi eredmények születtek azonban cefotaxim és flórfenikol vizsgálatoknál; teljes érzékenység a PhD kutatásában, 93% fenotípusos érzékenység a mi vizsgálatunkban cefotaxim esetén, és 100-100% érzékenység flórfenikol esetén. Ezek alapján biztató eredmény, hogy Magyarországon az elmúlt évtizedben

nem nő olyan rohamosan a fenitípusos flórfenikol rezisztencia, mint a világ más országaiban, például Kínában és Spanyolországban [26, 46].

Ismert, és magyar kutatók által extenzíven kutatott [47, 48], egyes *fedA* (F18) hordozó ETEC törzsek plazmidon kódolt tetraciklin rezisztenciája és enterotoxin (STa, STb) termelése. Eredményeink alapján ez fenotípusosan is megnyilvánul; 279 ETEC izolátumhoz volt tetraciklin érzékenységi adatunk, ezek alapján a törzsek 75%-a került NWT kategóriába, míg például az ETEC/STEC hibrid jellegű törzsek csupán 59%-a, és az összes többi *fedA*, *sta* vagy *stb*-t nem hordozó, tetraciklinre vizsgált minta (112 darab) 56%-a volt NWT. Összességében a törzsek 67%-a volt a tetraciklinnel szemben NWT, érdekes módon, számszerűen ugyan erre az eredményre jutott egy 2020-as osztrák kutatás is [27] és hasonló eredményre (56.7%) egy szintén 2020-as dán kutatás [49].

7.4. Hiányosságok orvosolása a sertés vonatkozású *E. coli* AST kutatásban

Kutatásom során, mint más publikációk írói is [6, 9], nagy hiányát éreztem a nemzetközileg elfogadott klinikai határértékeknek. A rendelkezésünkre álló adatokat nem ültethettem át klinikai következtetésekre az EUCAST irányelvek szerint, és emiatt egyrészt az eredmények veszítenek relevanciájukból, másrészt megnehezíti az aktuális szakirodalmi adatokkal való összevetést, mert más cikkek [27, 50] ezt a problémát kikerülve vagy részben, vagy teljes egészében humán klinikai határértékeket használva kategorizálták az izolátumokat, és nem publikálták a korong vagy mikrohitátások számszerű eredményeit.

Az EUCAST-nál a VetCAST (Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) jelenleg fejlesztés alatt állnak az állatorvosi határértékek [51], a jövőben ezek alkalmazása nagyban meg fogja könnyíteni az AMR kutatások egységesítését különböző laboratóriumok között és nemzetközi szinten is.

Feltétlenül szükségesek további széleskörű kutatások a sertéságazatban *E. coli* témában.

8. Következtetések

Eredményeink rámutatnak a vizsgált *E. coli* izolátumok virulenciafaktorainak változatosságára, a szigorúan vett patotípusba sorolás nehézségeire, valamint a rendszeres és széleskörű antimikrobiális rezisztencia monitorozás szükségességére. Remélem eredményeinkkel hozzájárultunk későbbi kutatásokhoz a témában.

9. Összefoglalás

A patogén *Escherichia coli* baktériumtörzsek a szopós és választott malacok hasmenésének és más enterális megbetegedéseinek gyakori kórokozói. Az általuk okozott kórképek jelentős gazdasági veszteségekkel járnak, valamint nem célzott kezelésük megnöveli az antimikrobiális rezisztencia kialakulásának kockázatát. Magyarországon is egyre növekvő igény van a sertéstelepeken előforduló *E. coli* törzsek virulenciafaktorainak és antibiotikum-érzékenységének monitorozására, hogy a védekezés célzottan a virulens törzsekre fókuszáljon. Tanulmányunk során a 2020-2022 időszak, választás előtti és utáni malacok, passzív surveillance-ből származó *E. coli* izolátumok adatain végeztünk átfogó elemzést.

Az adathalmaz 866 törzs 18 virulenciagénjének multiplex PCR eredményeit tartalmazta, amik alapján a mintákat az alábbi patotípusokba soroltuk: enterotoxikus *E. coli* (ETEC), Shiga-toxint termelő *E. coli* (STEC), hibrid ETEC/STEC, enteropatogén *E. coli* (EPEC), nekrotoxikus *E. coli* (NTEC), valamint nem kategorizálható törzsek. Emellett összevetettük a törzsek hemolizáló illetve nem hemolizáló jellegét az ezekkel összefüggésben előforduló virulencia génekkel. A fenotípusos antibiotikum-érzékenységi adatok vagy mikrohígítási (MIC) vagy korongdiffúziós érzékenységi vizsgálati (DDT) módszerekből származtak. A tesztek eredményei, valamint a vonatkozó epidemiológiai határértékek (ECOFF) alapján a törzseket két kategóriába soroltuk: vad típusú (WT), illetve nem vad típusú (NWT) törzsek.

Az eredmények alapján a leggyakrabban előforduló toxin gén az *stb* (STb, 68%), a leggyakrabban előforduló fimbria gén a *fedA* (F18, 47%) volt. A leggyakoribb virulenciagén-kombináció a *fedA-sta-stb* (F18-STa-STb) volt. Legnagyobb arányban az ETEC patotípus volt jelen 58%-kal, amelyet a hibrid ETEC/STEC követett, 11%-kal. A hemolizáló törzsek aránya 82% volt, ezekben a törzsekben leggyakrabban a *fedA-sta-stb* virulenciagén kombináció fordult elő. A 18%-ot kitevő, nem hemolizáló törzsekhez leggyakrabban az *astA* (EAST1) virulenciagén társult. A fenotípusos antibiotikum-érzékenység vizsgálatok alapján az ampicillinnel szemben mutatkozott legkevésbé érzékenység, 73% volt az NWT törzsek aránya, amit a tetraciklin és az enrofloxacin, követtek 67%-kal, illetve 47%-kal. Az összes, flórfenikolra vizsgált minta vad-típus volt, ezen kívül a legnagyobb vad-típus arányt mutató antibiotikumok az amoxicillin-klavulánsav (96%) és a ceftazidim (95%) voltak.

Adatelemzésünk eredményeivel szeretnénk rávilágítani a sertéspatogén *E. coli* törzsek virulenciagénjeinek variabilitására, patotípusba sorolásának nehézségeire, így a virulenciagén-

tipizálás szükségességére. Az epidemiológiai érzékenységi kategóriák alkalmazása pedig segíthet képet adni a törzsek antimikrobiális rezisztenciájáról, releváns, a fertés gyógyászatban gyakorlatban alkalmazott antibiotikumokra vonatkozó, érvényes klinikai érzékenységi határértékek hiányában.

10. Summary

Pathogenic *Escherichia coli* strains are among the most common causes of diarrhea in suckling and weaned piglets, leading to significant economic losses, additionally, their treatment increases the risk of the bacteria developing antibiotic resistance. As a result, there is a growing need to monitor virulence factors and antibiotic sensitivity of *E. coli* strains found on domestic pig farms, so that preventive measures can specifically focus on the virulent strains.

Our study was conducted on passive surveillance data, collected from 2020 to 2022, analysing 866 *E. coli* isolates obtained from suckling and weaned piglets.

The samples were previously tested for 18 virulence genes by multiplex PCR, and based on the results, we classified the strains into the following pathotypes: enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), hybrid ETEC/STEC, enteropathogenic *E. coli* (EPEC), necrotoxic *E. coli* (NTEC), and non-classified strains. We also compared the hemolytic and non-hemolytic characteristics of strains with associated virulence genes. Based on the results of phenotypic antibiotic sensitivity tests conducted using microdilution (MIC) and disc diffusion test (DDT) methods, and epidemiological cut-off values (ECOFFs) we categorized the strains as wild type (WT) or non-wild type (NWT).

The most frequently detected toxin gene was *stx* (STx, 68%) and the most common fimbrial gene was *fedA* (F18, 47%). The most prevalent virulence factor gene combination was *fedA-stx-stx* (F18-STa-STb). The majority of the isolates, 58%, belonged to the ETEC pathotype, followed by hybrid ETEC/STEC strains, 11%. Hemolytic strains made up 82% of all isolates, the *fedA-stx-stx* virulence factor gene combination being the most frequently associated with hemolytic activity. 18% of the strains were non-hemolytic, the *astA* (EAST1) gene was most commonly linked to non-hemolytic strains. The highest proportion of non-wild type (NWT) strains were observed for ampicillin (73%), followed by tetracycline (67%) and enrofloxacin (47%). All samples tested for florfenicol were categorised as wild type (WT). Following this the highest WT proportions were observed for amoxicillin-clavulanic acid and ceftazidime, 96%, and 95% respectively.

With the results of our data analysis, we aim to highlight the variability of virulence genes in porcine pathogenic *E. coli* strains, the challenges of pathotype classification, and thus the necessity of virulence gene typing. The application of epidemiological cutoff values (ECOFFs) may provide insight into the antimicrobial resistance of these strains, in the absence of valid veterinary-specific clinical breakpoints for antibiotics commonly used in porcine medicine.

11. Irodalomjegyzék

1. Wiley Diseases of Swine, 11th Edition | Wiley. In: Wiley.com. <https://www.wiley.com/en-ac/Diseases+of+Swine%2C+11th+Edition-p-9781119350859>. Accessed 22 Aug 2023
2. C. L. Gyles JMF Escherichia Coli - Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470958209.ch15>. Accessed 22 Aug 2023
3. Lang C, Hiller M, Konrad R, Fruth A, Flieger A (2019) Whole-Genome-Based Public Health Surveillance of Less Common Shiga Toxin-Producing Escherichia coli Serovars and Untypeable Strains Identifies Four Novel O Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology* 57:10.1128/jcm.00768-19. <https://doi.org/10.1128/jcm.00768-19>
4. Nagy B (2000) A háziállatok enterális colibacillosisai. Magyar Tudományos Akadémia, Budapest
5. (2024) Enteropatogén Escherichia coli (EPEC) Rövid irodalmi összefoglaló/ Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Mini review. ResearchGate
6. (2024) Antimicrobial susceptibility testing in veterinary medicine: performance, interpretation of results, best practices and pitfalls. ResearchGate. <https://doi.org/10.1186/s44280-023-00024-w>
7. Kahlmeter G, Turnidge J (2022) How to: ECOFFs—the why, the how, and the don'ts of EUCAST epidemiological cutoff values. *Clinical Microbiology and Infection* 28:952–954. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.02.024>
8. O'Neill L, Manzanilla EG, Ekhlas D, Leonard FC (2023) Antimicrobial Resistance in Commensal Escherichia coli of the Porcine Gastrointestinal Tract. *Antibiotics* 12:1616. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111616>
9. García V, García-Meniño I, Gómez V, Jiménez-Orellana M, Méndez A, Aguarón A, Roca E, Mora A (2022) Mobile colistin resistance (MCR), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and multidrug resistance monitoring in Escherichia coli (commensal and

- pathogenic) in pig farming: need of harmonized guidelines and clinical breakpoints. *Front Microbiol* 13:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1042612>
10. Bin P, Tang Z, Liu S, Chen S, Xia Y, Liu J, Wu H, Zhu G (2018) Intestinal microbiota mediates Enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea in piglets. *BMC Vet Res* 14:385. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1704-9>
 11. Susceptibility of porcine intestine to pilus-mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increases with age | *Infection and Immunity*. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.60.4.1285-1294.1992>. Accessed 26 Nov 2024
 12. Nagy B, Fekete PZ (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol* 295:443–454. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.003>
 13. Luppi A (2017) Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Management* 3:16. <https://doi.org/10.1186/s40813-017-0063-4>
 14. Malik A, Tóth I, Beutin L, Schmidt H, Taminiau B, Dow MA, Morabito S, Oswald E, Mainil J, Nagy B (2006) Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of eae+ *Escherichia coli* from weaned pigs. *Vet Microbiol* 114:82–93. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.044>
 15. Dean P, Kenny B (2009) The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol* 12:101–109. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.11.006>
 16. Malik A (2006) Enteropathogen *Escherichia coli* (EPEC) baktériumok genotípusa/fenotípusa és pathogenitása választott malacokban
 17. Tóth I, Oswald E, Mainil JG, Awad-Masalmeh M, Nagy B (2000) Characterization of intestinal *cnfI*+ *Escherichia coli* from weaned pigs. *International Journal of Medical Microbiology* 290:539–542. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80019-3](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80019-3)
 18. Mertens N, Theuß T, Köchling M, Dohmann K, Lillie-Jaschniski K (2022) Pathogens Detected in 205 German Farms with Porcine Neonatal Diarrhea in 2017. *Veterinary Sciences* 9:44. <https://doi.org/10.3390/vetsci9020044>

19. Multiplex PCRs for Identification of Necrotoxicogenic *Escherichia coli* - PMC.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC193843/>. Accessed 22 Aug 2023
20. Ji X, Liang B, Sun Y, Zhu L, Zhou B, Guo X, Liu J (2020) An Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Hybrid Shiga-Toxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strain Isolated from a Piglet with Diarrheal Disease in Northeast China. *Foodborne Pathogens and Disease*. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2720>
21. Virulence and fitness gene patterns of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* isolated from pigs with edema disease or diarrhea in Germany - PubMed.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17715823/>. Accessed 18 Nov 2024
22. Santos AC de M, Santos FF, Silva RM, Gomes TAT (2020) Diversity of Hybrid- and Hetero-Pathogenic *Escherichia coli* and Their Potential Implication in More Severe Diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 10:1. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00339>
23. Fekete PZ, Schneider G, Olasz F, Blum-Oehler G, Hacker JH, Nagy B (2003) Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs. *Int J Med Microbiol* 293:287–298.
<https://doi.org/10.1078/1438-4221-00269>
24. Ákos T, Tamás T, Katalin K, Gábor K Változások és újdonságok az EUCAST antibiotikum érzékenységi vizsgálati ajánlásaiban 2020. január 1-től
25. Kahlmeter G, Turnidge J (2023) Wild-type distributions of minimum inhibitory concentrations and epidemiological cut-off values—laboratory and clinical utility. *Clin Microbiol Rev* 36:e00100-22. <https://doi.org/10.1128/cmr.00100-22>
26. Garcias B, Martin M, Darwich L (2024) Characterization of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Diarrheic and Healthy Weaned Pigs in Catalonia. *Animals* 14:487. <https://doi.org/10.3390/ani14030487>
27. Renzhammer R, Loncaric I, Roch F-F, Pinior B, Käsbohrer A, Spergser J, Ladinig A, Unterweger C (2020) Prevalence of Virulence Genes and Antimicrobial Resistances in *E.*

- coli Associated with Neonatal Diarrhea, Postweaning Diarrhea, and Edema Disease in Pigs from Austria. *Antibiotics (Basel)* 9:208. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040208>
28. Casey TA, Bosworth BT (2009) Design and Evaluation of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for the Simultaneous Identification of Genes for Nine Different Virulence Factors Associated with *Escherichia Coli* that Cause Diarrhea and Edema Disease in Swine. *J VET Diagn Invest* 21:25–30. <https://doi.org/10.1177/104063870902100104>
 29. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction | *Pathogens and Disease* | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/femspd/article/12/2/85/470515>. Accessed 27 Nov 2024
 30. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G (2014) Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* 20:O255–O266. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>
 31. Kahlmeter G - Wild type MIC (and zone diameter) distributions - ECOFFs (vs. clinical breakpoints) - The EUCAST international MIC distribution database
 32. Ngeleka M, Pritchard J, Appleyard G, Middleton DM, Fairbrother JM (2003) Isolation and Association of *Escherichia Coli* AIDA-I/STb, Rather than EAST1 Pathotype, with Diarrhea in Piglets and Antibiotic Sensitivity of Isolates. *J VET Diagn Invest* 15:242–252. <https://doi.org/10.1177/104063870301500305>
 33. Zajacova ZS, Konstantinova L, Alexa P (2012) Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in astA positive strains. *Vet Microbiol* 154:369–375. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.029>
 34. Ruan X, Crupper SS, Schultz BD, Robertson DC, Zhang W (2012) *Escherichia coli* Expressing EAST1 Toxin Did Not Cause an Increase of cAMP or cGMP Levels in Cells, and No Diarrhea in 5-Day Old Gnotobiotic Pigs. *PLOS ONE* 7:e43203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043203>

35. Kongsted H, Pedersen K, Hjulsager CK, Larsen LE, Pedersen KS, Jorsal SE, Bækbo P (2018) Diarrhoea in neonatal piglets: a case control study on microbiological findings. *Porcine Health Management* 4:17. <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0094-5>
36. Tusiime M, Mwiine FrankN, Afayoa M, Arojjo S, Erume J (2024) Molecular characterization of *Escherichia coli* virulence markers in neonatal and postweaning piglets from major pig-producing districts of Uganda. *BMC Veterinary Research* 20:230. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04092-x>
37. Duan Q, Yao F, Zhu G (2012) Major virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs. *Ann Microbiol* 62:7–14. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0279-5>
38. Host species shapes genotype, antimicrobial resistance, and virulence profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* (EPEC) from livestock in the United States | *Applied and Environmental Microbiology*. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aem.00749-24>. Accessed 30 Sep 2024
39. Genome-Based Characterization of Hybrid Shiga Toxin-Producing and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/EPEC) Strains Isolated in South Korea, 2016–2020. <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/5/1285>. Accessed 30 Sep 2024
40. Nyholm O, Halkilahti J, Wiklund G, Okeke U, Paulin L, Auvinen P, Haukka K, Siitonen A (2015) Comparative Genomics and Characterization of Hybrid Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/EPEC) Strains. *PLOS ONE* 10:e0135936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135936>
41. Nammuang D, Shen Y-W, Ke C-H, Kuan N-L, Lin C-N, Yeh K-S, Chang Y-C, Chang C-Y, Chang H-W (2024) Isolation and evaluation of the pathogenicity of a hybrid shiga toxin-producing and Enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs. *BMC Veterinary Research* 20:480. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04317-z>
42. Gomes TAT, Santos AC de M, Hernandez RT, Arias-Guerrero MY, Farfán-García AE, Gómez-Duarte OG (2023) Emergence of Hybrid *Escherichia coli* Strains. In: Torres AG (ed)

Trending Topics in *Escherichia coli* Research: The Latin American Perspective. Springer International Publishing, Cham, pp 295–315

43. Szmolka A (2011) Multirezisztens *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia génjeinek molekuláris epidemiológiai elemzése. Multidrug resistant *E. coli*: characterization of antimicrobial resistance and virulence genes with molecular epidemiologic approach
44. Hanon J-B, Jaspers S, Butaye P, Wattiau P, Méroc E, Aerts M, Imberechts H, Vermeersch K, Van der Stede Y (2015) A trend analysis of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from several livestock species in Belgium (2011–2014). *Preventive Veterinary Medicine* 122:443–452. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.09.001>
45. Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Jouy E, Butaye P, Franco A, Utinane A, Amado A, Moreno M, Greko C, Stärk KD, Berghold C, Myllyniemi A-L, Hoszowski A, Sunde M, Aarestrup FM (2008) Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002 – 2004: the ARBAO-II study. *Acta Veterinaria Scandinavica* 50:19. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-19>
46. Hu J, Li J, Huang X, Xia J, Cui M, Huang Y, Wen Y, Xie Y, Zhao Q, Cao S, Zou L, Han X (2023) Genomic traits of multidrug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from diarrheic pigs. *Front Microbiol* 14:1244026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1244026>
47. Mobilis genetikai elemek szerepe egyes *Escherichia coli* és *Salmonella*-baktériumok tetraciklinrezisztenciájának és virulenciájának horizontális terjedésében (NDA@SZTAKI, Nemzeti Digitális Adattár, National Digital Data Archive). <https://nda.sztaki.hu/kereso/index.php?a=get&id=523857&pattern=&t=Mobilis+genetikai+elemek+szerepe+egy+Escherichia+coli+%E9s+Salmonella-bakt%E9riumok+tetraciklinrezisztenci%E1j%E1nak+%E9s+virulenci%E1j%E1nak+horizont%E1lis+terjed%E9s%E9ben>. Accessed 6 Dec 2024
48. Fekete PZ, Brzuszkiewicz E, Blum-Oehler G, Olasz F, Szabó M, Gottschalk G, Hacker J, Nagy B (2012) DNA sequence analysis of the composite plasmid pTC conferring virulence

and antimicrobial resistance for porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 302:4–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.07.003>

49. García V, Gambino M, Pedersen K, Haugegaard S, Olsen JE, Herrero-Fresno A (2020) F4- and F18-Positive Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates from Diarrhea of Postweaning Pigs: Genomic Characterization. *Applied and Environmental Microbiology* 86:e01913-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01913-20>
50. Do K-H, Seo K, Lee W-K (2022) Antimicrobial resistance, virulence genes, and phylogenetic characteristics of pathogenic *Escherichia coli* isolated from patients and swine suffering from diarrhea. *BMC Microbiol* 22:199. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02604-z>
51. Frontiers | En Route towards European Clinical Breakpoints for Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing: A Position Paper Explaining the VetCAST Approach. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.02344/full>. Accessed 6 Dec 2024

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Biksi Imrének, hogy lehetőséget adott a Haszonállat Diagnosztikai Központban a kutatásunknak. Szeretném nagyon megköszönni a témavezetőmnek, Dr. Albert Ervinnek az elmúlt két és fél év során a rengeteg segítséget és türelmet amit kaptam; a teljes állói labor személyzetének, Csutka Editnek, Zahorecz Mónikának, Vu Ágnesnek, Varga Tündének, Dr. Kis István Emilnek, Dr. Kiss Krisztiánnak a technikai támogatást, és a számtalan ebédlőasztal feletti beszélgetést, amivel színesítették a laborban töltött napjaim. Hatalmas élmény volt veletek dolgozni!



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Szentgyörgyi Virág

Neptun-kódja: CL59MS

A témavezető neve és beosztása: Dr. Albert Ervin, egyetemi adjunktus

Tanszék: Patológia

A diplomadolgozat címe: Malacokból izolált Escherichia coli törzsek virulencia génjeinek és fenotípusos antibiotikum érzékenységének passzív surveillance adatokon alapuló vizsgálata

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	9	9	Téma egyeztető	
2.	2023	10	24	Téma módosítás - AMR	
3.	2023	11	17	Konzultáció	
4.	2023	11	23	Konzultáció	
5.	2023	12	4	Konzultáció	

Érdemjegy az első félév végén: *jelas (5)*

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2024	3	6	Konzultáció	
2.	2024	3	18	Konzultáció	
3.	2024	5	15	Konzultáció - ECOFF	
4.	2024	8	19	Konzultáció	
5.	2024	8	28	Konzultáció	

Érdemjegy a második félév végén: *jelas (5)*

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



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

A diplomamunka befogadható, védeésre alkalmasnak találtam.

.....
témavezető aláírása

Hallgató aláírása:

Tanszéki előadó aláírása: Átvétel dátuma: