

**Szent István Egyetem**  
**Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**Multirezisztens *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia  
és virulencia génjeinek molekuláris epidemiológiai  
elemzése**

PhD értekezés

Szmolka Annamária (Ama)

MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete

2011

Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....  
Prof. Dr. Nagy Béla  
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete, Budapest  
témavezető

.....  
Prof. Dr. Tuboly Tamás  
SZIE Állatorvos-tudományi Kar, Budapest  
konzulens

.....  
Dr. Fekete Péter Zsolt  
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete, Budapest  
konzulens

.....  
Dr. Imre Ariel  
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézete, Budapest  
konzulens

Készült 8 példányban. Ez az 1. sz. példány.

.....  
Szmolka Annamária (Ama)

# Tartalomjegyzék

<b>Gyakoribb rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>6</b>
<b>Összefoglalás .....</b>	<b>7</b>
<b>Általános bevezetés .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Irodalmi áttekintés és célok</b>	
1.1. Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia .....	10
1.2. A patogenitás és virulencia .....	11
1.3. Az antibiotikum rezisztencia és virulencia tulajdonságok kapcsolatának lehetőségei.....	13
1.4. Célok .....	15
<b>2. A tet(A) plazmidok szerepe az antibiotikum rezisztencia (és virulencia) gének átadásában, választott sertések hasmenéséből izolált, multirezisztens enterotoxikus <i>Escherichia coli</i> (ETEC) törzsekben</b>	
2.1. Bevezetés.....	16
2.2. Anyagok és módszerek.....	18
2.2.1. Hazai és külföldi sertés ETEC törzsek .....	18
2.2.2. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok és a tetraciklin rezisztencia ( <i>tet</i> ) gének kimutatása .....	18
2.2.3. Plazmid transzfer vizsgálatok .....	20
2.2.4. Plazmid profil vizsgálatok és a replikon típus meghatározása .....	21
2.2.5. Antibiotikum rezisztencia és virulencia gének kimutatása.....	21
2.2.6. Az 1-es típusú integron jellemzése.....	22
2.3. Eredmények .....	23
2.3.1. Különböző geográfiai eredetű ETEC törzsek antibiotikum rezisztencia fenotípusa.....	23
2.3.2. A tet tetraciklin rezisztencia gének és mintázataik eloszlása az ETEC törzsekben.....	24
2.3.3. Tetraciklin rezisztens ETEC szülő és transzkonjugáns törzsek plazmid profilja és replikon típusa .....	25
2.3.4. A tet(A) gént hordozó IncI1 plazmidok antibiotikum rezisztencia és virulencia génmintázata .....	26
2.4. Megbeszélés .....	28
<b>3. Haszonállatokból és humán mintákból izolált gentamicin rezisztens <i>E. coli</i> törzsek rezisztencia és virulencia genotípusa</b>	
3.1. Bevezetés.....	33
3.2. Anyagok és módszerek.....	35
3.2.1. A gentamicin rezisztens <i>E. coli</i> törzsek eredete és előzetes PCR vizsgálatok .....	35
3.2.2. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok .....	37
3.2.3. A vizsgált <i>E. coli</i> törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia genotípusának meghatározása .....	37

3.2.4. A PCR microarray adatainak statisztikai elemzése .....	38
3.3. <i>Eredmények</i> .....	39
3.3.1. A gentamicin rezisztencia gyakorisága, és a hazai haszonállatokból és humán mintákból izolált gentamicin rezisztens <i>E. coli</i> törzsek gentamicin rezisztencia génjei .....	39
3.3.2. Állati és humán eredetű gentamicin rezisztens <i>E. coli</i> törzsek antibiotikum rezisztencia fenotípusa .....	40
3.3.3. Állati és humán eredetű gentamicin rezisztens <i>E. coli</i> törzsek antibiotikum rezisztencia genotípusa .....	41
3.3.4. Állati és humán eredetű gentamicin rezisztens <i>E. coli</i> törzsek virulencia genotípusa .....	45
3.3.5. Pozitív korrelációt mutató antibiotikum rezisztencia és virulencia gének a gentamicin rezisztens <i>E. coli</i> törzsekben .....	48
3.4. <i>Megbeszélés</i> .....	50
<b>4. A <i>qnrS1</i>, plazmidon kódolt kinolon rezisztencia gén azonosítása és kinolon rezisztenciát hordozó plazmidok jellemzése sertés eredetű multirezisztens <i>E. coli</i> törzsekben</b>	
4.1. <i>Bevezetés</i> .....	55
4.2. <i>Anyagok és módszerek</i> .....	57
4.2.1. Mintavételezés .....	57
4.2.2. A <i>qnrS</i> gént tartalmazó <i>E. coli</i> törzsek azonosítása .....	57
4.2.3. A kiválasztott sertés eredetű <i>qnrS1 E. coli</i> törzsek antibiotikum rezisztencia fenotípusának és virulencia génjeinek jellemzése .....	59
4.2.4. Multilókusz szekvencia tipizálás (MLST).....	59
4.2.5. Plazmid profil vizsgálatok és a <i>qnrS1</i> plazmidok jellemzése .....	59
4.2.6. PCR alapú replikon tipizálás.....	60
4.2.7. Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus analízis (RFLP) és Southern hibridizáció .....	60
4.2.8. A <i>qnrS1</i> inszert klónozása és szekvenálása .....	61
4.3. <i>Eredmények</i> .....	62
4.3.1. A <i>qnrS1</i> gén kimutatása és a vizsgált sertés <i>E. coli</i> törzsek klonális kapcsolata.....	62
4.3.2. A <i>qnrS1 E. coli</i> törzsek antibiotikum rezisztencia fenotípusa és virulencia génjei .....	62
4.3.3. A <i>qnrS1 E. coli</i> törzsek plazmid profilja és a <i>qnrS1</i> gént hordozó IncN plazmidok jellemzése .....	63
4.3.4. A <i>qnrS1</i> gén genetikai környezete a pINF5 plazmid megfelelő régiójával homológ .....	66
4.4. <i>Megbeszélés</i> .....	68
<b>Záró megbeszélés .....</b>	<b>71</b>
<b>I. A multidrog rezisztens sertés ETEC törzsek <i>tet(A)</i> plazmidjainak sajátosságai .....</b>	<b>71</b>
<b>II. Gentamicin rezisztens <i>E. coli</i> törzsek – multidrog rezisztencia / virulencia genotípusok jellemzése .....</b>	<b>73</b>

<b>III. A qnrS1 kinolon rezisztencia plazmidok jellemzése sertés eredetű kommenzalista <i>E. coli</i> törzsekben .....</b>	<b>75</b>
<b>Új tudományos eredmények és megállapítások .....</b>	<b>77</b>
<b>Irodalomjegyzék .....</b>	<b>79</b>
<b>A doktori kutatás eredményeit tartalmazó közlemények és konferencia anyagok .....</b>	<b>93</b>
<b>A doktori kutatás témájához közvetlenül nem kapcsolódó eredmények közlései .....</b>	<b>94</b>
<b>Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>95</b>

## Gyakoribb rövidítések jegyzéke

BTK:	brómtimolkékes agar
ESBL:	kiterjedt spektrumú $\beta$ -laktamáz
ETEC:	enterotoxikus <i>Escherichia coli</i>
Gen <sup>R</sup> :	gentamicin rezisztens
Inc:	inkompatibilitási csoport
IS:	inszerciós szekvencia
LB:	Luria-Bertani tápleves
MDR:	multidrog rezisztencia (multirezisztencia)
MIC:	minimális gátló koncentráció
MLST:	multilókuszos szekvencia tipizálás
PBRT:	PCR alapú replikon tipizálás
PCR:	polimeráz láncreakció
RFLP:	restrikciós fragmenthossz polimorfizmus
SPATE:	szerin proteáz autotranszporter rendszer
ST:	szekvencia típus
T3SS:	hármastípusú szekréciós rendszer
Tn:	transzpozon
TSB:	tripton szója tápleves
TSL:	toxin specifikus lókuszos

## Összefoglalás

„Multirezisztens *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia génjeinek molekuláris epidemiológiai elemzése” c. értekezésemben a tetraciklin, a gentamicin és a plazmidon kódolt kinolon rezisztencia hármastémakörére építve, feladatainkat elsősorban az állati és humán eredetű, kommenzalista illetve kórokozó *E. coli* baktériumok antibiotikum rezisztencia és virulencia génmintázatainak jellemzése és e gének közötti esetenkénti kapcsolatok molekuláris epidemiológiai szemléletű elemzése képezte.

Közelebbi célunk volt:

1. Sertések választási hasmenése kapcsán izolált multirezisztens enterotoxikus *E. coli* (ETEC) törzsek virulencia/rezisztencia gén-, és plazmid analízise által a tetraciklin rezisztenciát közvetítő *tet(A)* plazmidok szerepének vizsgálata az antibiotikum rezisztencia (és virulencia) gének átadásában.
2. Haszonállatokból és humán mintákból származó aminoglikozid (gentamicin) rezisztens klinikai és kommenzalista *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia genotípusainak minél átfogóbb jellemzése.
3. Plazmidon kódolt kinolon rezisztencia (és esetlegesen társult virulencia) gének kimutatása, és a kinolon rezisztenciát hordozó plazmidok jellemzése, egészséges sertésekből származó, kommenzalista multirezisztens *E. coli* törzsekben.

A korábban, csoportunk által részletesen tanulmányozott, tetraciklin rezisztenciáért (*tet(B)*) és enterotoxigenitásért felelős pTC plazmid jellemzése után jelen munka keretében egy magyar és egy cseh sertés eredetű F18<sup>+</sup> ETEC törzs *tet(A)* gént hordozó konjugatív plazmidjainak részletes elemzését nemzetközileg elsőként végeztük el. A fenti ETEC törzsek eltérő méretű, IncI1 típusú *tet(A)* plazmidjai multirezisztenciát és sajátos elrendezésű 1-es típusú integront hordoztak, ismert virulencia génekkel viszont nem társultak.

Nagy áteresztőképességű PCR-microarray rendszerekben, összesen ~130 rezisztencia és virulencia gén mintázata alapján emberben és élelmiszertermelő állatokban előforduló klinikai és kommenzalista *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia gén rezervoár szerepéről, és ezen belül egyes rezisztencia és virulencia gének együttes előfordulásáról nemzetközileg elsőként szolgáltatunk összehasonlító genotipizálási adatokat.

Végül, elsőként mutattuk ki a sertés eredetű *E. coli* törzsek plazmidon közvetített kinolon rezisztenciáját Európában, és nemzetközi elsőséggel jellemeztük a *qnrS1* gént hordozó plazmidot háziállatokban. A *qnrS1*-pozitív sertés *E. coli* törzsek három olyan MLST klónját írtuk le, melyeket eddig sertések között nem ismertünk.

## Általános bevezetés

Értekezésem a fenti cím jegyében végzett eddigi munkáim összefoglalását adja. Ezen munkák részben az elmúlt évek során témacsoportunkban végzett ilyen irányú kutatások szerves folytatását képezik, részben pedig azokra épülő későbbi, EU FP6 pályázati munkaprogramokból (EuroPathoGenomis, MedVetNet) az elsősorban rám háruló feladatok teljesítését tükrözik. Az itt tárgyalt, egymással összefüggésben, de nem feltétlen szoros kapcsolatban lévő feladatok az *E. coli* baktériumok bizonyos antibiotikum rezisztencia és virulencia génjeinek esetenkénti kapcsolataira irányultak, mely kérdések témacsoportunkat legalább két évtizede foglalkoztatják, bár ezen gondolatkör csak a legutóbbi időkben kezdett nemzetközi szinten is megfelelő figyelmet kapni. Ezért törekednünk kellett arra, hogy céljaink meghatározásában a saját szakmai logikánk által diktált és a nemzetközi konzorciumi szereposztásban vállalt feladatokat össze tudjuk egyeztetni. Ennek eredményeként a dolgozat alapjául szolgáló munkámat végül a tetraciklin-, a gentamicin-, és a plazmidon kódolt kinolon rezisztencia hármas témaköre építettem, mely témakörök a történeti és technikai adottságoktól függően eltérő megközelítéssel, de egyazon fő kérdésre igyekeztek választ adni: nevezetesen, hogy az antibiotikumok humán-, és állategészségügyi alkalmazása során bekövetkező szelekciós nyomás jelentheti-e a rezisztenciával együtt a virulencia tulajdonságok fokozott térnyerését is?

A kérdésre itt mindjárt annyiban lehet megnyugtatóan válaszolni, hogy egyes esetekben igen, általában és egyelőre azonban nem. Eddigi munkáink során ugyanis a humán-, és állategészségügyi szempontból kiemelten fontos virulencia és rezisztencia gének/csoportok együttes térnyerésére utaló és általánosan érvényesülő tendenciával nem találkoztunk.

Az értekezés szerkezetét illetően, a fenti témakörök eltérő jellegzetességeire való tekintettel, témavezetőmmel egyetemben úgy véltük, hogy helyesebb a disszertációt a jól meghatározható témákra építeni, és az egyes témákat az európai egyetemeken szokásos disszertációs formáknak megfelelően, „Irodalmi bevezető”, „Módszerek”, „Eredmények”, „Megbeszélés” alcímekre bontva részletesen bemutatni. Ennek megfelelően a jelen disszertáció irodalmi ismertetője a tudományos előzmények részleteibe nem bocsátkozik, mert azokat az egyes fejezeteknél specifikusan kívánja ismertetni. Ehhez hasonlóan az értekezést a három fő téma harmoniáját bemutató egységes, rövid megbeszéléssel tervezem zárni.

A jelen „Általános bevezetés” fejezet végére kívánkozok még az alábbi két stilisztikai megjegyzés:

- A fenti vizsgálatokról szóló munkáim döntő többségét mint első szerző természetesen magam végeztem, de mivel számos területen és fázisban igényeltem és kaptam



nélkülözhetetlen segítséget mindazoktól, akik az eddig publikált és a közeljövőben megírandó közleményekben társzerzőim és azok köszönetnyilvánításában felsorolt munkatársaim voltak, helyesebbnek láttam, ha disszertációmban az egyes szám első személy használatát mellőzöm, s e helyett állításaimat többes szám első személyben fogalmazom meg.

- Az értekezésemben a szakkifejezéseket az „Orvosi Helyesírási Szótár” (Akadémiai Kiadó, Budapest, 1992) alapján, magyaros írásmódban igyekeztem szerepeltetni.

## 1. Irodalmi áttekintés és célok

A dolgozat címe által jelzett téma elsődlegesen az *E. coli* baktériumok antibiotikum rezisztenciájának, s ezen belül is túlnyomóan a rezisztenciáért felelős gének és ezek által szabályozott, egyes rezisztencia mechanizmusok és az esetenként társult virulencia gének tanulmányozását, molekuláris epidemiológiai szemlélettel ígéri. Ennek megfelelően, bármennyire lehetetlen vállalkozásnak tűnik is, röviden szükséges áttekinteni az idevonatkozó legfontosabb eddigi ismereteinket ahhoz, hogy a címben megjelölt feladatok ismertetésére rátérhessünk.

### 1.1. Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia

Az *E. coli* baktériumok antibiotikum rezisztencia tulajdonságaira és ezeket kódoló génekre vonatkozó több kézikönyvnyi áttekintésekből itt csupán annyit szükséges rögzíteni, hogy különböző hatásmechanizmusú szerek széles skáláján aligha találunk olyan vegyületet, mely ellen az *E. coli* baktérium ne tudna előbb vagy utóbb, megfelelő rezisztenciára szert tenni. Ennek alapvető oka a baktérium hallatlan genetikai flexibilitása, mely képessé teszi a legkülönbözőbb extrakromozómális rezisztencia mechanizmusok (efflux pumpák, antibiotikum hatásától védő és/vagy azt lebontó enzimek) génjeinek felvételére, valamint kromozómális (DNS ill. rRNS) mutációkon keresztül a megfelelő genetikai tulajdonságok kialakítására.

A fentiek alapján nem csoda, ha az egyre általánosabbá váló széles hatásspektrumú antibiotikumok humán-, és állatgyógyászati alkalmazásának következtében mind a patogén, mind pedig a normál bélflóra kommenzalista *E. coli* baktériumai között egyidejűleg több antibiotikummal szembeni multidrog rezisztencia (MDR) is egyre gyakoribbá válik és okoz esetenként súlyos klinikai komplikációkat. Tekintettel arra, hogy az állatok gyógykezelése (korábban pedig a ma már tiltott preventív kezelése) a rezisztenssé tett állati eredetű *E. coli* törzseket az élelmiszeren keresztül az ember bélcsatornájába juttathatja, az EU 2003-as ún. zoonózis rendelete alapján az egyes enterális zoonózisokat okozó baktériumokat (VTEC, *Salmonella*, *Campylobacter*), valamint az indikátor (kommenzalista) *E. coli* törzseket rendszeres és kötelező antibiotikum rezisztencia ellenőrzésnek kell alávetni (EC 2003a).

## 1.2. A patogenitás és virulencia

Az *Escherichia coli* baktériumokat, mint a normál humán bélflóra alkotóit ismertük meg, de Escherich (1855) már felfedezésükkor jelezte, hogy egyes esetekben, pl. leánygyermek hűgyúti megbetegedései kapcsán, kóros folyamatok elindítói és fenntartói is lehetnek. Az elmúlt évszázadban az *E. coli* kutatások többsége elsősorban arra a kérdésre kereste a választ, hogy mi a különbség a patogén és a kommenzalista (normál béllakó) törzsek között. A korábbi évtizedekben a központi kérdés az volt, hogy milyen antigén tulajdonságok (O:, K:, H: és/vagy fimbria antigének) jellemzik a megbetegedések kapcsán szintenyészetben a szokásos előfordulás helyétől (vastagbélből) távoli szervekből vagy vérből izolált *E. coli* törzseket a kommenzalista törzsektől.

A klasszikus szerotipizálási vizsgálatok kezdetben, egyes súlyosabb megbetegedések vagy járványok esetében, járványtani, klinikai valamint diagnosztikai elemzésekkel és kísérleti állatfertőzésekkel alátámasztva segítették és még ma is hatékonyan segítik az egyes szerotípusok kórokozóként való azonosítását. E témában (Orskov, Orskov 1984) az elmúlt évszázad második felében tudománytörténeti jelentőségű munkásságot fejtett ki Ida és Fritz Orskov, a koppenhágai „Statens Serum Institut” (SSI) *E. coli* Referencia Laboratóriumának (WHO) két kiemelkedő egyénisége.

Az utóbbi néhány évtizedben azonban egyre inkább előtérbe került a kórképek kialakulásáért felelős és a kórokozó képesség érvényesülését segítő *E. coli* virulencia faktorok ismeretének jelentősége. Az idevonatkozó kutatások eredményei lényegesen átalakították/átalakítják az *E. coli* diagnosztikáról és az esetleges immunprofilaxisról alkotott elképzeléseket is. Az e téren működő egyes kutatócsoportok rendszerint attól függően találtak különböző virulencia faktorokat (legtöbbször toxinokat, vagy adhéziós ill. inváziós fehérjéket), hogy mely kórképek vizsgálatát célozták meg.

Bár az *E. coli* baktériumok kórokozó képességére vonatkozó ismeretek folyamatosan bővülnek, a szakirodalom mára kellően egységes a tekintetben, hogy a béllakó (intestinalis) patogén törzsek között vannak verotoxikus/enterohaemorrhagiás *E. coli* (VTEC/EHEC), enterotoxikus *E. coli* (ETEC), enteropatogén *E. coli* (EPEC), enteroaggregatív *E. coli* (EAEC), enteroinvasív *E. coli* (EIEC) patotípusú törzsek, míg a bélcsatornán kívüli (extraintestinalis) patogén törzsek képesek a gazdaszervezetnek a számukra megszokott miliójából, a bélcsatornából kilépve is megtalálni/megteremteni a szaporodásukhoz és patogenitásuk kifejtéséhez szükséges feltételeket. Utóbbiak eddig ismert patotípusai az uropatogén *E. coli* (UPEC), a szeptikémiát okozó *E. coli* (ExPEC), vagy szarvasmarhákban a mastitist okozó *E. coli*. E két – intestinalis és extraintestinalis – patogén csoport között helyezkedik néhány olyan ún. citotoxikus, pl. a citoletális distending toxint (CDT) vagy a citotoxikus nekrotizáló faktort (CNF) termelő *E. coli* (NTEC) törzs, melyek szokásos helye a

bélcsatorna, de nem egyszer jelennek meg azon kívüli, egyes szervekben (pl. húgyutakban, lépben, májban) vagy a vérpályában, tályogokban is.

Mindezen patotípusok és jellemző virulencia faktoraik részletes ismertetése messze túlmenne a bevezető feladatán, ezért ehelyütt az ún. patogén *E. coli*-ra vonatkozó kézikönyvi adatokra kell hagyatkoznunk (Elsinghorst 2002), melyekből az az általános kép rajzolódik ki, hogy a fenti kórokozó képességeikért felelős virulencia faktorok túlnyomó többségét plazmidon-, vagy a kromoszómába épült fágokon-, ill. profágokon kódolt gének szabályozzák, melyek a horizontális géntranszfer eredményeként bizonyos típusú törzsekben könnyebben és nagyobb gyakorisággal, másokban pedig ritkábban honosodnak meg, s teszik azokat többé-kevésbé patogénné. Itt külön ki kell térnünk az ún. a patogenitási szigetekre (PAI), melyek a virulencia gének átvitelének és új virulencia mintázatok kialakításának egy nemrég felfedezett „eszközét” képviselik (Hacker et al. 1997). A „patogenitási szigeteket” általában jellemzi: i) egy vagy több virulenciafaktor (adhezin, toxin, invazin, stb.) génjének jelenléte, ii) a kórokozó törzsek genomjában jelen vannak, de hiányoznak az ugyanazon baktériumfaj nem patogén törzseiből, iii) nagyméretű genomiális régiókat fednek le, méretük 10 kb-tól egészen 200 kb-ig terjedhet (Hacker, Kaper 1999). A mobilis genetikai elemekre jellemzően a patogenitási szigetek instabil régiók: átvitelük és/vagy deléciójuk könnyen bekövetkezhet az „azonos irányultságú” ún. direct repeat (DR) végek, vagy más mobilis genetikai elemek segítségével, de az átviteli folyamatokban kojugatív plazmidok, transzpozonok valamint bakteriofágok is szerephez juthatnak. Patogenitási szigeteket először UPEC törzsekben írtak le, később azonban több enterális *E. coli* patotípusról (pl. EPEC és EHEC), valamint egyéb baktériumfajról (*Salmonella*, *Shigella*) is kiderült, hogy a virulenciagénjeik ilyen PAI formában helyezkednek el a kromoszómán (Hacker, Kaper 1999), vagy plazmidon (Fekete et al. 2003).

Nem szabad azonban elfelejtenünk azt a gyakorlatban is ismert ténytet, hogy mint sok más baktérium, az ún. patogén *E. coli* is csak fakultatív kórokozó. Megbetegítő képessége nem csupán a virulencia faktorok jelenlétének és azok expressziójának függvénye, hanem e képesség kifejtéséhez szükséges a megfelelő csíraszám és a megfelelően hajlamosított szervezet is. A hajlamosság pedig a genetikai adottságoktól (receptorokat, vagy elsődleges immunválasz képességet szabályozó génektől) kezdve az életkor, a táplálkozás és a különböző helyi vagy általános predispozíciós tényezők, társfertőzések függvénye lehet.

Emellett egyre többen véljük úgy, hogy bár a patogén és kommenzalista *E. coli*, mint két véglet, a klinikai diagnosztikában nélkülözhetetlen támpontot jelent, közöttük azonban egy széles „szürke zóna” lehet, melynek patogenitási- és virulencia skáláján az egyes törzsek helyét a virulencia gének mennyiségi, minőségi és expressziós viszonyai határozzák meg.

Így a kórokozó vagy kommenzalista *E. coli* kérdésben éles határt vonni egyelőre nem lehet (Köhler, Dobrindt 2011). A disszertációban ismertetett vizsgálataink egy része épp e kérdésben való eligazodást igyekszik segíteni.

### **1.3. Az antibiotikum rezisztencia és virulencia tulajdonságok kapcsolatának lehetőségei**

Mivel az antibiotikum rezisztencia gének jelentős része mobilis genetikai elemek (plazmidok, transzpozonok, inszerciós (IS) elemek, integronok) révén jut a rezisztens baktériumokból az adott antibiotikummal szemben érzékenyekbe, nagyon fontos, hogy a szerzett rezisztenciát meghatározó géneket és azok környezetét minél jobban megismerjük, s esetleges terjedésükről mielőbb információt szerezzünk. Fontos ez annál is inkább, mert egyes esetekben a rezisztencia és virulencia determinánsok ugyanazon plazmidon, vagy netán egyéb mobilis genetikai elem (pl. genomi szigeten) együttesen is jelen lehetnek, bár az utóbbiról egyelőre tényleges bizonyítékunk még nincs, s általában e két eltérő kategóriát képviselő gének kapcsolatát a legutóbbi ideig nem tették vizsgálat tárgyává.

A rezisztencia és virulencia gének fent vázolt együttes hordozásának egyik általunk részletesen vizsgált példáját szemlélteti a nemrég teljes szekvencia szinten elsőként ismertetett pTC plazmid, mely a választott sertések hasmenését okozó, F18<sup>+</sup> ETEC törzsekre jellemző enterotoxin plazmidok prototípusa (Fekete et al. 2012). A pTC plazmid a tetraciklin rezisztenciát a *tet(B)* génen, az enterotoxin (STa, STb) termelő képességet pedig egy PAI-szerű ún. toxin specifikus lókuszon (TSL) kódolja (Fekete et al. 2003). Nem tudjuk még azonban, hogy ez az ún. hibrid prototípus plazmid a hazai és környező országbeli sertés ETEC törzsek között valójában mennyire elterjedt és mennyire változóképes. Jelenleg nem ismert az sem, hogy az egyéb, nem-*tet(B)* osztályt képviselő, de igen gyakori (pl. *tet(A)*) típusú tetraciklin rezisztencia gént közvetítő) plazmidok jelentősége a virulencia és egyéb rezisztencia gének hordozásában, hogyan ítélné meg.

A fent említett EU antibiotikum rezisztencia monitoring rendszer működtetése ezen túl, a gyakori és klinikai jelentőséggel bíró antibiotikum rezisztenciákra (pl. tetraciklin, aminoglikozid, kinolon rezisztencia) vonatkozóan olyan igényeket is felvet, melyek a rezisztencia fenotípus mellett - legalábbis az *E. coli* törzsek esetében - az adott antibiotikum rezisztencia-, vagy társult rezisztenciák genetikai hátterének meghatározására és esetleges virulencia génekkel való kapcsolatára vonatkoznak. Ezen szemlélet mentén témacsoportunk egy, a zoonózisok kutatására irányuló EU projekt keretében ezen igények legalább részbeni kielégítésére és a felmerülő kérdések megválaszolására vállalkozott úgy, hogy kiindulási

alapnak a MDR-val jellemezhető *E. coli* törzseket választotta és igyekezett ezekről az élelmiszerlánc egyes pontjain molekuláris epidemiológiai adatokat gyűjteni.

Adatgyűjtési munkáink során felmerült az a gondolat is, hogy a már régebb óta kialakult tetraciklin és aminoglikozid (közelebbről gentamicin) rezisztenciák genetikai háttere mellett vizsgálatokat végezzünk a hazánkban és/vagy szomszédainknál újabban előtérbe kerülő (emerging) kinolon rezisztenciákkal kapcsolatban is, melyek plazmidon kódoltak is lehetnek és mint ilyenek a tetraciklin rezisztenciához hasonlóan, a választott sertésekben, mint antibiotikumokkal leggyakrabban kezelt élelmiszertermelő gazdasági állatokban leginkább előfordulhatnak.

## 1.4. Célok

A fenti indokok alapján a további három fő fejezetben részletezendő vizsgálatainkat a tetraciklin-, a gentamicin-, és a plazmidon kódolt kinolon rezisztencia témakörökben az alábbi főbb célokkal és címek alatt végeztük:

1. A *tet(A)* plazmidok szerepe az antibiotikum rezisztencia (és virulencia) gének átadásában választott sertések hasmenéséből izolált, multirezisztens enterotoxikus *E. coli* (ETEC) törzsekben.
2. Haszonállatokból és humán mintákból izolált aminoglikozid (gentamicin) rezisztens klinikai és kommenzalista *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia genotípusa, egyes gének esetleges kapcsolt előfordulása.
3. Plazmidon kódolt kinolon rezisztencia és esetlegesen társult virulencia gének keresése és azonosítása: kinolon rezisztenciát hordozó plazmidok jellemzése egészséges sertések bélcsatornájából származó multirezisztens *E. coli* törzsekben.

## **2. A *tet(A)* plazmidok szerepe az antibiotikum rezisztencia (és virulencia) gének átadásában, választott sertések hasmenéséből izolált, multirezisztens enterotoxikus *Escherichia coli* (ETEC) törzsekben**

### **2.1. Bevezetés**

Sertésekben az enterotoxikus *Escherichia coli* (ETEC) baktériumok leggyakrabban két, gazdaságilag is jelentős kórképben, az újszülött- és a választott malacok hasmenésében játszanak szerepet. A választott malacok hasmenésének patomechanizmusában a virulencia faktoroké a főszerep: jellemző fimbriális adhezinjeik (K88/F4, F18) segítségével a baktériumok a vékonybél hámsejtjeihez tapadnak, majd hőstabil- (STa, STb, EAST1) és/vagy hőlabilis enterotoxinok (LT) termelésével a felszívó bélhámsejtek folyadékszekrécióját jelentősen serkentik, amely végül hasmenéshez vezet (Nagy, Fekete 1999).

Habár a sertés ETEC törzsek okozta megbetegedések csökkentése céljából számos intézkedés történt, kezdve a higiénia növelésétől a vakcinázásig (Haesebrouck et al. 2004), a fertőzés fékentartásának legrövidebb útja mindmáig az antimikrobiális kezelés maradt, amelynek elkerülhetetlen következménye az antibiotikum rezisztens törzsek szelekciója (Fairbrother et al. 2005). További problémát jelent a multidrog rezisztens (MDR) törzsek fokozott megjelenése, amelyek a megfelelő virulencia faktorokkal felfegyverkezve nemcsak a terápiás lehetőségeket korlátozhatják (Rosengren et al. 2009), de rezisztencia és virulencia gén rezervoárt képezhetnek a normál bélflóra kommenzalistái számára is (Mathew et al. 1999).

Az ETEC virulencia faktorok (adhezinek, enterotoxinok) génjei, valamint az antibiotikum rezisztencia gének - beleértve az ETEC szempontjából lényeges *tet* tetraciklin rezisztencia géneket is - többnyire plazmidokon helyezkednek el, további mobilitásukról egyéb mobilis genetikai elemek: integronok, transzpozonok, inszerciós (IS) elemek gondoskodnak. Ennek megfelelően a *tet(A)* gyakran a Tn1721 (Allmeier et al. 1992), a *tet(B)* pedig rendszerint a Tn10 (Lawley et al. 2000) transzpozonok részei. Az STa hőstabil enterotoxint kódoló *estA* gént a Tn1681 (So, McCarthy 1980), míg az STb termelésért felelős *estB* gént a Tn4521 transzpozonokon (Lee et al. 1985), illetve a pTC plazmid toxin-specifikus lókuszán (TSL) írták le (Fekete et al. 2003 és 2011). A további enterotoxin géneket és mobilitásukat illetően feltétlenül meg kell még említeni az *E. coli* enterotoxinok között elsőként felfedezett, a kolera toxinnal közeli rokonságban álló LT hőlabilis enterotoxint (LT) és ezt plazmidon kódoló *e/t* géneket, melyek esetében IS elem közvetített folyamatot ugyancsak leírtak (Schlör et al. 2000, Savarino et al. 1996). Itt jegyezzük meg, hogy a fenti, plazmidon kódolt enterotoxin



géneket a korábbiakban használt *sta*, *stb* és *lt* szimbólumok helyett újabban egyre gyakrabban használják a megfelelő *estA*, *estB* illetve *elt* jelöléseket, ennek megfelelően értekezésemben ez utóbbi génszimbólumokat használom. Az ETEC törzsek STa enterotoxinja egyébként nem tévesztendő össze az elsőként humán enteroaggregatív *E. coli* (EAEC) törzsekben kimutatott EAST1 toxinnal. Ez utóbbi szintén hőstabil, kis molekulájú, toxin, melyet a kromozómálisan vagy plazmidon elhelyezkedő *astA* gén kódol, s a fenti STa toxintól biológiai, immunológiai és genetikai próbákkal is jól elkülöníthető (Veilleux, Dubreuil 2006). Az *astA* génnel gyakorlatilag azonos allélt a D27-es (O126:NM, CFA/II, STIb) humán ETEC törzs 97Md plazmidján egy újonnan leírt IS1414 elembe ágyazva, a jól ismert humán ETEC H10407 törzssel egyetemben írtak le (McVeigh et al. 2000).

Esetenként a tetraciklin rezisztencia és virulencia gének ugyanazon a plazmidon helyezkednek el. Ilyen tipikus hibrid sertés ETEC plazmidok a *tet(A)-estA-paa-sepA-1* génkombinációt tartalmazó pTENT2 (Goswami et al. 2008) valamint a *tet(B)-sta-stb* génekkel jellemzett pTC plazmid (Fekete et al. 2011). Ez utóbbi plazmid egy magyarországi választási hasmenésben elhullott sertés vékonybeléből izolált ETEC törzsre (Ec 2173) és ehhez hasonló magyarországi ETEC izolátumokra volt jellemző (Nagy et al. 1990, Fekete et al. 2003). Azóta sikerült a *tet(B)* gént hordozó pTC plazmid teljes szekvenciáját is meghatározni (Fekete et al. 2012), melynek alapján tudjuk, hogy ennek legfőbb jellegzetessége a virulenciáért felelős STa és STb enterotoxinok génjeit hordozó TSL, mely együtt jár a *tet(B)* tetraciklin rezisztenciagént hordozó Tn10 transzpozonnal. Ugyanakkor nem tartalmaz egyéb antibiotikum rezisztencia géneket vagy azok hordozására alkalmas integronokat.

Ezek után fölmerült a kérdés, hogy egy másik ugyancsak gyakori, efflux proteint kódoló tetraciklin rezisztencia gén, a *tet(A)* vajon milyen gyakorisággal, ill. geográfiai elterjedtséggel és milyen típusú plazmidokon található, sertés választási hasmenést okozó, jellegzetesen F18<sup>+</sup> ETEC törzsekben. Ez utóbbi, *tet(A)*-val jellemzett, ETEC plazmid csoportról azért is látszott érdemesnek többet megtudni, mert az eddigi vizsgálataink során előtérben álló *tet(B)*-hez képest jóval kevesebb figyelmet kapott. Ugyancsak megválaszolásra várt a kérdés, hogy a *tet(A)* plazmidokon milyen egyéb mobilis genetikai elemekkel (integronok, transzpozonok, patogénitási géncsoportok) számolhatunk, melyek alapján ezen plazmidoknak, bizonyos szelekciós nyomások hatására, az antibiotikum rezisztencia (és esetleges virulencia) terjesztésében molekuláris járványtani jelentősége lehet.

Jelen fejezetben foglalt munka fő célja, hogy sertések választási hasmenéséből izolált *E. coli* törzsek vizsgálatán keresztül a közép-európai régiót (Magyarország, Ausztria, Cseh Köztársaság) képviselő ETEC törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia génjeiről kapjunk összehasonlító adatokat, különös tekintettel a tetraciklin rezisztencia gének hordozásáért felelős plazmidokra, s ezekben található mobilis genetikai elemekre.

## **2.2. Anyagok és módszerek**

### **2.2.1. Hazai és külföldi sertés ETEC törzsek**

A jelen tanulmány vizsgálati anyagát képező összesen 87 *E. coli* törzset hazai és külföldi partner-laboratóriumok az elmúlt 10-15 évben izolálták választási hasmenéses állatok vékonybeléből, s határozták meg enterotoxikus *E. coli* (ETEC) törzseknek, elsősorban fimbriák (K88/F4 ill. F18) szerológiai kimutatása és O szerocsoportjuk meghatározása (Orskov, Orskov, 1984) alapján, melyeket a továbbiakban ismertetett virulencia gén kimutatási módszerekkel is megerősítettünk és kiegészítettünk. A hazai saját ETEC törzsek (n=16) mellett a törzsek egy része egyéb Közép-Európai országokból - Ausztria (n=34) és Cseh Köztársaság (n=17) - származott, míg 20 törzset az USA-ból kaptunk Dr. M.A. Awad, Dr. P. Alexa és Dr. H.W. Moon szívességének köszönhetően. A fenti ETEC törzseket -80°C-n 10% glicerint tartalmazó TSB táplevesben tároltuk. A vizsgálatban szereplő összesen 87 ETEC törzs közül a célszerűség kedvéért dolgozatomban kizárólag a konjugációs plazmid transzfer vizsgálatokra kijelölt törzsek geográfiai eredetét és genetikai jellemzőit ismertetem (II. táblázat).

### **2.2.2. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok és a tetraciklin rezisztencia (*tet*) gének kimutatása**

A 87 ETEC törzs antibiotikum rezisztencia fenotípusát korongdiffúziós módszerrel határoztuk meg az alábbiakban felsorolt 15 antibiotikummal (Oxoid) szemben mutatott gátlási zónák átmérője alapján: ampicillin (AMP-10), amoxicillin (AML-25), cefotaxim (CTX-30), klóramfenikol (C-30), enrofloxacin (E-5), flórfenikol (FFC-30), gentamicin (CN-10), kanamicin (K-30), nalidixinsav (NA-30), rifampicin (RD-5), spektinomycin (SH-100), streptomycin (S-10), szulfametoxazol (RL-25), tetraciklin (TE-30) és trimetoprim (W-5). Az antibiotikum rezisztencia fenotípus meghatározásánál a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) előírása alapján jártunk el, és a gátlási zóna átmérőket is ez alapján értékeltük ki (CLSI 2010). A korongdiffúziós vizsgálatokhoz referencia törzsként az ATCC 25922 *E. coli* törzset használtuk. Egy adott antibiotikumra a CLSI előírása szerint mérsékelten rezisztens törzseket érzékenyeknek tekintettük. Azon törzseket, amelyek egyidejűleg három vagy annál több antibiotikum csoporttal szemben mutattak rezisztenciát multidrog rezisztenseknek (MDR) nyilvánítottuk.

A fenotípusosan tetraciklin rezisztens ETEC törzseket további, a *tet* gén tipizálására irányuló PCR vizsgálatoknak vetettük alá. A PCR reakciókhoz használt primereket úgy választottuk ki, hogy azok a Gram-negatív enterális kórokozókra addig leírt leggyakoribb *tet* osztályokat képviseljék (I. táblázat).

**I. táblázat.** A tetraciklin és egyéb antibiotikum rezisztencia gének kimutatására, valamint az 1-es típusú integron jellemzésére használt primerek listája.

A tetraciklin rezisztencia gének írásmódja Levy et al. (1989) által javasolt nomenklaturát követi.

Antibiotikum csoport és gének	Primer	Szekvencia (5'→3')	PCR fragment (bp)	Módszer	Hivatkozás / Reakciókörülmények *
<u>Tetraciklin gének</u>					
<i>tet</i> (A)	tetA f	GGCCTCAATTTCTGACG	372	PCR	Guillaume et al. 2000
	tetA r	AAGCAGGATGTAGCCTGTGC			
<i>tet</i> (B)	tetB f	GAGACGCAATCGAATTCGG	228	PCR	Guillaume et al. 2000
	tetB r	TTTAGTGGCTATTCTTCTGCCC			
<i>tet</i> (C)	tetC f	TCCTTGCATGCACCATTCC	635	PCR	Guillaume et al. 2000
	tetC r	AACCCGTTCCATGTGCTCG			
<i>tet</i> (D)	tetD f	GGATATCTCACCGCATCTGC	436	PCR	Guillaume et al. 2000
	tetD r	CATCCATCCGGAAGTGATAGC			
<i>tet</i> (E)	tetE f	TCCATACGCGAGATGATCTCC	442	PCR	Guillaume et al. 2000
	tetE r	CGATTACAGCTGTCAGGTGGG			
<i>tet</i> (G)	tetG f	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	468	PCR	Frech, Schwarz 2000
	tetG r	AGCAACAGAATCGGGAACAC			
<u>Aminoglikozid gének</u>					
<i>aac</i> (3)-II	aacC2 f	GGCAATAACGGAGGCAATTCGA	698	PCR	Frana et al. 2001
	aacC2 r	CTCGATGGCGACCGAGCTTCA			
<i>aac</i> (6')-Ib	aac(6')Ib f	GTTACTGGCGAATGCATCACA	217	PCR	Frana et al. 2001
	aac(6')Ib r	TGTTTGAACCATGTACACGGC			
<i>ant</i> (2'')-Ia	aadB1 fw	GTTGGACTATGGATTCTTAGC	248	PCR	95°C*4' 30x(95°C*30" 56°C*30" 72°C*30") 72°C*7'
	aadB1 rv	GCCTGTAGGACTCTATGTG			
<i>aadA</i>	aadA fw	GTACGGCTCCGCACTGGATGG	193	PCR	95°C*4' 30x(95°C*30" 58°C*30" 72°C*30") 72°C*7'
	aadA rv	GATGATGTCGTATGCACG			
<i>strA</i>	strA fw	CCTGGTGATAACGGCAATTC	546	PCR/SQ	Rosengren et al. 2009
	strA rev	CCAATCGCAGATAGAAGGC			
<i>strB</i>	strB fw	ATGCTCAAGGGATTGAAACC	509	PCR	Rosengren et al. 2009
	strB rev	GGATCGTAGAACATATTGGC			
<u>β-laktám gének</u>					
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CTX-M f	CGATGTGCAGTACCAGTAA	585	PCR	Batchelor et al. 2003
	CTX-M r	TTAGTGACCAGAATCAGCGG			
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM f	CATTTTCGTGTCGCCCTTAT	793	PCR	Hopkins et al. 2007
	TEM r	TCCATAGTTGCCCTGACTCCC			
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV f	ATTTGTGCTTCTTTACTCGC	1018	PCR	Yagi et al. 2000
	SHV r	TTTATGGCGTTACCTTTGACC			
<u>Fenikol gének</u>					
<i>catA1</i>	catI f	AGTTGCTCAATGTACCTATAACC	680	PCR	Rosengren et al. 2009
	catI r	TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC			
<i>floR</i>	floR f	CGCCGTCATTCTCACCTTC	888	PCR	Rosengren et al. 2009
	floR r	GATCACGGGCCACGCTGTGTC			
<i>cmIA</i>	cmIA f	TTGCAACAGTACGTGACAT	293	PCR	Rosengren et al. 2009
	cmIA r	ACACAACGTGTACAACCAG			
<u>1-es típusú integron típusgének</u>					
<i>intI1</i>	intI1 f	GGGTCAAGGATCTGGATTTCG	483	PCR	Mazel et al. 2000
	intI1 r	ACATGGGTGTAATCATCGTC			
<i>qacEΔ1</i>	qac F	GGCTGGCTTTTTCTGTATTCG	273	PCR	Mazel et al. 2000
	qac R	TGAGCCCCATACCTACAAAGC			
<i>sul1</i>	sul1 f	TGGTGACGGTGTTCGGCATTTC	789	PCR/SQ	Sáenz et al. 2004
	sul1 r	GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG			
<u>Variábilis integron régió</u>	5CS-F1	ATGTTACGCAGCAGGGC	változó	PCR/SQ	Libisch et al. 2004
	3CS-R	GGAATTCGACCTGATAGTTGGCTGTG		PCR	
	sqpr 1 fw	CCTTGCCCTCCCACGATG		SQ	jelen tanulmány
	sqpr 2 rv	CACCACACCGCAGACGACATT		SQ	jelen tanulmány
	sqpr 3 fw	TGGCGAATCAACTCAGGTACTG		SQ	jelen tanulmány
	sqpr 4 fw	CAGAGGTAGTTGGCGTCATC		SQ	jelen tanulmány
	sqpr 5 fw	AAGGATGTCGCTGCCGACTG		SQ	jelen tanulmány

SQ: szekvenáláshoz használt primerek

\*: saját tervezésű primerekkel futó PCR reakció körülményei

### 2.2.3. Plazmid transzfer vizsgálatok

A Fekete et al. (2012) által jellemzett, *tet(B)*, *estA*, *estB* génkombinációt hordozó pTC plazmidok azonosítása, valamint egyéb tetraciklin rezisztencia (*tet*) és tipikus ETEC virulencia gének (*estA*, *estB*, *elt*, *f18*, *k88*) átvitelében szerepet játszó plazmidok jellemzése céljából, a tetraciklin rezisztens törzsek közül 8 *tet(A)* és 12 *tet(B)* ETEC törzset konjugációs vizsgálatokra jelöltünk ki. A kiválasztott 20 szülőtörzs geográfiai eredetét és genetikai jellemzőit a II. táblázat mutatja be. A törzsek szelekciójának alapjául szolgáló, a virulencia és tetraciklin rezisztencia génekre vonatkozó PCR eredmények Fekete et al. (2003) közleményből származnak. A korábbi eredményeinkkel való összehasonlítás érdekében fontos itt is megjegyezni, hogy míg korábban az STa, STb és LT enterotoxinok génjeit az *sta*, *stb*, *lt* szimbólumokkal jelöltük, jelen tanulmányban az újabban használt *estA*, *estB* illetve *elt* jelölések használatára tértünk át (Elsinghorst, 2002).

A konjugációs vizsgálatokhoz recipiens törzsként a plazmidmentes, rifampicin rezisztens *E. coli* K-12 J5-3 törzset használtuk. A transzkonjugáns törzsek szelekciója rifampicin (150 µg/ml) és tetraciklin (50 µg/ml) tartalmú LB (Luria-Bertani) agar lemezeken történt. A konjugációs gyakoriságot a transzkonjugánsok és recipiens törzsek telepszáma (CFU) közötti arányként határoztuk meg.

**II. táblázat.** A konjugációs plazmid transzfer vizsgálatokhoz kiválasztott ETEC törzsek geográfiai eredete és genetikai jellemzői.

Törzsek	Geográfiai eredet	O csoport	Enterotoxin gének			Adhezin gének		Tetraciklin rezisztencia gének						
			<i>estA</i>	<i>estB</i>	<i>elt</i>	<i>k88</i>	<i>f18</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(C)</i>	<i>tet(D)</i>	<i>tet(E)</i>	<i>tet(G)</i>	
2134	Magyarország	O157	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
2152	Magyarország	O157	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<b>2172</b>	Magyarország	O141	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
2185	Magyarország	O141	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
2188	Magyarország	O157	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<b>All.23</b>	Ausztria	O138	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<b>All.25</b>	Ausztria	O138	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<b>All.27</b>	Ausztria	nt	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<b>All.28</b>	Ausztria	O139	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-
<b>All.29</b>	Ausztria	O138	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
All.30	Ausztria	nt	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<b>All.34</b>	Ausztria	O138	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
All.41	Ausztria	nt	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
8813	Cseh Köztársaság	O147	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
9658	Cseh Köztársaság	O149	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9877	Cseh Köztársaság	O35	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
10176	Cseh Köztársaság	O141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11112	Cseh Köztársaság	O149	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
11674	Cseh Köztársaság	O108	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>11732</b>	Cseh Köztársaság	O141	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

A sikeres tetraciklin rezisztencia átvitelt mutató 8 ETEC törzset félkövér betűtípussal és aláhúzással emeltük ki.  
nt: nem tipizálható

#### 2.2.4. Plazmid profil vizsgálatok és a replikon típus meghatározása

A II. táblázatban is kiemelt, sikeres tetraciklin rezisztencia génátvitelt mutató magyar és cseh *tet(A)*- továbbá hat osztrák *tet(B)*-pozitív szülő törzset valamint összesen 9 transzkonjugánsukat további jellemzés céljából plazmid profil vizsgálatoknak, valamint antibiotikum rezisztencia és virulencia gének kimutatására irányuló PCR vizsgálatoknak vetettük alá. A szülő és transzkonjugáns törzsek plazmid profil vizsgálatát Kado, Liu (1981) módszere alapján végeztük el.

A két, *tet(A)* gént tartalmazó magyar és cseh transzkonjugáns (2172/11 és 11732/71) valamint szülő törzseik (2172 és 11732) plazmidjainak inkompatibilitási (Inc) csoportokba való besorolása PCR alapú replikon tipizálással (PBRT) történt, a Carattoli et al. (2005) által közölt primerekkel és reakciókörülményeknek megfelelően. A PBRT rendszer multiplex és simplex PCR vizsgálataihoz templátként szolgáló genomi DNS-t a GenElute™ Genomic DNA Kit (Sigma) gyártói útmutatójának megfelelően vontuk ki és tisztítottuk. A fenti közleményben megnevezett Inc csoportok mellett a replikon tipizálási vizsgálatokat a *colE*, *colE<sub>TP</sub>*, *IncU* és *IncR* replikon típusokra is kiterjesztettük (García-Fernández et al. 2009).

#### 2.2.5. Antibiotikum rezisztencia és virulencia gének kimutatása

A kiválasztott összesen 8 szülő törzsön és 9 transzkonjugánsukon az említettek szerint további jellemzés céljából antibiotikum rezisztencia és ETEC-re jellemzőnek ismert egyéb virulencia gének kimutatására irányuló vizsgálatokat is végeztünk. Az *estB* enterotoxin génre vonatkozóan, további PCR vizsgálatokkal az *estB* gén pTC-specifikus 5' határoló régiójának meglétére is rákerestünk. Az 1-es típusú integron hordozását az *intI1* integráz gén jelenléte alapján mutattuk ki. Az antibiotikum rezisztencia és virulencia géneket kimutató PCR reakciókhoz használt primerek szekvenciáit, valamint a PCR fragmentek várható méretét az I. és a III. táblázatok tartalmazzák. A *tet(A)* génnek a Tn1721 transzpozonon való lokalizációját szintén PCR segítségével mutattuk ki, a táblázatban feltüntetett *tetAf*, valamint a Tn1721-specifikus TetAR3 primerek felhasználásával, melynek szekvenciája 5'-GGCATAGGCCTATCGTTTCCA-3' (Hartman et al. 2003).

**III. táblázat.** A virulencia gének és az *estB* gén pTC-specifikus 5' határoló régiójának kimutatására használt primerek listája.

Gén/Régió	Primer	Szekvencia (5'→3')	PCR fragment (bp)	Hivatkozás
<i>estA</i>	sta fw	TTTCTGTATTATCTTTCCCC	167	Alexa et al. 1997
	sta rev	ATTACAACAAAGTTCACAGC		
<i>estB</i>	stb fw	TCTTCTGCATCTATGTTTCG	138	Alexa et al. 1997
	stb rev	TCTCTAACCCCTAAAAAACC		
<i>estB</i> 5' flanking	is1 rev	ACAGCGACTTCCGTCCAGCC	987	Fekete et al. 2003
	stb rev	TCTCTAACCCCTAAAAAACC		
<i>elt</i>	lt fw	TTACGGCGTTACTATCCTCTCTA	274	Alexa et al. 1997
	lt rev	GGTCTCGGTCAGATATGTGATTC		
<i>astA</i>	astA fw	TCGGATGCCATCAACACAGT	125	Boerlin et al. 2005
	astA rev	GTCGCGAGTGACGGCTTTGTAAG		
<i>f18</i>	f18 fw	GTGAAAAGACTAGTGTTTATTTTC	511	Imberechts et al. 1994
	f18 rev	CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC		
<i>k88</i>	k88 fw	GGTGATTTCAATGGTTCGGTC	764	Alexa et al. 1997
	k88 rev	AATGCTACGTTTCAGCGGAGCG		
<i>fanA</i>	fanA fw	AATACTTGTTTCAGGGAGAAA	230	Boerlin et al. 2005
	fanA rev	AACTTTGTGGTTAACTTCCT		
<i>fasA</i>	fasA fw	GTA ACTCCACCGTTTGTATC	409	Boerlin et al. 2005
	fasA rev	AAGTTACTGCCAGTCTATGC		
<i>paa</i>	paa fw	GGCCCGCATAACAGGCCTTG	282	Boerlin et al. 2005
	paa rev	TCTGGTCAGGTCGTC AATACTC		
<i>aidA-I</i>	AIDA fw	ACAGTATCATATGGAGCCA	585	Boerlin et al. 2005
	AIDA rev	TGTGCGCCAGAACTATTA		
<i>sepA</i>	sepA fw	TAAAACCCGCCGCTGAGTA	611	Boerlin et al. 2005
	sepA rev	TGCCGGTGAACAGGAGGTTT		

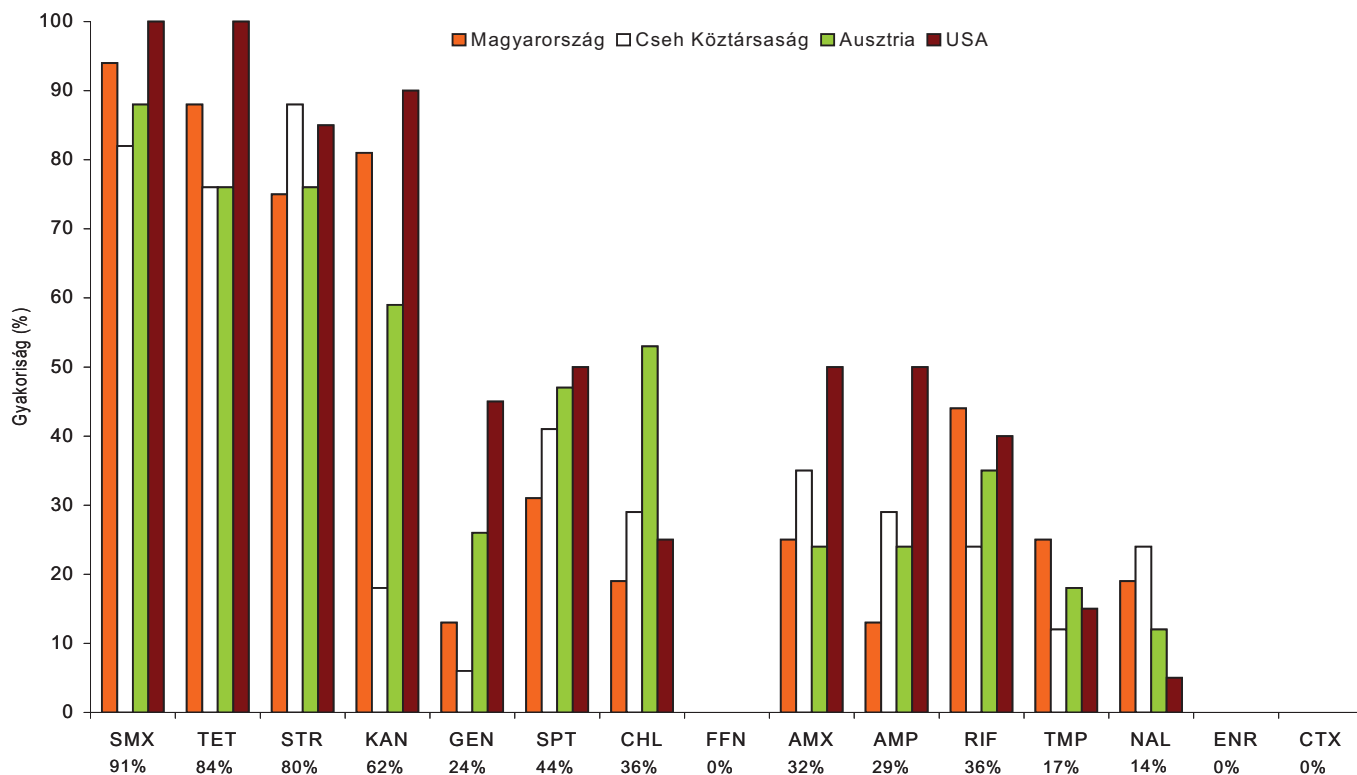
### 2.2.6. Az 1-es típusú integron jellemzése

Az egyplazmidos, *tet(A)*-pozitív 2172/11 jelű magyar transzkonjugáns törzsben az 1-es típusú integron 3' konzervatív régiójára jellemző *qacEΔ1* és *sul1* géneket további PCR reakciók segítségével mutattuk ki. Ezt követően a teljes variábilis régiót az 5'CS-F1 és a 3'CS-R primerpárral erősítettük fel (I. táblázat), majd a PCR terméket a Qiagen PCR Purification Kit (Qiagen) segítségével tisztítottuk, és a génkzetták azonosítása céljából megszekvenáltuk (Biomi Kft.). A teljességre törekedve, a variábilis régió kivül a 3' és 5' konzervatív régiók részleges szekvenálása is megtörtént. Ehhez a 2172/11 transzkonjugáns törzsből a PureLink HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen) felhasználásával és utasításai szerint plazmidot tisztítottunk, amelyen az 1-es típusú integron konzervatív régióit az I. táblázatban bemutatott primerekkel szekvenáltuk meg. A kapott szekvenciákat a Geneious szoftvercsomag segítségével elemeztük, illesztettük majd a teljes, 2735 bp szekvenciát összehasonlítottuk a GenBank-ban szereplő adatokkal majd a megfelelő annotációkkal ellátva JQ313793 génbanki szám alatt helyeztük el.

## 2.3. Eredmények

### 2.3.1. Különböző geográfiai eredetű ETEC törzsek antibiotikum rezisztencia fenotípusa

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredményei szerint a különböző geográfiai eredetű ETEC törzsek két kivételtől eltekintve multidrog rezisztenseknek bizonyultak (97.7%), azaz egyidejűleg legkevesebb három antibiotikum csoporttal szemben mutattak rezisztenciát. Az antibiotikum rezisztencia fenotípusok százalékos eloszlását a hazai, cseh, osztrák valamint az USA törzsekben az 1. ábra részletezi.



**1. ábra.** Antibiotikum rezisztencia fenotípusok előfordulási gyakorisága (%) különböző geográfiai eredetű (magyar, cseh, osztrák, USA) ETEC törzsekben.

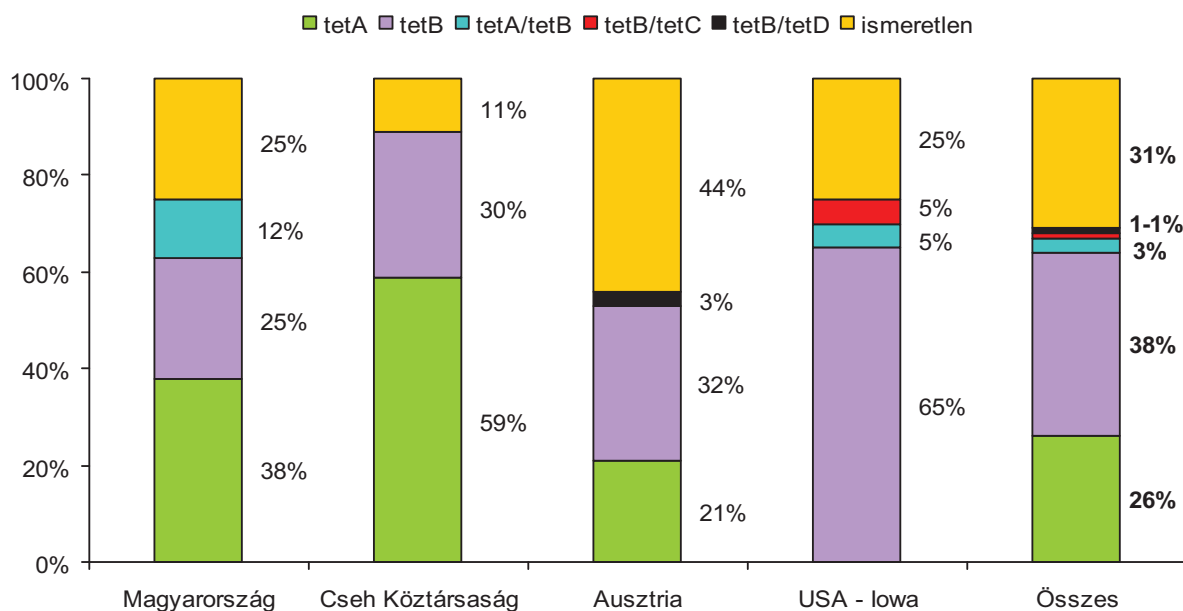
A vizsgált antibiotikumok rövidítései a következők: SMX, szulfametoxazol; TET, tetraciklin; STR, streptomycin; KAN, kanamicin; GEN, gentamicin; SPT, spektinomycin; CHL, klóramfenikol; FFN, flórfenikol; AMX, amoxicillin; AMP, ampicillin; RIF, rifampicin; TMP, trimetoprim; NAL, nalidixinsav; ENR, enrofloxacin; CTX, cefotaxim. A rövidítések alatt a megfelelő antibiotikumra vonatkozó átlagos gyakoriság (%) értékei szerepelnek.

Általában elmondható, hogy az USA törzsek a közép-európai törzseknél magasabb rezisztencia gyakorisággal rendelkeztek egy adott antibiotikumra nézve, viszont a geográfiai eredetre való tekintet nélkül a törzsek többségének rezisztencia mintázata egy közös, szulfametoxazol (91%), tetraciklin (84%) és streptomycin (80%) alapú MDR „vázra” épült.

Az aminoglikozid antibiotikumokkal szemben, mint a kanamicin és gentamicin a törzsek 64% illetve 24%-a bizonyult rezisztensnek, de a viszonylag magas átlagos gyakoriság ellenére mindössze pár cseh törzs volt rezisztens mindkét antibiotikumra. Geográfia régiók szerinti lebontásban, a magyar ETEC törzsek hasonlóan alacsony ampicillin rezisztenciával (13%) voltak jellemezhetőek, míg a nalidixinsav rezisztencia az USA törzsek körében volt a legalacsonyabb (5%). Ezzel szemben a klóramfenikol rezisztencia osztrák törzsek között volt a legelterjedtebb, 53% (a részletes eredményeket mellőzzük). Szintén alacsony rezisztencia gyakoriságokat találtunk a magyar és az USA törzsekben az ampicillin (13%) illetve a nalidixinsav (5%) antibiotikumokra vonatkozóan. A spektinomicinre, amoxicillinre, rifampicinre és trimetoprimre a törzsek 44%, 32%, 36% illetve 17% volt rezisztens, továbbá a flórfenikollal, enrofloxacinnal és cefotaximmal szemben valamennyi törzs érzékenynek bizonyult (1. ábra).

### 2.3.2. A *tet* tetraciklin rezisztencia gének és mintázataik eloszlása az ETEC törzsekben

A tetraciklin rezisztens ETEC törzsekben a *tet* gén típusának meghatározására irányuló PCR vizsgálataink az *Enterobacteriaceae* fajokra jellemző leggyakoribb *tet* típusokat: (*tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G)) célozták meg. Az eredmények szerint a vizsgált ETEC törzsekben a *tet*(B) genotípus volt a leggyakoribb (38%), míg a *tet*(A) gént a törzsek 26%-a tartalmazta (2. ábra).



**2. ábra.** A *tet* tetraciklin rezisztencia gének és mintázataik előfordulási gyakorisága (%) különböző geográfiai eredetű (magyar, cseh, osztrák, USA) ETEC törzsekben.

A tetraciklin rezisztencia fenotípust mutató, de a vizsgált *tet* gén hiányával jellemzett törzseket az „ismeretlen” kategóriába soroltuk.



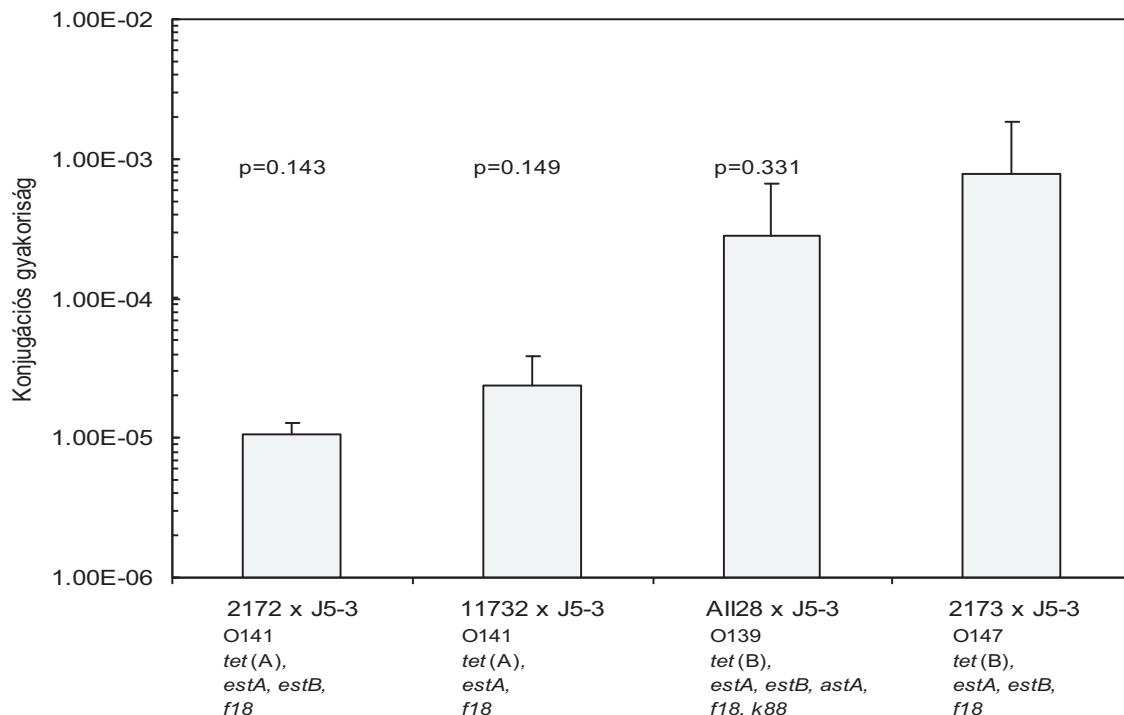
A többségükben egyféle *tet* gént tartalmazó ETEC törzsek egy részében különböző *tet* génmintázatokat mutattunk ki. Ennek megfelelően, a *tet(A)/tet(B)*, *tet(B)/tet(C)* és a *tet(B)/tet(D)* kombinációk a törzsek 3%, illetve 1-1%-t jellemezték. Érdekes módon az ETEC törzsek 31%-a az itt vizsgált tetraciklin rezisztencia gének egyikét sem tartalmazta, holott tetraciklin rezisztencia fenotípust mutatott (2. ábra).

Az egyes tetraciklin rezisztencia géntípusok és azok mintázatai a különböző geográfiai régiókat képviselő ETEC törzsek között eltérők voltak. Ennek megfelelően a cseh törzsek túlnyomó részét a *tet(A)* genotípus jellemezte, az amerikai törzsek pedig 65%-ban a *tet(B)* gént tartalmazták. A magyar és osztrák tetraciklin rezisztens törzsek többsége viszont hasonló mértékben tartalmazta a *tet(A)* (38% illetve 21%) és a *tet(B)* (25% illetve 32%) géneket, viszont az osztrák törzsek 44%-a volt „ismeretlen” genetikai háttérrel jellemezhető. A *tet(E)* valamint a *tet(D)* géneket egyetlen ETEC törzsben sem sikerült kimutatnunk (2. ábra).

### **2.3.3. Tetraciklin rezisztens ETEC szülő és transzkonjugáns törzsek plazmid profilja és replikon típusa**

A pTC plazmidok azonosítására, valamint egyéb, a tetraciklin rezisztencia (*tet*) és tipikus ETEC virulencia gének (*estA*, *estB*, *elt*, *k88*, *f18*) átviteléért felelős plazmidok jellemzése céljából, a közép-európai régiót (Magyarország, Cseh Köztársaság, Ausztria) képviselő ETEC törzsek közül összesen 8 *tet(A)* és 12 *tet(B)* törzset jelöltünk ki konjugációs vizsgálatokra. A kiválasztott 20 ETEC törzs közül a *tet* tetraciklin rezisztencia gének konjugációs átvitele 8 törzs esetében volt eredményes, geográfiai elosztásban 1 hazai *tet(A)*, 1 cseh *tet(A)* és 6 osztrák *tet(B)* génekkel jellemzett törzsnél (II. táblázat). A különböző geográfiai eredetű ETEC törzsek egy-egy képviselőjében, azaz a 2172 (magyar), 11732 (cseh) valamint All.28 (osztrák) törzsekben a tetraciklin rezisztencia plazmidok konjugációs gyakoriságát a 3. ábra szemlélteti, a pTC plazmid referencia törzsként szolgáló magyar ETEC 2173 törzs, mint kontroll mellett.

A PCR alapú replikon tipizálás (PBRT) alapján mindkét *tet(A)* plazmid az IncI1 inkompatibilitási csoportba tartozott, míg a szülő törzsekben az IncI1 mellett egyéb, IncF, IncP, valamint colE<sub>TD</sub> plazmidokat azonosítottunk. Továbbá a plazmidok egy része nem volt tipizálható a fenti PBRT rendszerrel (a részletes eredményeket mellőzzük).



**3. ábra.** A tetraciklin rezisztencia (*tet(A)* vagy *tet(B)*) plazmidok konjugációs gyakorisága különböző geográfiai eredetű ETEC törzsekben.

A konjugációs gyakoriságot a transzkonjugáns törzsek és a J5-3 recipiens törzs telepszáma (CFU) közötti arányként határoztuk meg. Az ábra két kísérlet adatsora alapján készült, és mindkét kísérletben törzsenként három-három párhuzamossal dolgoztunk. A 2173 törzset pTC plazmid kontrollként használtuk. A vizsgált ETEC törzsek valamint a 2173 pTC törzs közötti konjugációs gyakoriságra vonatkozó különbségeket kétmintás t-próba segítségével számszerűsítettük.

#### 2.3.4. A *tet(A)* gént hordozó IncI1 plazmidok antibiotikum rezisztencia és virulencia génmintázata

A magyar és cseh *tet(A)* transzkonjugánsok (2172/11 illetve 11732/71) antibiotikum rezisztencia génmintázata alapján az IncI1 plazmid a magyar törzsben az *aadA* (spektinomycin/streptomycin), *strA* (streptomycin) rezisztencia gének átviteléért volt felelős, míg a cseh törzsben a *tet(A)* tetraciklin és *catA1* klóramfenikol rezisztencia gének IncI1 plazmid közvetített együttes transzferét mutattuk ki (IV. táblázat). További PCR reakciókkal kimutattuk, hogy a *tet(A)* gén a Tn1721 transzpozonon helyezkedik el (a részletes eredményeket mellőzzük). Ami a szülő törzsek virulencia génjeit (*estA*, *estB*, *f18*) illeti, e gének egyike sem jutott át a transzkonjugáns törzsekbe jelezvén, hogy a rezisztencia-, és virulencia gének átvitele különböző plazmidok közvetítésével történt (IV. táblázat).

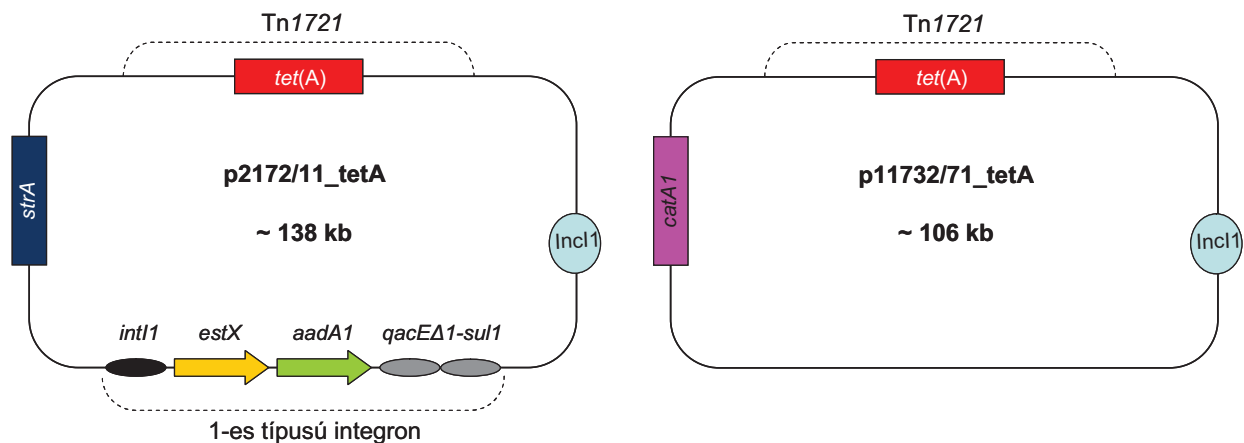
**IV. táblázat.** Konjugatív tetraciklin rezisztenciát mutató ETEC szülőtörzsek és transzkonjugánsaik plazmidon kódolt genetikai determinánsai.

Törzs	Rezisztencia gének	Integron típus	Virulencia gének	<i>estB</i> 5' flanking	Plazmid méret (~kb)
2172	<i>tet(A)</i> , <i>aadA1</i> , <i>strA</i>	<i>intl1</i>	<i>estA</i> , <i>estB</i> , <i>f18</i>	+	174, 138, 38
2172/11	<i>tet(A)</i> , <i>aadA1</i> , <i>strA</i>	<i>intl1</i>		-	138
11732	<i>tet(A)</i> , <i>aadA</i> , <i>strA</i> , <i>catA1</i>		<i>estA</i> , <i>f18</i>	-	138, 106, 60, 5, 4
11732/71	<i>tet(A)</i> , <i>catA1</i>			-	106

A fenti adatok alapján a két, *tet(A)* gént hordozó plazmid vázlatos jellemzését az alábbi ábrán mutatjuk be.

**A.** A magyar ETEC 2172/11 törzs *tet(A)* plazmidja

**B.** A cseh ETEC 11732/71 törzs *tet(A)* plazmidja



**4. ábra.** A magyar (A.) és cseh (B.) F18<sup>+</sup> ETEC törzsek tetraciklin rezisztencia *tet(A)* gént hordozó plazmidjainak, valamint a magyar törzs 1-es típusú integronjának (GenBank: JG313793) vázlatos fizikai térképe.

A 2172 jelű magyar szülőtörzsben és transzkonjugánsában (2172/11) az 1-es típusú integront és annak 3' régiójára jellemző *qacEΔ1* és *sul1* géneket is kimutattuk. A variábilis régió 5'CS-F1/3'CS-R primerekkel történő felerősítése az agaróz gélen egy csíkot adott, ami egyféle 1-es típusú integron jelenlétére utal. A variábilis régiót valamint az azt határoló 5' és 3' régiók szakaszait tartalmazó összesen 2735 bp fragment szekvencia vizsgálata szerint az integron két-kazettás szerkezetű. Ennek megfelelően az *intl1* integráz gént követően egy streptotricin rezisztenciáért felelős gén, az *estX* helyezkedik el, amelytől 3' irányban a spektinomycin/streptomycin rezisztenciát kódoló *aadA1* génkazetta található (4. ábra).

## 2.4. Megbeszélés

Az enterotoxikus *E. coli* (ETEC) az újszülöttkori hasmenés mellett malacok választási hasmenésének oktanában is komoly szerepet játszik (Nagy, Fekete 1999), s a bántalom terápiája egyéb *E. coli* okozta enterális fertőzésekhez hasonlóan még ma is elsősorban antibiotikumok felhasználásához kötött (Maynard et al. 2003). A terápia mellett, mint köztudott a 2006 előtti években, mielőtt az EU idevonatkozó tiltó rendelete érvénybe nem lépett (EC 2003b) igen gyakori volt a sertések választási hasmenése okozta károk csökkentésére az antibiotikumok preventív célú használata is (Nagy, Fekete 1999). Az antibiotikum használat a multidrog rezisztencia (MDR) viszonylag gyors kialakulásához vezetett, és már a '60-as években a tetraciklin, streptomycin és szulfonamid rezisztencia megjelenését jelentették világszerte a patogén és kommenzalista *E. coli* törzsekben egyaránt (White 2006). Ennek megfelelően az újabb közlemények is a sertés *E. coli* törzsek MDR jellegéről, valamint az említett rezisztencia fenotípusok dominanciájáról adnak számot (Mathew et al. 1999, Lanz et al. 2003, Maynard et al. 2003), továbbá az itt vizsgált választási sertés ETEC törzsek is ebbe az általánosnak mondható trendbe illeszkednek be. Ennek megfelelően a geográfiai eredetre való tekintet nélkül az ETEC törzsek többségének rezisztencia fenotípusa egy közös, szulfametoxazol (91%), tetraciklin (84%) és streptomycin (80%) alapú MDR „vázra” épült. Általában elmondható hogy a közép-európai törzsek az USA törzseknél alacsonyabb rezisztencia gyakorisággal jellemezhetők. Ezen általános rezisztencia-többlet az USA-ban, továbbá bizonyos antibiotikumokkal szembeni kiugróan eltérő rezisztencia értékek egyes országokban, mint a kanamicin és a gentamicin (cseh), ampicillin (magyar, cseh), nalidixinsav (USA), az adott ország vagy régió eltérő mértékű antibiotikum felhasználási gyakorlatával magyarázhatók. Ezzel szemben, a flórfenikolra, enrofloxacinra és cefotaximra valamennyi törzs érzékenynek bizonyult, ami nem véletlen, hiszen a flórfenikol használata csak az USA-ban engedélyezett, továbbá a fenti antibiotikumok a sertéstartásban csökkent jelentőséggel bírnak (White 2006).

Egy európai felmérés szerint (Schwarz, Chalus-Dancla 2001) az állatorvosi gyakorlatban terápiás céllal használt antibiotikumok között a tetraciklin kétharmados többséggel bír, így egyáltalán nem meglepő a tetraciklin rezisztencia fenotípus és az azt meghatározó efflux proteinek kódoló *tet* gének (*tet(A)*-(E), *tet(G)*) elterjedése az állatorvosi jelentőségű baktériumok körében, mint amilyen az ETEC is. Összesítve, az itt vizsgált ETEC törzsek tetraciklin rezisztenciája túlnyomórészt a *tet(A)* és *tet(B)* géneknek köszönhető, különös tekintettel a közép-európai térségből (Magyarország, Ausztria, Cseh Köztársaság) származó törzsekre. A tetraciklin rezisztencia gének gyakoriságára vonatkozó közlemények adatait alátámasztva (Guerra et al. 2003, Lanz et al. 2003, Maynard et al. 2003, Smith et al. 2010), e megfigyelés általános érvénnyel bír a sertés hasmenést okozó *E. coli* törzsek

körében. A *tet(A)* és *tet(B)* gének rendszerint kizárták egymást, ami feltehetőleg a terjesztésükben szerepet játszó plazmidok inkompatibilitásának köszönhető (Maynard et al. 2003, Boerlin et al. 2005). Az USA törzsek esetében a *tet(B)* gén erős dominanciájának is bizonyos plazmidok nagyarányú elterjedtsége állhat a háttérben. Ezen túl a közép-európaiaktól eltérő antibiotikum hatás az új generációs tetraciklinekre (minociklin) is kiterjedő „szélesebb körű” rezisztenciát biztosító *tet(B)* plazmidok szelekciójának kedvezhetett (Chopra, Roberts 2001). Eredményeink egyébként felhívják a figyelmet arra, hogy az ETEC törzsek között – különösen az osztrák törzsek esetében - a vizsgált tetraciklin rezisztencia géneken kívül, itt nem vizsgált, egyéb osztályokat képviselő *tet* génekkel is számolnunk kell, melyek azonosítása, a *tet(B)* génekre vonatkozó további vizsgálatokkal egyetemben, külön tanulmány tárgyát képezi.

A plazmid profil vizsgálatok számos ~10 – 200 kb közötti méretű plazmid együttes jelenlétére mutattak rá a közép-európai régiót képviselő, részletesebben jellemzett *tet(A)*- illetve *tet(B)*-pozitív ETEC törzsekben. A törzseket legnagyobbbrészt az *estA-estB-f18* virulencia génmintázat jellemezte, ami első megközelítésben jól beleillik a témacsoportunk által korábban jellemzett Ec 2173 sertés választási ETEC modell törzs virulencia plazmid profiljába (Fekete et al. 2003, Olasz et al. 2005). Ennek értelmében úgy tűnik, hogy a törzsek nagy része az F18 plazmid mellett a későbbiek során az első sertés ETEC plazmidként megszekvenált pTC plazmidot is tartalmazta (Fekete et al. 2012). A pTC mellett szól az e plazmidra jellemző *estB* 5' flanking régiót tartalmazó toxin-specifikus lókuszt (TSL) (Fekete et al. 2003) jelenléte is az érintett törzsek nagy részében. A pTC TSL egyébként tipikus példája az *estA* és *estB* gének kapcsoltságának, PAI-szerű megjelenésének, de természetesen e gének önmagukban illetve más klasszikus ETEC génekkel együtt (*elt*) más típusú virulencia plazmidokon is előfordulhatnak (Mainil et al. 1998).

Témacsoportunk korábbi kutatásai tárták fel, hogy a pTC egy hibrid plazmid, amely az *estA*, *estB* enterotoxin géneket tartalmazó TSL mellett a *tet(B)* tetraciklin rezisztencia gént is tartalmazza, amely rendszerint a *Tn10* transzpozonon helyezkedik el (Fekete et al. 2003, Lawley et al. 2000). A pACYC117 plazmidba történő transzpozíciós kísérletek igazolták, hogy a pTC TSL a *tet(B)*-től függetlenül mobilizálódik (Fekete et al. 2003), amit konjugációs eredményeink is alátámasztanak. A *tet(B)* gén és az esetlegesen társult virulencia és rezisztencia determinánsok plazmid-lokalizációját egyelőre még nem vizsgáltuk, de a törzsek multidrog rezisztencia jellegénél fogva elképzelhető hogy ezen osztrák *tet(B)* gyűjtemény részletes jellemzése egyéb érdekes, pTC-szerű, hibrid plazmidokra mutat majd rá.

Jelen adataink alapján figyelemreméltó viszont, hogy az itt vizsgált magyar ETEC 2172 törzsben a pTC-specifikus TSL-t (*estA*<sup>+</sup>, *estB* 5' flanking<sup>+</sup>) nem *tet(B)*, hanem a *tet(A)* gén mellett mutattuk ki. A két eltérő (virulencia ill. rezisztencia) determinánst azonban az ETEC 2172 nem ugyanazon plazmidon hordozza, mely a TSL mobilis voltának ismeretében nem

meglepő. Tekintettel arra, hogy a *tet(A)* gén Tn1721 transzpozonon helyezkedik el, elméletileg a *tet(A)* génnek a TSL-t hordozó pTC-szerű plazmidba való inszerciója sem lenne teljesen kizárható, annak ellenére, hogy idevonatkozó irodalmi adatok nincsenek. A plazmid transzfer vizsgálatok szerint azonban a 2172 jelű ETEC törzs három nagy plazmidja (~174, 138, 38 kb) közül a *tet(A)* gént a ~138 kb plazmid virulencia gének nélkül hordozza, így jelen esetben mégis valószínűbb, hogy az *estA*, *estB* géneket keretbe foglaló TSL az itt nem vizsgált két másik nagy plazmid (~174 és 38 kb) valamelyikén található. E kérdés azonban egy későbbi vizsgálat tárgyát kell, hogy képezze.

A magyar és cseh szülőtörzsekben (2172 illetve 11732) és egyplazmidos transzkonjugánsaikban lehetőségünk nyílt viszont a *tet(A)* gént hordozó ~138 illetve 106 kb plazmidok részletesebb vizsgálatára, melyhez hasonló szisztematikus megközelítésre, sertés ETEC törzsek esetében eddig csak Kanadából ismerünk példát. Goswami et al. (2008) ugyanis a *tet(A)* gént a pTENT2 hibrid plazmidon írták le sertés ETEC törzsekben, és az *estA*, *paa-1* és *sepA-1* virulencia gének hordozása révén a pTENT2-t tartalmazó törzsek fokozott virulenciájára hívták fel a figyelmet, a plazmid replikon típusának meghatározása nélkül. Az itt jellemzett magyar és cseh transzkonjugáns törzsekben az IncI1 replikon típusú *tet(A)* plazmidok egyike sem tartalmazta a fenti virulencia géneket, sőt az általunk vizsgált, leginkább szóba jöhető virulencia gének hiánya alapján egyelőre mindkét plazmid csupán rezisztencia (pontosabban: mutirezisztencia) plazmidnak tekinthető.

Az általunk tanulmányozott két *tet(A)* plazmidra jellemző IncI1 replikon típus a választáskori sertés ETEC törzsek plazmidjai között meglehetősen gyakori. Az egyéb gazdákból (pl baromfiból) izolált *E. coli* IncI1 plazmidokkal, szemben melyek gyakran hordoznak ESBL géneket (Bortolaia et al. 2010), a sertések választáskori hasmenéséből izolált ETEC törzsekben az IncI1 plazmidok rendszerint nem járnak együtt a fentihez hasonló kiemelt klinikai jelentőségű rezisztencia tulajdonságokkal (Johnson et al. 2011). A mi eredményeink is ez utóbbi megfigyelést támasztják alá. A magyar Ec 2172 törzsben az IncI1 plazmid a *tet(A)* gén mellett aminoglikozid (*aadA1*, *strA*) rezisztenciák átviteléért volt felelős, míg a cseh 11732 törzsben a *tet(A)*-*catA1* (tetraciklin-klóramfenikol) rezisztencia modul IncI1 közvetített transzferét mutattuk ki, melyeket, szerencsés módon, humán egészségügyi szempontból kiemelt klinikai jelentőségű rezisztencia tulajdonságoknak több okból sem nevezhetünk.

Föl kell viszont hívnunk a figyelmet arra, hogy a hazai, 2172-es ETEC törzsben az *aadA1* gén egy klasszikus (*qacED1<sup>+</sup>/sul1<sup>+</sup>*) 1-es típusú integron részét képezte, amely egy igen szokatlan összetételű, *estX*-*aadA1* kazettákból álló, streptotricin valamint streptomycin/spektinomycin antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát meghatározó variábilis régiót tartalmazott (Kadlec, Schwarz 2008). Ez egy viszonylag újszerű génkazetta kombináció melyet korábban különböző geográfiai eredetű humán *Shigella sonnei* (DeLappe

et al. 2003, Ahmed et al. 2006) és *E. coli* törzsekben kimutattak ugyan (Valverde et al. 2006), de ismereteink szerint eddig mindössze két, hasmenéses sertésből izolált *E. coli* törzsben került kimutatásra, a törzsek patogenetikai jellemzése nélkül (Cocchi et al. 2007). Legújabbban egyes sertés ETEC törzsek IncI1 plazmidjainak körében, ehhez hasonló kazetta elrendeződést ugyancsak kimutattak, viszont azokat nem az ún. klasszikus 1-es típusú integron részeként írták le (Johnson et al. 2011). Egyelőre azonban még nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésre ahhoz, hogy ebből az új elrendezésű *E. coli* integronok jelentőségét illetően bármilyen messzebbmenő következtetést levonhassunk. Az eddig szekvenált sertés hasmenésből származó F18<sup>+</sup> illetve K88<sup>+</sup> ETEC törzsek IncI1 típusú plazmidjaiban (Johnson et al. 2011) tetraciklin rezisztencia gént nem találtak. Az itt azonosított magyar és cseh eredetű *tet(A)* hordozó F18<sup>+</sup> ETEC törzsek ilyen típusú plazmidjainak eddigi jellemzésével arra hívtuk fel a figyelmet, hogy a jövőben érdemes lenne e plazmidok teljes szekvenálását is elvégezni, mert ezzel jelenős mértékben hozzájárulhatnánk a *tet(A)* IncI1 plazmidokra vonatkozó ismeretek bővítéséhez, és a multidrog rezisztencia terjesztésében játszott szerepük megértéséhez.

Adatainkat összefoglalva, négy országból (Ausztria, Cseh Köztársaság, Magyarország, USA) származó sertés ETEC törzsek vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a sertések választási hasmenésének terápiájában a legutóbbi időkhöz gyakran használt antibiotikumok közül leggyakoribbnak a tetraciklin elleni rezisztenciát találtuk. Az egyes tetraciklin rezisztencia géntípusok a különböző geográfiai régiókat képviselő ETEC törzsek között eltérők voltak: a cseh törzsek túlnyomó részét a *tet(A)* genotípus jellemezte, az amerikai törzsek pedig 65%-ban a *tet(B)* gént tartalmazták. A magyar és osztrák tetraciklin rezisztens törzsek többsége viszont hasonló mértékben tartalmazta a *tet(A)* (38% illetve 21%) és a *tet(B)* (25% illetve 32%) géneket.

A tetraciklin rezisztenciát meghatározó *tet* gének típusát valamint az enterotoxin géneket (*estA*, *estB*, *elt*), 20 konjugációra kijelölt - 8 *tet(A)*, 12 *tet(B)* – ETEC törzsben PCR-el mutattuk ki, az ampikonokat szükség szerint szekvenálással jellemeztük. A konjugáció eredményeként a *tet(A)* transzkonjugánsok (1 magyar, 1 cseh törzs) egy-egy nagy (~138 és ~106 kb.), virulencia géneket nem hordozó multidrog rezisztens (MDR) plazmidot tartalmaztak. A *tet(A)* plazmidot hordozó magyar törzs ~138 kb plazmidján ún. klasszikus 1-es típusú integront mutattunk ki és jellemeztünk egy újszerű génkazetta kombinációval, melyet korábban különböző geográfiai eredetű humán *Shigella sonnei* és *E. coli* törzsekben kimutattak ugyan, de ismereteink szerint eddig mindössze két, hasmenéses sertésből izolált *E. coli* törzsben került megállapításra, a törzsek patogenetikai jellemzése nélkül. A fenti egyplazmidos transzkonjugáns törzsek replikon tipizálása szerint mindkét törzs plazmidja uni-replikon típusú, és az IncI1 inkompatibilitási csoportba tartoznak.

Eddigi adataink tehát azt jelzik, hogy a *tet(A)* és *tet(B)* gének igen gyakran MDR plazmidokon vagy azokkal együtt, egyszerre több antibiotikum rezisztenciát közvetítve terjedhetnek, ellentétben a korábban csoportunk által jellemzett pTC (90 kb) sertés ETEC plazmiddal, melynek egyedüli antibiotikum rezisztencia génje a *tet(B)* volt. További PCR és szekvenálási vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy az itt kimutatott új típusú konjugatív MDR plazmidok az esetek nagy részében 1-es típusú integronokat is hordoznak, melyek közül a ~138 kb méretű *tet(A)* plazmid (hazai ETEC-ből származó) integronját ~2 kb méretű, szokatlan összetételű, (*estX-aadA1* kazettákból álló, streptotricin-aminoglikozid rezisztenciát meghatározó) variábilis régió jellemzi.

A *tet(A)* és *tet(B)* génekkal jellemzett MDR plazmidok gyakori átvitele mellett, jelen vizsgálataink szerint az F18<sup>+</sup> ETEC törzsekre jellemző virulencia gének átvitele - pl. a toxin specifikus lókuszt (TSL) - jóval ritkábban fordult elő, mint azt a korábbi, pTC-vel kapcsolatos vizsgálatok alapján vélhettük. Nem kerülhetik el figyelmünket viszont ezen új, nem-pTC-szerű plazmidok sem, melyek közül itt két, multidrog rezisztenciát kódoló *tet(A)* plazmidot jellemeztünk, míg a *tet(B)* plazmidok további részletes tanulmányozását a jövőben tervezzük.

#### Következtetések:

1. A korábban részletesen tanulmányozott, *tet(B)* osztályt képviselő tetraciklin rezisztenciáért és enterotoxigenitásért felelős hibrid plazmid (pTC) jellemzése után egy magyar és egy cseh sertés ETEC törzs *tet(A)* gént hordozó plazmidjait jellemeztünk. Ennek eredményeként a kanadai adatokat kiegészítve elsőként mutattuk ki, hogy az F18<sup>+</sup> ETEC törzsek eltérő méretű *tet(A)* plazmidjai azonos replikon típusú (Incl1) rendelkező multirezisztencia plazmidok, melyek a tetraciklin rezisztenciával egyetemben 2-3 rezisztencia gént hordoztak.
2. Ennek megfelelően mutat eltérést, a magyarországi F18<sup>+</sup> ETEC törzs *tet(A)* plazmidján található klasszikus 1-es típusú integron is, mely - a sertés eredetű *E. coli* törzseknél igen szokatlan összetételű - streptotricin-aminoglikozid rezisztenciát meghatározó *estX-aadA1* génkazettákból álló variábilis régiót tartalmaz.



### **3. Haszonállatokból és humán mintákból izolált gentamicin rezisztens *E. coli* törzsek rezisztencia és virulencia genotípusa**

#### **3.1. Bevezetés**

A kommenzalista és klinikai *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztenciája globális problémát jelent nemcsak a humán és az állatorvosi gyakorlatban, de az élelmiszerbiztonságban is (EFSA 2010a). Az előző fejezetben a tetraciklin rezisztenciáról szolgáltatunk újabb adatokat. További példaként az aminoglikozid antibiotikumok – többek között a gentamicin - széleskörű terápiás használatának a többszörös rezisztenciák kialakulására vonatkozó feltételezett hatását kívánjuk áttekinteni. Idevonatkozó adatok szerint a gentamicin a kórokozó és a normál bélflórát alkotó kommenzalista baktériumok rezisztenciájára is kihatással lehet, és elősegítheti az antibiotikumokkal szemben multirezisztens *E. coli* törzsek szelekcióját (Hammerum, Heuer 2009). A gentamicin az egyik leggyakrabban alkalmazott aminoglikozid antibiotikum, melyet legszélesebb körben elsősorban lokális és parenterális kezelésre és esetenként kombinációban bélműtétek előkészítésére használnak, sajnos esetenként szubterápiás dózisban is, ami a rezisztencia kialakulásának köztudottan kedvez. Az állatgyógyászatban a Gram-negatív baktériumok okozta helyi fertőzések (pl. mastitis vagy légúti fertőzések) esetén, elsősorban parenterális formában alkalmazzák, de előfordul, hogy bélfertőzések (pl. kólihasmenés) elleni védekezésben is igénybe veszik. Így nem véletlen, hogy az utóbbi évtizedben a gentamicin rezisztencia gyakorisága hazánkat is beleértve, Európa számos országában megnőtt és már nemcsak a humán- és állat-patogén törzsek körében, hanem a kommenzalistákban is (Catry et al. 2003, EFSA 2010a). Az antibiotikum rezisztencia gének felhalmozódása a horizontális géntranszfer folyamatok eredményeként multidrog rezisztens (MDR) kommenzalista *E. coli* törzsek megjelenéséhez vezethet, melyek ezáltal az antibiotikum rezisztencia gének potenciális rezervoárját képezhetik, és az egészséges állatok között, valamint állatról emberre terjedhetnek (van den Bogaard, Stobberingh 2000, EFSA 2009 és 2010b).

A haszonállatokból származó patogén *E. coli* törzsek multidrog rezisztenciájához gyakran társul virulencia is (Boerlin et al. 2005), mely az esetek jelentős részében a különböző plazmidok együttes hordozásának tulajdonítható. Ritkábban viszont e kapcsolatok a patogén törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia géneket egyaránt hordozó, konjugatív plazmidjaihoz köthetők (Johnson et al. 2010, Fekete et al. 2011). Kevés információval rendelkezünk ezen esetleges asszociációkat illetően a humán és állati eredetű kommenzalista *E. coli* törzsekre vonatkozóan (Rosengren et al. 2009), és különösen hiányoznak a molekuláris epidemiológiai megközelítéssel gyűjtött adatok.

Az *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia génjeinek kimutatására számos molekuláris módszer alkalmazható. Közülük a legnagyobb áteresztőképességű rendszert a DNS microarray jelenti, amely a rezisztencia és virulencia gének széles palettájának meghatározásával az *E. coli* törzsek rezisztencia és virulencia genotípusának gyors és megbízható jellemzésére alkalmas (Anjum et al. 2007, Barl et al. 2008, Batchelor et al. 2008, Hamelin et al. 2007).

A jelenleg ajánlott antibiotikum rezisztencia monitoring programok a törzsek rezisztencia fenotípusára vonatkozóan szolgáltatnak információt (EFSA 2010b). Tudnunk kell azonban, hogy a rezisztencia és esetenként a virulencia genotípus párhuzamos vizsgálata még igen sok lehetőséget tartogat és jóval több értékes adattal járulhatna hozzá az *E. coli* törzsek zoonotikus jelentőségének felbecsüléséhez.

Az ilyen multidrog rezisztens kórokozók és esetenként a rezisztencia és virulencia tulajdonságok váratlan genetikai kombinációiban megjelenő potenciális veszélyforrások mielőbbi felismerésének fontosságára legutóbb a németországi súlyos *E. coli* O104:H4 járvány mutatott rá. Ennek jegyében a hiánypótló jelleggel végzett vizsgálataink elsődleges célja volt, hogy a haszonállatokból és humán mintákból származó gentamicin rezisztens klinikai és kommenzalista *E. coli* törzsek többszörös antibiotikum rezisztencia és virulencia genotípusainak minél átfogóbb jellemzését adjuk.

## 3.2. Anyagok és módszerek

### 3.2.1. A gentamicin rezisztens *E. coli* törzsek eredete és előzetes PCR vizsgálatok

A 2002-2004 közötti időszakban a hazai antibiotikum rezisztencia monitoring program keretében (Kaszanyitzky et al. 2002) partner-laboratóriumunkban (MgSzH Állategészségügyi Igazgatóság) összesen 3477 baromfi, 1861 sertés és 1794 szarvasmarha eredetű *E. coli* törzs antibiotikum rezisztencia fenotípusát határozták meg korongdiffúziós módszerrel (CLSI 2010). A fenotípusosan gentamicin rezisztens (Gen<sup>R</sup>) állati eredetű *E. coli* törzsek közül 187 random módon kiválasztott törzset (34 baromfi; 108 sertés; és 45 szarvasmarha), 37 humán eredetű *E. coli* törzssel kiegészítve a tipikusan gentamicin rezisztenciáért felelős génekre (*aac(3)-I-III*, *ant(2'')-Ia*) vonatkozó előzetes tájékoztatóként PCR vizsgálatoknak vetettük alá. A célzottan vizsgált gentamicin rezisztencia géneket valamint a kimutatásukra használt PCR primereket a V. táblázat foglalja össze.

**V. táblázat.** A fontosabb gentamicin rezisztencia gének kimutatására szolgáló PCR primerek.

Gén	Primer	Szekvencia (5'→3')	PCR fragment (bp)	Hivatkozás / Reakciókörülmények *
<i>aac(3)-I</i>	aacC1 1 f	GAACTTGCTCCGTAGTAGG	251	95C°4' 30x(95C°30" 56C°30" 72C°30") 72C°7'
	aacC1 1 r	GATCGTCACCGTAATCCG		
<i>aac(3)-II</i>	aacC2 f	GGCAATAACGGAGGCAATTCGA	698	Frana et al. 2001
	aacC2 r	CTCGATGGCGACCGAGCTTCA		
<i>aac(3)-III</i>	aacC3 1 f	AACTGGTGGCAATAGAAGG	283	95C°4' 30x(95C°30" 57C°30" 72C°30") 72C°7'
	aacC3 1 r	GCGAACAGGTAAGCATCC		
<i>ant(2'')-Ia</i>	aadB1 fw	GTTGGACTATGGATTCTTAGC	248	95C°4' 30x(95C°30" 56C°30" 72C°30") 72C°7'
	aadB1 rv	GCCTGTAGGACTCTATGTG		

\*: saját tervezésű primerekkel futó PCR reakció körülményei

A gentamicin rezisztencia génekre a fentiek szerint előzetesen megvizsgált *E. coli* törzsek közül munkánk során összesen 50 gentamicin rezisztens (Gen<sup>R</sup>), a négy gazdafajt képviselő *E. coli* törzs antibiotikum rezisztencia és virulencia genotípusát jellemeztük és hasonlítottunk össze a megfelelő PCR microarray rendszerekben (VI. és VII. táblázatok). A törzsek részben egészséges állatokból vagy nyers élelmiszerből (a továbbiakban kommenzalista törzsek), részben pedig beteg vagy elhullott állatoknak a betegség tüneteit mutató szerveiből vagy mastitis-es állatok tejéből származtak (a továbbiakban klinikai törzsek). Az állati eredetű Gen<sup>R</sup> törzseink nagy része, azaz összesen 12 baromfi, 13 sertés és 13 szarvasmarha törzs a fenti, MgSzH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóság által végzett felmérésből került ki. Az Országos Epidemiológiai Központból kapott humán eredetű *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia genotípusát összehasonlító jelleggel

határoztuk meg, melyek közül 8 törzs klinikai mintákból (vér, seb, vizelet) származott, míg a fennmaradó 4 kommenzalista törzset egészséges egyének bélsármintáiból izolálták.

Fontosnak tartjuk megjegyezni, hogy az 50 Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzs microarray vizsgálatok céljából való kiválasztása az említett nagyobb Gen<sup>R</sup> törzscsoportból úgy történt, hogy a törzsek előzetes antibiogramját nem vettük figyelembe, az esetleges virulencia tulajdonságaikról vagy génjeikről pedig egyáltalán nem voltak adataink. Szelekciójuk tehát csupán gentamicin rezisztencia, valamint a törzs eredete alapján történt.

Az állati eredetű *E. coli* törzsekhez hasonlóan, a humán eredetű törzsekre vonatkozóan is végeztünk a gentamicin rezisztencia gének kimutatását célzó elővizsgálatokat.

#### VI. táblázat. A jellemzett baromfi és sertés eredetű Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzsek

#	Baromfi törzs	Mintatípus	Jelleg	#	Sertés törzs	Mintatípus	Jelleg
1	5320	csirkehús	kommenzalista	1	S2	bélsár	kommenzalista
2	5350	csirkehús	kommenzalista	2	S3	bélsár	kommenzalista
3	2901/A	csirkehús	kommenzalista	3	3975	sertéskolbász	kommenzalista
4	2902/A	csirkehús	kommenzalista	4	XII/54	sertéskolbász	kommenzalista
5	2898/A	csirkehús	kommenzalista	5	XVIII/31	sertéskolbász	kommenzalista
6	5412/1	pulykahús	kommenzalista	6	XVIII/71	sertéskolbász	kommenzalista
7	15991	csirke csontvelő	klinikai	7	3976	sertéskolbász	kommenzalista
8	735	csirke csontvelő	klinikai	8	5310	saslik	kommenzalista
9	26467/2	pulyka csontvelő	klinikai	9	5309	saslik	kommenzalista
10	16330	fácán csontvelő	klinikai	10	5262	májashurka	kommenzalista
11	19207	fácán csontvelő	klinikai	11	17135	vékonybél	klinikai
12	22524	liba szív	klinikai	12	18672	lép	klinikai
				13	85	lép	klinikai

#### VII. táblázat. A jellemzett szarvasmarha és humán eredetű Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzsek

#	Sz.marha törzs	Mintatípus	Jelleg	#	Humán törzs	Mintatípus	Jelleg
1	27966/244	tej	kommenzalista	1	5176/7	bélsár	kommenzalista
2	10504/311BH	tej	kommenzalista	2	5191/6	bélsár	kommenzalista
3	6688/14	tej	kommenzalista	3	5182/6	bélsár	kommenzalista
4	14199/52	tej	kommenzalista	4	5209/6	bélsár	kommenzalista
5	14199/7	tej	kommenzalista	5	KT-17022	vizelet	klinikai
6	6824 3	tej: mastitis	klinikai	6	KT-17767	vizelet	klinikai
7	4203/1	bélsár	klinikai	7	B-14808	vizelet	klinikai
8	20690	vékonybél	klinikai	8	B-14446	vizelet	klinikai
9	4875	vékonybél	klinikai	9	J-15693	vizelet	klinikai
10	4533	vékonybél	klinikai	10	5426/8	vizelet	klinikai
11	18147	vékonybél	klinikai	11	5011/6	vér	klinikai
12	31048	vékonybél	klinikai	12	5073/8	seb	klinikai
13	1885	tüdő	klinikai				

### 3.2.2. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok

Az 50 Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzs antibiotikum rezisztencia fenotípusát 13 klinikailag releváns antibiotikummal szemben mutatott MIC (minimális gátló koncentráció) értékek alapján Sensititre® lemez rendszerben (TREK Diagnostic Systems) mikrohígítási módszerrel határoztuk meg. A lemezen szereplő antibiotikumok az alábbi antibiotikum csoportokat képviselték:

1. Aminoglikozidok: gentamicin (GEN), kanamicin (KAN), streptomycin (STR)
2.  $\beta$ -laktám antibiotikumok: ampicillin (AMP)
3. Cefalosporinok: cefotaxim (CTX), ceftazidim (CAZ)
4. Tetraciklinek: tetraciklin (TET)
5. Fenikolok: klóramfenikol (CHL), flórfenikol (FFN)
6. Kinolonok: nalidixinsav (NAL), ciprofloxacin (CIP)
7. Szulfonamidok: szulfametoxazol (SMX)
8. Trimetoprim (TMP)

Az antibiotikum rezisztencia MIC fenotípus meghatározásánál a nemzetközileg e célból elfogadott Sensititre® lemez gyártói útmutatójában ajánlottak szerint jártunk el, a MIC értékeket pedig a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) előírásai alapján határoztuk meg és értékeltük ki (CLSI 2010). A vizsgálatokhoz referencia törzsként az ATCC 25922 *E. coli* törzset használtuk.

Egy adott antibiotikumra a CLSI előírása szerint mérsékelt rezisztens törzseket érzékenynek tekintettük. Azon törzseket pedig, amelyek egyidejűleg három vagy annál több antibiotikum csoporttal szemben mutattak rezisztenciát, multidrog rezisztenseknek (MDR) tekintettük.

### 3.2.3. A vizsgált *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia genotípusának meghatározása

A rezisztencia génmintázat meghatározására a Gram-negatív baktériumok antibiotikum rezisztenciájának átfogó genetikai jellemzésére kifejlesztett „Identibac-AMR” PCR microarray rendszert (ArrayTube™ AMR05) használtuk (Batchelor et al. 2008, Anjum et al. 2011). A fenti rendszer összesen 62 klinikailag jelentős antibiotikum rezisztencia gén egyidejű kimutatását valamint az integron típusának (1-es vagy 2-es típus) meghatározását teszi lehetővé. Ennek megfelelően, egy standard 1.5 ml-es eppendorf-cső alján levő chip-en az alábbi antibiotikum osztályok főbb génjeire specifikus próbák szerepelnek: aminoglikozidok,  $\beta$ -laktámok, fenikolok, kinolonok, szulfonamidok, tetraciklinek valamint az 1-es és 2-es típusú integron jelenlétét meghatározó *int1* és *int2* integráz géneké.

A törzsek rezisztencia genotípusával párhuzamosan a virulencia gének mintázatát is meghatároztuk egy, az előző rendszer elvét követő, *E. coli*-ra adaptált „Identibac Ec”

microarray segítségével (ArrayTube™ Ec03) (Anjum et al. 2007). Az *E. coli* 69 virulencia génjére (és azok számos típusára) specifikus próbák az alábbi főbb géncsoportok kimutatását teszik lehetővé: hármasszerű szekréciós rendszer (T3SS) effektorai, fimbrinok és adhezinek, bakteriocinek valamint a szerin proteáz autotranszporter rendszer (SPATE) bizonyos génjei.

A PCR-alapú rezisztencia- és virulencia microarray alkalmazásának módszere azonos, melyet tekintettel az Anjum et al. (2011) közleményében levő kimerítő leírásra valamint a gyártói útmutatóban ([www.identibac.com](http://www.identibac.com)) leírtakra hivatkozva itt nem részleteznék. Ehelyett mindössze a főbb módszertani fázisokat említeném, melyek a következők:

- „nyers” DNS kivonás, LB tápagon levő overnight tenyészetből
- DNS jelöléssel (biotin) egybekötött multiplex PCR reakció
- microarray hibridizáció
- mosás és az aspecifikus kötődések blokkolása
- precipitációs reakció: HRP-streptavidin konjugátum + Seranum Green szubsztrát
- a spotok intenzitásának leolvasása ArrayTube Reader (ATR01) segítségével
- majd kiértékelésük az IconoClust 2 software-el a következő szempontok alapján: a  $\geq 0.4$  jel erősségű spotok az adott gén jelenlétére utaltak, míg az ennél kisebb intenzitás esetén a törzset a gén hiánya jellemezte

#### **3.2.4. A PCR microarray adatainak statisztikai elemzése**

Az antibiotikum rezisztencia és virulencia gének közötti és azokon belüli asszociációkat a Biostat 2009 (5.3.0, AnalySoft) statisztikai programcsomag segítségével, Pearson-féle korrelációval határoztuk meg. Annak érdekében, hogy a statisztikai modellünk releváns legyen, kizárólag azokat az antibiotikum rezisztencia és virulencia géneket vettük figyelembe statisztikai elemzés szempontjából, melyek előfordulási gyakorisága 10% vagy a fölötte volt.

### 3.3. Eredmények

#### 3.3.1. A gentamicin rezisztencia gyakorisága, és a hazai haszonállatokból és humán mintákból izolált gentamicin rezisztens *E. coli* törzsek gentamicin rezisztencia génjei

A módszertani leírásban említettek szerint, a hazai antibiotikum rezisztencia monitoring program keretén belül a 2004-2008 közötti időszakban partner-laboratóriumunkban (MgSzH Állategészségügyi Igazgatóság) összesen 3477 baromfi, 1861 sertés és 1794 szarvasmarha eredetű, egészséges/elhullott állatokból származó *E. coli* törzs antibiogramját határozták meg. A fenti hazai felmérés értelmében az *E. coli* törzsek gentamicin rezisztenciájának százalékos gyakorisága az egyes gazdafajokban és az izolálási évtől függően is változó volt. Összességében a sertés törzsek a szarvasmarha és baromfi törzsekhez képest szignifikánsan ( $p < 0.01$ ) gyakoribb gentamicin rezisztenciát mutattak. Továbbá jól kivehető, hogy a klinikai mintákból származó sertés és szarvasmarha eredetű törzsek között a gentamicin rezisztencia jóval gyakoribb (12.4% ill. 9.4%) volt, mint a baromfi eredetű törzsek között (3.6%), mely jól magyarázható azzal a gyakori tapasztalattal, hogy a két fenti emlősfaj esetében a gentamicin terápiás alkalmazása elfogadott gyakorlat, míg a baromfi esetében egyáltalán nem az. A gazdafajtól független összehasonlításban viszont, a kommenzalista *E. coli* törzsekben a gentamicin rezisztencia szignifikánsan ( $p < 0.01$ ) ritkább volt (0.2% - 2.1%) mint a klinikai mintákból izoláltakban (3.6% - 12.4%) (VIII. táblázat).

**VIII. táblázat.** Hazai haszonállatokból származó kommenzalista és klinikai *E. coli* törzsek gentamicin rezisztenciájának előfordulási gyakorisága (%) 2004-2008 között.

Haszonállat	Törzsek jellege (száma)	2004	2005	2006	2007	2008	Átlag
Baromfi	Kommenzalista (814)	1.3	1.4	1.4	3.9	1.1	1.8
	Klinikai (2663)	3.3	5.6	4.2	1.5	3.5	3.6
Sertés	Kommenzalista (903)	0.6	1.7	2.6	3.3	2.4	2.1
	Klinikai (958)	11.5	10.4	14.0	16.2	10.0	12.4
Szarvasmarha	Kommenzalista (937)	0.4	0.0	0.0	0.5	0.0	0.2
	Klinikai (857)	2.7	16.0	5.2	10.0	13.4	9.4

A további részletes, microarray szintű jellemzést megelőzendő előzetes tájékozódásként, a gentamicin rezisztencia fenotípust mutató *E. coli* törzsek közül összesen 224 törzs esetében (34 baromfi, 108 sertés, 45 szarvasmarha, 37 humán) PCR segítségével vizsgáltuk a fenotípus hátterében álló legfontosabb gentamicin rezisztencia gének előfordulását. Összességében elmondható, hogy az állati eredetű Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzsekhez képest (23-53%)

a humán törzsek lényegesen nagyobb részében (76%) azonosítottuk a vizsgált gentamicin rezisztencia gének valamelyikét (IX. táblázat).

**IX. táblázat.** A leggyakoribb gentamicin rezisztenciáért felelős gének előfordulása haszonállatokból és humán mintákból izolált Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzsekben.

Gén	Baromfi n=34	Sertés n=108	Szarvasmarha n=45	Humán n=37
<i>aac(3)-I</i>	-	-	-	1 (3%)
<i>aac(3)-II</i>	16 (47%)	35 (32%)	24 (53%)	27 (73%)
<i>aac(3)-III</i>	2 (6%)	-	-	-
<i>ant(2'')-Ia</i>	-	-	-	3 (8%)

A gentamicin rezisztencia genotípust leggyakrabban az *aac(3)-II* acetyl-transferáz gén képviselte, amely a baromfi, sertés és szarvasmarha törzsek 47%, 35% illetve 53%-t jellemezte, míg a humán törzsek 73%-ban fordult elő (IX. táblázat). Két baromfi törzs (*aac(3)-III*) kivételével a vizsgált állati eredetű törzsek kizárólag az *aac(3)-II* gént tartalmazták, amely rendszerint magában fordult elő a pozitív törzsekben. Ezzel szemben a humán törzsekben az *aac(3)-II* gén mellett az *aac(3)-I* valamint az *ant(2'')-Ia* géneket is azonosítottuk.

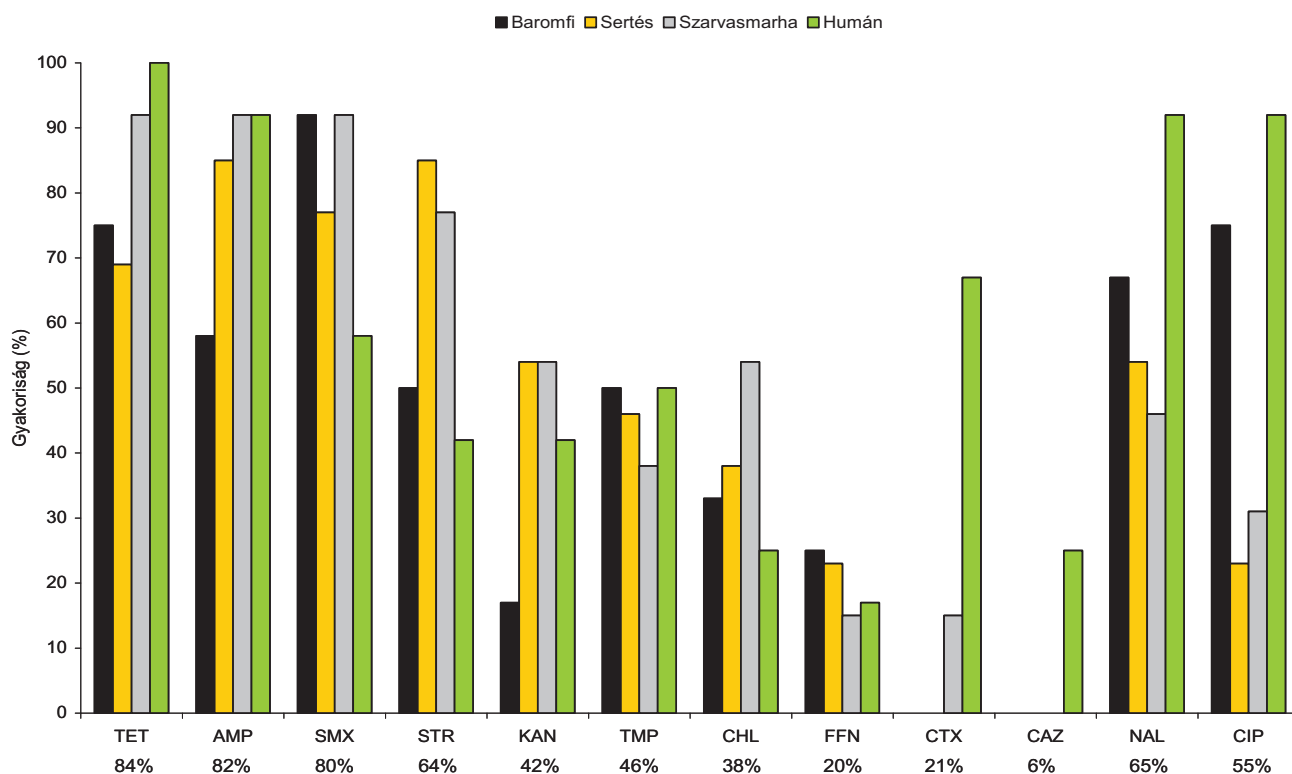
### 3.3.2. Állati és humán eredetű gentamicin rezisztens *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia fenotípusa

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok eredményei szerint mind az 50 vizsgált Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzs multidrog rezisztensnek (MDR) bizonyult, azaz egyidejűleg legkevesebb három antibiotikum csoporttal szemben mutatott rezisztenciát. A vizsgált rezisztencia fenotípusok százalékos eloszlását az állati- és a humán törzsek között az 5. ábra mutatja be. Ennek értelmében a gazdafajra, valamint a klinikai háttérre (kommenzalista / klinikai) való tekintet nélkül a törzsek többségének rezisztencia mintázata (természetesen a gentamicin mellett) egy közös, tetraciklin (84%), ampicillin (82%) és szulfametoxazol (80%) alapú MDR „vázra” épült.

Az aminoglikozidokkal (elsősorban streptomycin és kanamicin) szemben, a törzsek 64% illetve 42%-a bizonyult rezisztensnek, míg trimetoprim, klóramfenikol és flórfenikol rezisztencia fenotípusokat a törzsek 47%; 36%; valamint 20%-ában találtunk. Ami a kiemelt fontosságú 3. generációs cefalosporinokkal szembeni rezisztenciát illeti, lényeges különbségeket találtunk az állati és a humán eredetű Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzsek között (3.3.2 ábra). Ennek megfelelően, míg az állati eredetű törzsek közül mindössze két szarvasmarha törzs mutatott cefotaxim rezisztenciát, addig a humán törzsek viszonylag nagy százalékában (67% és 25%) mutattuk ki a cefotaxim és ceftazidim rezisztencia fenotípusokat (a részletes



eredményeket mellőzzük). A cefalosporin rezisztencia eredményeihez hasonlóan, a kinolonokkal (nalidixinsav, ciprofloxacín) szembeni rezisztencia is gyakoribb volt a humán *E. coli* törzsekben. Összességében a törzsek 65%-a nalidixinsav, míg 55%-uk ciprofloxacín rezisztenciával rendelkezett (5. ábra).



**5. ábra.** Antibiotikum rezisztencia fenotípusok előfordulási gyakorisága (%) állati és humán eredetű gentamicin rezisztens *E. coli* törzsekben.

A vizsgált antibiotikumok rövidítései a következők: TET, tetraciklin; AMP, ampicillin; SMX, szulfametoxazol; STR, streptomycin; KAN, kanamicin; NAL, nalidixinsav; CIP, ciprofloxacín; TMP, trimetoprim; CHL, klóramfenikol; FFN, flórfenikol; CTX, cefotaxim; CAZ, ceftazidim. A rövidítések alatt a megfelelő antibiotikumra vonatkozó átlagos gyakoriság (%) értékei szerepelnek.

### 3.3.3. Állati és humán eredetű gentamicin rezisztens *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia genotípusa

Az AMR05 PCR microarray antibiotikum rezisztencia génkészletének 62 antibiotikum rezisztencia génje közül a vizsgált Gen<sup>R</sup> *E. coli* gyűjteményben összesen 29 rezisztencia gént azonosítottunk és összhangban a fenotípusra vonatkozó eredményekkel a törzsek MDR jellegét az antibiotikum rezisztencia génmintázatuk is alátámasztja. Ennek megfelelően valamennyi törzsben számos antibiotikum csoport genetikai determinánsainak változatos mintázatait mutattuk ki, beleértve az 1-es és 2-es típusú integronok jelenlétét meghatározó *int1* és *int2* integráz géneket is (X. táblázat).



Az aminoglikozid rezisztenciáért felelős gének a vártnak megfelelően egy sertés (3976) és egy szarvasmarha (27966/244) törzs kivételével valamennyi *E. coli* törzsben jelen voltak, a fenti táblázatban bemutatott elrendezésben. A leggyakrabban közülük a streptomycin rezisztenciát meghatározó *strB* (46%), *strA* (32%) és *aadA1* (46%) géneket mutattuk ki. Az amikacin, kanamicin, tobramicin rezisztenciát kódoló *aac(6)-Ib* gén viszont kizárólag a humán törzseket jellemezte és azok 58%-ában volt jelen. Továbbá, a gentamicin rezisztencia fenotípusért felelős *ant(2'')-Ia* génnel is csupán néhány humán törzsben találkoztunk, és ezen eredmény teljes átfedést mutat a 3.3.1 fejezetben részletezett, tipikusan a gentamicin rezisztencia génekre kiterjedő előzetes PCR vizsgálatokkal (XI. táblázat). A fals összkép kialakítását elkerülendő, az egyéb fontos gentamicin rezisztencia gének (pl. *aac(3)-II*) állati és humán előfordulását illetően is érdemes visszatérni az említett fejezet eredményeihez, ugyanis az AMR05 array génpalettája a gentamicin vonatkozásában kiegészítésre szorul.

A klóramfenikol rezisztencia genotípust leggyakrabban a *catA1* gén képviselte, mely összesen 14 állati és humán eredetű törzsben volt jelen (28%), míg a *catB3* kizárólag a humán törzsekben (7 törzsben) fordult elő. Érdekes viszont, hogy a hét *catB3*-pozitív humán törzs közül mindössze kettő mutatta a megfelelő rezisztencia fenotípust is. Ezzel szemben, a flórfenikol rezisztenciáért felelős *floR* gént tartalmazó törzsek valamennyien fenotípusosan is rezisztensnek bizonyultak (XI. táblázat).

A  $\beta$ -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát meghatározó genetikai determinánsokat illetően a Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzsek többségében (64%) az ampicillin rezisztenciáért felelős *bla*<sub>TEM</sub> csoport jelenlétét mutattuk ki. Itt jegyezném meg, hogy az AMR05 array *bla*-specifikus próbái az egyes géncsoportok (TEM, CTX-M-1, OXA-1) kimutatására lettek tervezve, a csoporton belül az egyes géntípusokat meghatározására további PCR-fragment szekvenálásokra lenne szükség, melyek a jelen tanulmány kereteit jelentősen meghaladták volna. A *bla*<sub>TEM</sub> gazdafajtól független magas gyakoriságával szemben az ESBL (extended-spectrum-beta-lactamase) géncsoportok mint a *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> és *bla*<sub>SHV</sub> kizárólag a humán törzsekre és néhány szarvasmarha törzsre volt jellemző (XI. táblázat).

A rezisztencia microarray segítségével az *Enterobacteriaceae* fajokra jellemző tetraciklin rezisztencia gének széles palettájára (*tet*(A-E valamint G) kerestünk rá, melyek közül csupán a *tet*(A) és *tet*(B) géneket azonosítottuk az *E. coli* törzsek 50% illetve 42%-ában. Általában elmondható, hogy a fenti két tetraciklin rezisztencia gén az egyes gazdafajokra egyaránt jellemző volt. A rezisztencia fenotípussal összhangban a szulfametoxazol rezisztencia gének is magas gyakoriságot mutattak, így a *sul1* és a *sul2* gének a törzsek 54% illetve 30%-ában fordultak elő. A trimetoprim rezisztencia genotípust a microarray palettáján összesen 8 *dfr* gén képviselte, melyek heterogén mintázata jellemezte a vizsgált Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzseket (X. és XI. táblázatok).

Végül az *int11* és *int12* integráz gének azonosítása alapján, az integronok közül az 1-es típusú integron a törzsek 68%-ban fordult elő, míg a 2-es típusú integront mindössze 2 kommenzalista és 4 klinikai eredetű törzsből mutattuk ki, minden esetben állati eredetű törzsekben, és mindhárom állatfajt 2-2 törzs képviselt (X. és XI. táblázatok).

Ha az antibiotikum rezisztencia gének mintázatait és gyakoriságát gazdafajonként összehasonlítjuk, akkor a baromfi és humán törzsek között szignifikáns ( $p \leq 0.01$ ) különbségeket találunk bizonyos aminoglikozid (*aac(6')-Ib*, *aadA1*), fenikol (*catB3*),  $\beta$ -laktám (*bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>*), szulfametoxazol (*sul1*) gének valamint az 1-es típusú integronok (*int11*) előfordulási gyakoriságát illetően (X. táblázat). Továbbá a rezisztencia gének szignifikánsan ( $p=0.03$ ) nagyobb arányban fordultak elő a klinikai *E. coli* törzsekben, mint az egészséges állatokból/emberből izolált kommenzalistákban.

**XI. táblázat.** Antibiotikum rezisztencia gének előfordulási gyakorisága állati és humán mintákból származó gentamicin rezisztens *E. coli* törzsekben.

Antibiotikum csoport	Rezisztencia gén	Előfordulási gyakoriság %				Összes	N <sub>komm</sub>	N <sub>klin</sub>
		Baromfi	Sertés	Szmarha	Humán			
Aminoglikozidok	<i>strA</i>					32%	6	10
	<i>strB</i>					46%	10	13
	<i>aadA1</i>					46%	7	16
	<i>aadA2</i>				-	22%	5	6
	<i>aadA4</i>					18%	4	5
	<i>aac(6')-Ib</i>	-	-	-		14%	4	3
	<i>ant(2'')-Ia</i>	-	-	-		4%	1	1
Fenikolok	<i>catA1</i>					28%	7	7
	<i>floR</i>					16%	3	5
	<i>catB3</i>	-	-	-		14%	4	3
	<i>cmIA1</i>	-		-	-	2%	0	1
$\beta$ -laktámok	<i>bla<sub>TEM</sub></i>					64%	16	16
	<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	-	-			16%	4	4
	<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	-	-			24%	8	4
	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	-	-			4%	1	1
Tetraciklinek	<i>tet (A)</i>					50%	11	14
	<i>tet (B)</i>					42%	9	12
Szulfonamidok	<i>sul1</i>					54%	11	16
	<i>sul2</i>					30%	6	9
	<i>sul3</i>	-			-	6%	1	2
Trimetoprim	<i>dfrA1</i>		-			14%	2	5
	<i>dfrA12</i>			-	-	8%	4	0
	<i>dfrA14</i>	-			-	8%	0	4
	<i>dfrA15</i>	-	-		-	2%	0	1
	<i>dfrA17</i>					24%	5	7
	<i>dfrA19</i>			-	-	8%	3	1
	<i>dfrV</i>	-		-	-	2%	1	0
Integronok	<i>int11</i>					68%	15	21
	<i>int12</i>				-	12%	2	4

A táblázatban feltüntetett géneket legalább egy *E. coli* törzsből kimutattuk. A megfelelő génekre pozitív kommenzalista valamint klinikai *E. coli* törzsek számának jelölésére az N<sub>komm</sub> és N<sub>klin</sub> rövidítéseket használtuk. A SPATE a szerin proteáz autotranszporter rendszer hivatalos angol rövidítése (serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*).

#### **3.3.4. Állati és humán eredetű gentamicin rezisztens *E. coli* törzsek virulencia genotípusa**

Az idevonatkozó vizsgálatok során az Ec03 microarray 69 virulencia gént számláló génkészletéből a Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzsekben összesen 41 virulencia gént azonosítottunk. A hármas típusú szekréción rendszer (T3SS) effektorait kódoló gének valamint az *stx* gén kivételével, melyeket 5 független sertés eredetű kommenzalista *E. coli* törzsben azonosítottunk, a virulencia gének többsége véletlenszerűen oszlott meg az egyes gazdafajok kommenzalista és klinikai törzsei között, a virulencia genotípusok heterogén jellegét eredményezve (XII. táblázat). Ez utóbbi érdekes sertés *E. coli* leletünkkel kapcsolatban már most rá kell mutatni, hogy ezek nyers élelmiszerből illetve egészséges sertések bélsarából kimutatott jól ismert virulencia génekként élelmiszerbiztonsági kockázatot is képviselhetnek.



A vizsgált virulencia gének közül leggyakrabban a szérum rezisztenciában szerepet játszó *iss* gént lehetett kimutatni, amely gazdafajtól és klinikai háttértől függetlenül a törzsek 70%-ban volt jelen (XIII. táblázat). A bakteriocin gének (*cma*, *mchF*), a fimbria gének (*prfB*, *lpfA*) valamint az *iroN* sziderofór receptor gén előfordulási gyakorisága 20-32% között változott. A SPATE (szerin proteáz autotranszporter rendszer) génjeit mindössze 12 törzsben, elsősorban baromfi és a humán törzsekben mutattuk ki. Így a *tsh* gén pl. inkább a baromfi extraintestinalis törzseket jellemezte. A *sat* gén viszont klinikai háttérre való tekintet nélkül kizárólag a humán *E. coli* törzsekben volt kimutatható (XIII. táblázat). A SPATE-pozitív törzsek többségében egyféle géntípust azonosítottunk. Multigénes SPATE reprezentációt mindössze három törzsben találtunk.

**XIII. táblázat.** Virulencia gének előfordulási gyakorisága állati és humán mintákból származó gentamicin rezisztens *E. coli* törzsekben.

Funkció	Virulencia gén	Előfordulási gyakoriság %				Összes	N <sub>komm</sub>	N <sub>klin</sub>
		Baromfi	Sertés	Szmarha	Humán			
Szérum rezisztencia	<i>iss</i>	70%				15	20	
Sziderofór receptorok	<i>iroN</i>	32%				7	9	
	<i>ireA</i>	10%				3	2	
T3SS effektorok	<i>eae</i>	-	8%	-	-	4	0	
	<i>espA</i>	-	6%		-	3	0	
	<i>espB</i>	-	4%		-	2	0	
	<i>espF</i>	-	4%		-	2	0	
	<i>espJ</i>	-	4%		-	2	0	
	<i>nleA</i>	-			6%	3	0	
	<i>nleC</i>	-			4%	2	0	
	<i>tir</i>	-			4%	1	1	
	<i>cif</i>	-			4%	2	0	
	<i>cnf</i>	-			2%	0	1	
	Toxinok	<i>astA</i>	14%				2	5
		<i>stx2A</i>	8%				3	1
<i>stx2B</i>		2%				1	0	
Fimbria/ egyéb adhezinek	<i>lpfA</i>	30%				7	8	
	<i>prfB</i>	20%				5	5	
	<i>iha</i>	14%				4	3	
	<i>f17A</i>	-	4%			0	2	
	<i>f17G</i>	-	4%			0	2	
	<i>fedA</i>	-	2%			0	1	
	<i>fedF</i>	-	4%			1	1	
	<i>fasA</i>	-	2%			1	0	
	<i>K88ab</i>	-		2%		0	1	
	<i>cofA</i>	-	2%			1	0	
	<i>nfaE</i>	-	2%			1	0	
	Bakteriocinek	<i>mchB</i>	4%				1	1
		<i>mchC</i>	4%				1	1
<i>mchF</i>		26%				5	8	
<i>cma</i>		20%				5	5	
<i>mcmA</i>		8%				1	3	
<i>cba</i>		6%				0	3	
<i>ccl</i>		4%				2	0	
SPATE	<i>celB</i>	2%				1	0	
	<i>tsh</i>	12%				2	4	
	<i>sat</i>	10%				3	2	
	<i>espP</i>	4%				0	2	
	<i>vat</i>	4%				0	2	
	<i>pic</i>	4%				0	2	
	<i>sepA</i>	2%				1	0	

A táblázatban feltüntetett virulencia géneket legalább egy *E. coli* törzsben kimutattuk. A megfelelő génre pozitív kommenzalista valamint klinikai *E. coli* törzsek számának jelölésére az N<sub>komm</sub> és N<sub>klin</sub> rövidítéseket használtuk.

A fennmaradó virulencia gének többsége ritkán fordult elő és mindössze néhány törzsben volt kimutatható. Két baromfi (2901/A és 2902/A) és egy sertés (3975) törzs kivételével, melyek a vizsgált virulencia gének teljes hiányát mutatták, a törzsek többsége egyidejűleg 2-3 különböző virulencia mechanizmust képviselő genetikai determinánsokkal rendelkezett (XII. táblázat). Összességében elmondható azonban hogy a várakozással ellentétben, a virulencia gének előfordulási gyakorisága tekintetében a klinikai és kommenzalista törzsek között statisztikailag igazolható különbség nem volt.

### 3.3.5. Pozitív korrelációt mutató antibiotikum rezisztencia és virulencia gének a gentamicin rezisztens *E. coli* törzsekben

Annak érdekében, hogy képet kapjunk az antibiotikum rezisztencia és virulencia gének közötti és azokon belüli esetleges kapcsolatokról, a Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzsek legkevesebb 10%-ában azonosított antibiotikum rezisztencia (összesen 18 gén) és virulencia géneket (összesen 11 gén) korrelációs elemzésnek (Pearson korreláció,  $p < 0.05$ ) vetettük alá.

Amint a XIV. táblázat is szemlélteti, a legerősebb pozitív korrelációt ( $r = 1.00$ ) a *catB3* klóramfenikol rezisztencia és az *aac(6)-Ib* gentamicin rezisztenciát meghatározó gének között találtuk, mely rezisztencia gének további, bár kisebb mértékű asszociációkat mutattak a *bla<sub>CTX-M-1</sub>* ESBL génnel ( $r = 0.93$ ), valamint a SPATE virulencia géncsaládba tartozó *sat* génnel ( $r = 0.83$ ). Tekintve, hogy ezen együttállásokat mutató géneket szinte kizárólagosan a humán törzsekben azonosítottuk, úgy tűnik, hogy a fenti génasszociációk az adott *E. coli* gyűjteményre nézve humán-specifikus jelleggel rendelkeznek.

Eredményeink emellett további gazda-specifikus gén asszociációkra is rámutattak. Ennek megfelelően a *catA1* klóramfenikol rezisztencia gén és a *-bla<sub>OXA-1</sub>* ( $r = 0.75$ ); *-sul1* ( $r = 0.73$ ); *-int11* ( $r = 0.60$ ); *-tet(B)* ( $r = 0.60$ ) között kapcsolatok, valamint a *tet(B)* és *sul1* gének közötti asszociáció ( $r = 0.82$ ) a szarvasmarha törzseket jellemezte. További vegyes (rezisztencia és virulencia gének közötti) génkapcsolatokat, mint a *tet(A)* és az *iroN* valamint az *iss* ( $r = 0.77$ ) gének kapcsolata az extraintestinalis baromfi törzsekben találtunk (az adatokat nem tüntettük fel).

Ezzel szemben az egyéb génkapcsolatok, mint a *dfra17* trimetoprim rezisztencia gén és a streptomycin rezisztenciában szerepet játszó *aadA4* közötti asszociáció ( $r = 0.85$ ) független volt a gazdafajtól. Ha a virulencia gének közötti kapcsolatokat vizsgáljuk, akkor csupán a rezisztencia génekkel való asszociáció kapcsán a már említett *sat* SPATE gén és az *iha* adhezin gén között találunk szoros korrelációt ( $r = 0.83$ ) (XIV. táblázat).



**XIV. táblázat.** Antibiotikum rezisztencia és virulencia gének közötti és azokon belüli asszociációk állati és humán mintákból származó gentamicin rezisztens *E. coli* törzsekben.

	<i>aac(6′)-Ib*</i>	<i>aadA4</i>	<i>strA</i>	<i>catB3*</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> csoport*	<i>iha</i>
<i>strB</i>			0.783			
<i>catB3*</i>	1.000					
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> csoport*	0.926			0.926		
<i>dfrA17</i>		0.849				
<i>sat*</i>	0.829			0.829	0.768	0.829

Kiseb mértékű asszociációkat számos egyéb rezisztencia és virulencia gén között találtunk, de csak a szignifikáns és magas korrelációs együtthatóval ( $r \geq 0.7$ ) jellemzett gén-együttállásokat vettük figyelembe.

A főként/kizárólag humán törzsekben kimutatott géneket \* jelöli.

### 3.4. Megbeszélés

A széles spektrumú antibiotikumok közül az aminoglikozidok közé tartozó gentamicin használata mind a humán-, mind az állatorvosi gyakorlatban, az USA-ban és Európa szerte viszonylag gyakori, beleértve hazánkat is. Adataink szerint 2004-2008 között a klinikai mintákból származó állati eredetű *E. coli* törzsek gentamicin rezisztencia gyakoriságában inkább a fluktuáció, mint a növekedés volt jellemző: általában a sertés és szarvasmarha eredetű törzsek esetén a gentamicin rezisztencia jóval gyakoribb (12.4% ill. 9.4%) volt, mint a baromfi eredetű törzsek között (3.6%). Ugyanakkor, a hazai humán klinikai *E. coli* törzsek aminoglikozid rezisztenciája 2001-2008 között ugrásszerűen 4%-ról 13%-ra emelkedett (EARSS 2008).

A gentamicin rezisztenciának a klinikai, de főként a kommenzalista *E. coli* törzsek multidrog rezisztenciájára és virulencia tulajdonságaira gyakorolt hatása viszont még kevésbé ismert.

Ezen kölcsönhatások megismerésében e tanulmány keretén belül összesen 50, haszonállatokból és humán mintákból izolált klinikai (beteg állat/ember) és kommenzalista (egészséges állat/ember) háttérű gentamicin rezisztens ( $\text{Gen}^{\text{R}}$ ) *E. coli* törzs antibiotikum rezisztencia és virulencia genotípusának jellemzésével próbáltunk előbbre jutni. A vizsgálandó  $\text{Gen}^{\text{R}}$  törzseket úgy válogattuk össze, hogy azok az akkori 50 törzsre limitált microarray kapacitásunkat figyelembe véve az adott 4 legfontosabb gazdafaj klinikai és kommenzalista törzsei tekintetében reprezentatívak legyenek.

A fenti *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia genotípusát nagy áteresztőképességű PCR microarray rendszerekben, összesen ~130 rezisztencia és virulencia gén jelenléte és azok mintázata alapján határoztuk meg, és ezzel nemzetközileg is első alkalommal szolgáltatunk részletes összehasonlító genotipizálási adatokat egy meghatározott geográfiai területen emberben és gazdasági haszonállatokban előforduló klinikai és kommenzalista *E. coli* törzsek esetleges antibiotikum rezisztencia és virulencia génrezervoár szerepéről.

Összességében elmondható, hogy a vizsgált  $\text{Gen}^{\text{R}}$  törzsek nagyfokú variabilitást mutató rezisztencia és virulencia mintázatokkal rendelkeztek. A törzsek mindegyike multidrog rezisztenciát (MDR) mutatott, azaz legkevesebb három antibiotikum csoporttal szemben bizonyult rezisztensnek és leggyakoribbak a tetraciklin (84%), ampicillin (82%) és a szulfametoxazol (80%) rezisztens fenotípusok voltak. Ugyanezen MDR fenotípusokat írták le egyéb humán eredetű, vizeletből- és kórházi vízvezeték rendszerekből származó gentamicin rezisztens *E. coli* törzsekben is (Jakobsen et al. 2008), viszont az egyes egészséges és beteg haszonállatokból és humán mintákból származó multidrog rezisztens *E. coli* törzsek

antibiotikum rezisztencia és virulencia genotípusainak összehasonlítására vonatkozóan irodalmi adatok mindeddig nem álltak rendelkezésre.

Egy nagyobb, összesen 224 Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzsből álló gyűjteményre vonatkozó előzetes PCR adatok alapján az állati és humán eredetű törzsek gentamicin rezisztenciáját a vizsgált gének közül leggyakrabban az *aac(3)-II* határozta meg, a törzsek eredetétől függetlenül. Az egyéb, *aac(3)-I* valamint *aac(3)-III* acetyl-transferáz gének csak elszórtan fordultak elő. Ezen eredmények megerősítik Ho et al. (2010) adatait, akik egyebek mellett, a fontosabb gentamicin rezisztencia gének gyakoriságát vizsgálták gentamicin rezisztens és szenzitív állati és humán eredetű törzsekben. Eredményeik alapján az *aac(3)-II* gén „tipikus” gentamicin rezisztencia génként definiálható és plazmid által közvetített terjedésének köszönhetően, gazdafajtól független, általánosan előforduló jellegére hívták fel a figyelmet.

A rezisztencia és virulencia gének vonatkozásában microarray-al részletesen jellemzett Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzsek között leggyakrabban a *bla*<sub>TEM</sub> (ampicillin), *tet(A)* (tetraciklin), *strB* (streptomycin) és a szulfametoxazol rezisztenciáért felelős *sul1* géneket azonosítottuk, mely szépen egybeesnek az MDR fenotípusra vonatkozó eredményeinkkel, valamint egyéb közlemények (Batchelor et al. 2008, Briñas et al. 2002) adataival. A fenti antibiotikum rezisztencia gének az egyes törzsekben klinikai háttértől függetlenül fordultak elő, de számuk szignifikánsan ( $p=0.03$ ) magasabb volt a klinikai törzsekben. A fenti antibiotikum rezisztencia fenó- és genotípusok gyors elterjedése a különböző eredetű és klinikai háttérű *E. coli* populációkon belül és között az antibiotikum használatból eredő szelekciós nyomás természetes következménye lehet, amihez még hozzájárul, hogy e gének nagy része mobilis genetikai elemeken (plazmidok, transzpozonok, integronok) helyezkedik el (Roberts 2005, Sköld 2001), és így a szelekció gyorsabban mehet végbe. Így nem véletlen hogy a törzsek 68%-ában mutattuk ki az 1-es típusú integron jelenlétére utaló *int1* gént, viszont ezek közül néhány (6 állati és 2 humán törzs) nem a klasszikus, *sul1*-típusú integront hordozta. Természetesen önmagától adódik a kérdés, hogy a különböző gazdaállatokból valamint a humán mintákból származó *E. coli* törzsek integronjait vajon milyen génkazetta-elrendeződések jellemzik? Ilyen természetű vizsgálat sorozatra azonban a rendelkezésre álló kereteken belül egyelőre nem vállalkozhattunk.

Feltételezhető, hogy az állati és humán törzseket eltérő mértékben és összetételben érő antibiotikum hatás bizonyos gazda-specifikus antibiotikum rezisztencia génmintázatok esetében gazdaspecifikus szelekcióhoz vezethet. Így például a humán oldalon a súlyos bakteriális fertőzések kezelésére a gentamicin és  $\beta$ -laktám együttes használata általában a megfelelő rezisztencia geno- és fenotípusok kialakulásához vezet, mely sokkal gyakoribb a humán *E. coli* törzsekben, mint az állati eredetűekben (Schønheyder, Højbjerg 1995). Ezzel összhangban, a 3. generációs cefalosporinokkal szembeni rezisztenciát mi itt mindössze néhány szarvasmarha törzsben mutattuk ki. A gentamicin és egyéb aminoglikozid

rezisztenciában szerepet játszó *aac(3)-I*, *ant(2<sup>''</sup>)-Ia* és *aac(6<sup>'</sup>)-Ib* gének szinte kizárólag a humán *E. coli* törzseket jellemezték. Ehhez hasonlóan a klóramfenikol rezisztenciáért felelős *catB3* gén is csak a humán törzsekben volt kimutatható. Ezen eredmények a fenti rezisztencia determinánsokra vonatkozó humán rezervoár lehetőségére mutatnak rá, amely minden valószínűség szerint az állati törzsektől függetlenül, a humán kezelések nyomán alakulhatott ki. Érdekes viszont, hogy a humán törzsek túlnyomó többségében a „humán specifikus” *aac(6<sup>'</sup>)-Ib* és az általánosan előforduló *aac(3)-II* gének együttes jelenlétét mutattuk ki, ami e két gén eltérő plazmidokon való lokalizációjára és egymástól időben eltérő felvételére utal.

Ezzel szemben a haszonállatokból és szennyvízből izolált *E. coli* törzsek fluorokinolon rezisztencia fenotípusának jellemzése és humán törzsekkel való összehasonlítása felveti a humán törzsekben kimutatott kinolon rezisztencia állati-, főként baromfi eredetének lehetőségét (Johnson et al. 2007, Sabaté et al. 2008, Taylor et al. 2008, Thorsteinsdottir et al. 2010). E feltételezés valóságértékét az is alátámasztja, hogy a fluorokinolonokat és kinolonokat gyakran használják a baromfi fertőzések kezelésére, amely természetesen igen kedvezően hat a rezisztens *E. coli* törzsek szelekciójára (Hammerum, Heuer 2009, Johnson et al. 2006). A humán és baromfi *E. coli* törzsek nalidixinsav és ciprofloxacín rezisztencia fenotípusának gyakorisága között szignifikáns eltérést mi sem találtunk, viszont a rezisztens törzsek rezisztencia és virulencia génmintázatai meglehetősen különböznek egymástól. E genetikai differenciára vonatkozó eredményeink összhangban vannak Graziani et al. (2009) megfigyeléseivel, akik a ciprofloxacín rezisztens humán és baromfi eredetű extraintestinalis *E. coli* (ExPEC) törzsek filogenetikai különbözőségére mutattak rá.

A fentiek alapján általában elmondható, hogy a rezisztencia fenotípusra vonatkozó eredmények megfelelő összhangot mutatnak. Ez alól természetesen a kinolon rezisztencia képez kivételt, hiszen a kinolon rezisztencia kromoszómán lokalizált génjeinek (*gyrA*, *B*, *parC*, *E*) szekvencia szintű vizsgálatára az itt használt AMR05 microarray nem volt alkalmas (Batchelor et al. 2008). Továbbá, néhány fenikol (*catA1*, *catB3*) streptomycin (*strA*, *B*), trimetoprim (*dfp*), tetraciklin (*tet(A, B)*) vagy a szulfametoxazol rezisztenciában részt vevő *sul1* gének jelenléte sem mindig járt együtt a megfelelő rezisztencia fenotípussal. Ennek egyik oka lehet az adott antibiotikum rezisztencia gén sérült volta vagy valamely okból bekövetkező csökkent expressziója (Fluit, Schmitz, 1999).

Néhány tetraciklin, szulfametoxazol, trimetoprim és gentamicin rezisztenciát mutató *E. coli* törzs esetén viszont a jelenség fordítottját is megfigyelhettük, azaz a rezisztencia fenotípus háttérében nem álltak a megfelelő rezisztencia gének. A gentamicin esetében ennek részben technikai magyarázata lehet, ugyanis az AMR05 microarray a gentamicin rezisztenciát meghatározó számos, aminoglikozid módosító enzimet kódoló génvariáció közül csak néhányra (*aac(3)-I*, *aac(3)-IV*, *ant(2<sup>''</sup>)-Ia*) „keresett rá” (Batchelor et al. 2008). Ezt

támasztják alá további, kiegészítő PCR vizsgálataink is, melyek segítségével a leggyakoribb gentamicin rezisztencia gén, az *aac(3)-II* jelenlétét egy kivétellel a fenti néhány törzs mindegyikében kimutattuk.

Az antibiotikum rezisztencia génekhez hasonlóan Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzsek virulencia génmintázata is heterogenitást mutatott. A virulencia gének közül leggyakrabban a szérum rezisztenciában részt vevő *iss* gént mutattuk ki, amely a klinikai háttértől függetlenül a törzsek 70%-át jellemezte. Az *iss* gén eddigi ismereteink szerint főként a patogén törzseket jellemzi. Így korábban feltételezték, hogy a törzsek patogenitásának megfelelő indikátora lehet (Johnson et al. 2008, Nolan et al. 2003, Pfaff-McDonough et al. 2000), gyakorisága ezért a kommenzalista törzseinkben meglepőnek tűnt. Hasonló a helyzet a néhány baromfi és humán kommenzalista törzsben kimutatott *tsh* és *sat* SPATE génekkel is, melyeket korábban kizárólag humán és állati patogén *E. coli* törzsekben mutatták ki (Parham et al. 2005). Fontos megjegyezni viszont, hogy egy virulencia gén pusztán jelenléte nem feltétlenül jár együtt annak expressziójával, ami két független, sertés eredetű élelmiszer mintából származó kommenzalista *E. coli* törzsünkben azonosított T3SS effektor génekre (*astA*, *nleA*, *espA*, *B*, *F*) is igaz lehet.

Mint a fentiek is jelzik, a klinikai törzsekkel ellentétben nagyon keveset tudni a haszonállatokból és humán mintákból származó kommenzalista *E. coli* törzsek virulencia tulajdonságairól. A fenti T3SS effektorok, és az *eae* (intimin) gén néhány kommenzalista *E. coli* törzsünkben való azonosítása megerősíti és gazdagítja az egészséges szarvasmarhákból (Tóth et al. 2009) valamint broiler csirkékből (Diarrassouba et al. 2007) származó *E. coli* törzsekre vonatkozó eredményeket.

Összességében tehát elmondható, az antibiotikum rezisztencia és virulencia mintázatok tekintetében nincs szignifikáns különbség a különböző gazdafajokból izolált *E. coli* törzsek között, de a kommenzalista és klinikai összehasonlítása tekintetében a rezisztencia gének – ahogyan várható volt - nagyobb számban fordultak elő a klinikai *E. coli* törzsekben. Ugyanakkor a várakozással ellentétben a virulencia gének többsége klinikai háttértől függetlenül fordult elő. Bizonyos antibiotikum rezisztencia gének és mintázataik viszont kizárólag a humán törzseket jellemzik. E helyen kell rámutatnunk tehát arra az eddig fel nem tárt veszélyre, amit az ismert kórokozó *E. coli* törzseken túl az állatokban és az állati eredetű élelmiszerekben előforduló kommenzalista *E. coli* törzsek is jelenthetnek, a feltűnően gyakori virulencia és antibiotikum rezisztencia determinánsaik alapján.

Néhány antibiotikum rezisztencia és virulencia gén között és azokon belül szoros korrelációs kapcsolatokat mutattunk ki, amelyek a *dfra17* trimetoprim, és az *aadA4* streptomycin rezisztencia gének közötti asszociáció kivételével bizonyos gazdafajokat jellemeztek. Ennek megfelelően a *catB3*, *aac(6')-Ib* és *bla<sub>CTX-M-1</sub>* rezisztencia gének és a *sat* SPATE gén kapcsolatát a humán törzsekben, míg a *tet(A)* együttállását az *iroN* és *iss*

virulencia génekkel a baromfi törzsekben mutattuk ki. Az ehhez hasonló antibiotikum rezisztencia és virulencia gének közötti korrelációk nagyméretű ún. hibrid (rezisztencia és virulencia géneket egyaránt tartalmazó) plazmidok esetleges hordozásának lehetőségét vetik fel az adott *E. coli* törzsekben (Johnson et al. 2010, Nógrády et al. 2006). Erre vonatkozó előzetes plazmidprofil vizsgálataink is ezt látszanak alátámasztani, ugyanis csoportonként kiválasztott (3 – 3), összesen 12 törzs közül tízben ~150 – 255 kb méretű plazmidok jelenlétét mutattuk ki (a részletes eredményeket mellőzzük). További vizsgálatokkal tervezzük majd fényt deríteni ezen plazmidok virulenciában és multidrog rezisztenciában betöltött szerepére is.

Következtetésként elmondható, hogy a különböző eredetű és klinikai háttérű gentamicin rezisztens *E. coli* törzsekben a gentamicinnel szembeni rezisztencia multidrog rezisztencia mechanizmusokkal társult, és mind a fenotípus szintjén leggyakrabban a tetraciklin, ampicillin és szulfametoxazol rezisztenciával járt együtt. Összehasonlító genotipizáló vizsgálataink eredményei szerint az antibiotikum rezisztencia gének többsége, valamint néhány virulencia gén a gazdafajtól és klinikai háttértől függetlenül fordult elő az egyes *E. coli* törzsekben, a rezisztencia és virulencia mintázatok nagyfokú variabilitását eredményezve. A vizsgált humán és állati eredetű klinikai és kommenzalista törzsekben bizonyos rezisztencia és virulencia gének közötti asszociációk megléte az *E. coli* fertőzések hatékony terápiás lehetőségeit ennek eredőjeként tovább szűkítheti, és a rezisztencia fenotípus vizsgálata mellett a rezisztencia és virulencia tulajdonságokat hordozó genetikai vektorok ismeretének szükségességét hangsúlyozza. A rezisztencia fenotípus valamint a virulencia gének mintázatának együttes jellemzése a kommenzalista és klinikai *E. coli* törzsekben ugyanis előrevetítheti a humán és állati szempontból egyaránt jelentős új hibrid genotípusok megjelenését, mint ahogyan azt az idén Németországban felbukkanó hemolitikus urémiás szindrómát (HUS) okozó O104:H4 *E. coli* járványtörzs vonatkozásában is láttuk (Bielaszewska et al. 2011).

## 4. A *qnrS1*, plazmidon kódolt kinolon rezisztencia gén azonosítása és kinolon rezisztenciát hordozó plazmidok jellemzése sertés eredetű multirezisztens *E. coli* törzsekben

### 4.1. Bevezetés

Az kinolon antibiotikumok a humán és állatorvosi gyakorlatban az enterobakteriális eredetű fertőzések kezelésére a 80-as évek közepe óta egyre szélesebb körben használatosak, melyek az előzetes reményekkel ellentétben hamarosan a rezisztencia megjelenéséhez vezettek, elsősorban a *Klebsiella*, *Salmonella* és az *E. coli* törzsek körében (Webber, Piddock 2001). A kinolon rezisztenciáért főként kromoszómális gének felelősek, melyek pontmutációi a DNS giráz (*gyrA* és *gyrB*), valamint a IV-es típusú topoizomeráz (*parE* és *parC*) enzimek alegységeinek kinolonok általi funkciógátlását akadályozzák meg. Az *E. coli* törzsek kinolon rezisztenciájáért elsősorban a fenti két célnzim A alegységét kódoló *gyrA* illetve *parC* génekben bekövetkező változások felelősek. Az *E. coli* törzsek esetében a mutáció elsősorban a *gyrA* és a *parC* géneket érinti, amely a GyrA esetében a Ser83→Leu, és az Asp87→Asn, Tyr; míg a ParC esetében a Ser80→Arg, Ile valamint a Glu84→Lys, Val aminosav cserékben nyilvánulhat meg (Fàbrega et al. 2008).

Emellett viszont a plazmidon kódolt kinolon rezisztencia is világszerte egyre növekvő problémát jelent (Poirel et al. 2008, Strahilevitz et al. 2009). A plazmidon kódolt kinolon rezisztencia részben a Qnr fehérjék (QnrA-D és QnrS) jelenlétének tulajdonítható, amelyek megvédik a bakteriális DNS duplikálásához, átírásához, javításához és rekombinációjához szükséges fent említett II-es típusú topoizomeráz enzimeket a kinolonok gátló hatásától. Bár a Qnr fehérjék önmagukban csak alacsony szintű kinolon rezisztenciát határoznak meg, mely nem feltétlenül jelenik meg klinikai értelemben vett rezisztenciaként, de e plazmidon kódolt kinolon rezisztencia determinánsok elősegíthetik egyéb kromoszómális rezisztencia mechanizmusok szelekcióját, amely végül magas kinolon rezisztenciával rendelkező törzsek megjelenéséhez vezethet (Martínez-Martínez et al. 2008, Poirel et al. 2008).

Újabb összefoglaló tanulmányok szerint (Strahilevitz et al. 2009) a *qnrS1* génvariáns egyike a leggyakrabban közölt plazmidon kódolt kinolon rezisztencia géneknek a humán és állati eredetű enterális baktériumok körében egyaránt. Ennek ellenére nagyon kevés információ áll rendelkezésünkre az állatokból izolált *E. coli* törzsek *qnrS1* plazmidjairól (Cerquetti et al. 2009, Huang et al. 2009, Literak et al. 2010, Xia et al. 2010), ezen belül pedig az európai sertés eredetű *E. coli* törzsek *qnrS1* plazmidjait még egyáltalán nem jellemezték. A *qnrS1* gént hordozó IncN plazmidokat korábban csupán humán klinikai esetekből származó *Salmonella enterica* (García-Fernández et al. 2009, Hopkins et al.

2007), *E. coli* (Karah et al. 2010) és *Klebsiella oxytoca* (Carattoli et al. 2010) törzsekben mutatták ki. Állati eredetű *qnrS1* IncN plazmidokat egyelőre csak lengyelországi vízimadarakból izolált *E. coli* törzsekben találtak (Literak et al. 2010).

A széles spektrumú antibiotikumok, mint pl. a tetraciklinek, aminoglikozidok és a kinolonok használata a nagy állatszámú sertéstelepeken fel-felbukkanó enterális vagy légúti megbetegedések leküzdésére gyakran nélkülözhetetlen. Ez viszont a multidrog rezisztens (MDR) törzsek megjelenésének melegágya lehet (Webber, Piddock 2001).

Ennek megfelelően a jelen tanulmány célja két, hagyományosan gazdag sertéstenyésztői múlttal rendelkező és jelenleg is intenzív sertéstartással jellemezhető ország, Románia és Magyarország egy-egy nagyüzemi sertéstelepének felméréséből származó MDR *E. coli* törzsek esetleges plazmidon kódolt kinolon rezisztenciájának felkutatása és jellemzése.



## 4.2. Anyagok és módszerek

### 4.2.1. Mintavételezés

E tanulmány alapját képező baktérium törzseket egy nemzetközi (EU FP6) együttműködés keretében gyűjtöttük, mely együttműködés egészséges sertések multidrog rezisztens (MDR) *E. coli* törzseinek izolálására irányult. Az együttműködés során két szomszédos, gazdag sertéstenyésztő múlttal rendelkező ország, Magyarország és Románia egy-egy nagy állatszámú (egyenként >500 kocát számláló) sertéstelepének egészséges, választás előtti malaciból bélsártampon mintákat gyűjtöttünk. E célból telepenként 50-50, megközelítőleg kéthetes, egészséges állatot mintáztunk meg.

Mivel előzetes tanulmányainkban (Szmolka et al. 2011) azt tapasztaltuk, hogy a gentamicin a MDR megfelelő indikátora lehet, a fenti bélsártampon mintákat 10-10 ml gentamicin tartalmú (600 µg/ml) TSB (Tryptic Soy Broth, BD-Diagnostic Systems) táplevesben szelektíven dúsítottuk egy éjszakán keresztül 37°C-n. Másnap a szelektív levesekből mintánként 10-10 µl-nyit az alábbi tápagarokra szélesztettünk ki: a) LB (Luria-Bertani) agar (BD-Diagnostic Systems); b) juhvéres Columbia agar (BD-Diagnostic Systems); c) gentamicines (600 µg/ml) BTK (Brómtimolkékes) differenciáló agar (Merck), a célzott rezisztenciájú laktóz-pozitív coliform telepeknek a háttérflórától való könnyebb elkülöníthetősége miatt.

### 4.2.2. A *qnrS* gént tartalmazó *E. coli* törzsek azonosítása

Ezt követően mintánként a gentamicin rezisztencia fenotípust mutató reprezentatív coliform telepeket újabb átoltásokkal kitisztítottuk, melyek faji szintű beazonosítása az API-20E (bioMérieux) vizsgáló készlet biokémiai reakciói segítségével történt. A biokémiai reakciók kiértékelésekor faj-kontrollként az ATCC 25922 *E. coli* referencia törzset használtuk. Ezúton az említett két sertés telepről gyűjtött összesen 100 bélsár mintából 41 gentamicin rezisztens *E. coli* törzset izoláltunk, melyek közül 39 a román, míg a fennmaradó 2 törzs a magyar sertés telepről származott. Az első körben gentamicin rezisztenciával jellemzett MDR-t egyidejűleg három vagy annál több antibiotikum csoporttal szembeni rezisztenciaként definiáltuk, melyet a későbbiekben kiemelt törzsek esetében verifikáltunk. Az *E. coli*-ként azonosított törzseket -80°C-n 10% glicerint tartalmazó TSB táplevesben tároltuk.

A 41 MDR *E. coli* törzsben a *qnrS* gén jelenlétének vizsgálata PCR segítségével történt, a használt primereket a XV. táblázat tartalmazza. A *qnrS*-pozitív *E. coli* törzsek közül 6 reprezentatív törzset (melyek mindegyike a román sertés telepről származott) további fenotíp és genotípizáló vizsgálatokra (beleértve a *qnrS* és *bla*<sub>TEM</sub> gének tipizálását és a multilókusz szekvencia típus meghatározását is), valamint plazmid-transzfer vizsgálatokra jelöltünk ki.

Sajnos ennél több törzs részletes molekuláris jellemzésére a szűkös technikai keretek miatt nem volt lehetőségünk.

**XV. táblázat.** Az antibiotikum rezisztencia gének kimutatásához és tipizálásához (\*) valamint a *qnrS1* inszert szekvenálásához használt primerek listája.

Primer	Szekvencia (5'→3')	Hivatkozás / Reakciókörülmények *
1. Antibiotikum rezisztencia gének kimutatása		
qnrS-F *	TGGAAACCTACAATCATACATATCG	Hopkins et al. 2007
qnrS-R *	TTAGTCAGGATAAACAACAATACCC	
TEM-F *	CATTTTCGTGTCGCCCTTAT	Hopkins et al. 2007
TEM-R *	TCCATAGTTGCCTGACTCCC	
strA-F	CCTGGTGATAACGGCAATTC	Rosengren et al. 2009
strA-R	CCAATCGCAGATAGAAGGC	
strB-F	ATCGTCAAGGGATTGAAACC	Rosengren et al. 2009
strB-R	GGATCGTAGAACATATTGGC	
TETAfw4	GGCCTCAATTCCTGACG	Guillaume et al. 2000
TETARV1	AAGCAGGATGTAGCCTGTGC	
dfr12-f	GAGCTGAGATATACTCTGGCACT	Grape et al. 2007
dfr12-r	GTACGGAATTACAGCTTGAATGGT	
sul2-F	CGGCATCGTCAACATAACC	Maynard et al. 2003
sul2-R	GTGTGCGGATGAAGTCAG	
int1.F	GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG	Mazel et al. 2000
int1.R	ACATGGGTGTAATCATCGTC	
int2.F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	Mazel et al. 2000
int2.R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	
2. Virulencia gének kimutatása		
cba f	GGACGAATTCGGGCGGTGA	94C° 4' 30x(94C° 30" 62C° 30" 72C° 30") 72C° 7'
cba r	GCGGAAACTTTCTCGTTTCC	
cma f	TGCCTGGTGCTGGCCCTCTT	94C° 4' 30x(94C° 30" 62C° 30" 72C° 30") 72C° 7'
cma r	TCATAAACGCTTATTCCAGGGT	
iss f	TCTGCCGCTCTGGCAATGCT	94C° 4' 30x(94C° 30" 64C° 30" 72C° 30") 72C° 7'
iss r	CCCGGGCTTCCAGCGGAGTAT	
katP Fw	GCGCCAGTGGTGGTCAGCAA	Bustamante et al. 2011
katP Rv	ATATCGGGCTGCCGGTCCCA	
SEPAb-L	TAAAACCCGCCGCTGAGTA	Boerlin et al. 2005
SEPAb-R	TGCCGGTGAACAGGAGTTT	
2. A <i>qnrS1</i> inszert szekvenálása		
M13 fw	GTAAAACGACGGCCAGT	Zero Background™ Cloning Kit
M13 rv	CAGGAAACAGCTATGAC	
is-qnr rv	TATGGTTATCGCCGTGTGTG	jelen tanulmány
P1	GGCGTCGTACACCGCAGGAA	jelen tanulmány
P2	AACAGCCGTCAAGTAAACCG	jelen tanulmány
P3	AGGCGCGGACATGAGACAC	jelen tanulmány

\*: saját tervezésű primerekkel futó PCR reakció körülményei

#### **4.2.3. A kiválasztott sertés eredetű *qnrS1* *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia fenotípusának és virulencia génjeinek jellemzése**

A kiválasztott 6 *E. coli* szülő törzs antibiotikum rezisztencia fenotípusának meghatározása valamint a rezisztencia és virulencia gének mintázatának jellemzése az előző fejezet 3.2.2. illetve 3.2.3. alpontjaiban írottak szerint, a Sensititre® (fenotípus) valamint az AMR05 illetve az Ec03 miniatűr PCR microarray (genotípus) rendszerek felhasználásával történt (Anjum et al. 2007, Anjum et al, 2011). Az AMR05 rezisztencia génpalettáját a kromoszómális kinolon rezisztenciát meghatározó *gyrA* és *parC* gének pontmutációinak PCR vizsgálatával egészítettük ki. A *gyrA* gén megfelelő szakaszának felerősítésére az 5'-ACGTACTAGGCAATGACTGG-3' valamint az 5'-AGAAGTCGCCGTCGATAGAAC-3' primereket használtuk, míg a *parC* esetében az 5'-TGTATGCGATGTCTGAACTG-3' és 5'-CTCAATAGCAGCTCGGAATA-3' primer párokkal dolgoztunk (Everett et al. 1996), majd a kapott PCR fragmenteket megszekvenáltuk.

A szülő törzsektől eltérően a transzkojugáns/transzformáns törzsek rezisztencia fenotípusának vizsgálata korongdiffúzióval történt, a ciprofloxacinra és a nalidixinsavra vonatkozó MIC értékeket E-teszt segítségével határoztuk meg, a ciprofloxacin esetében a 0.02-32 µg/ml míg a nalidixinsav esetében pedig a 0.16-256 µg/ml tartományban. Az eredmények interpretálása ugyancsak az említett fejezetben már leírtak szerint történt.

#### **4.2.4. Multilókusz szekvencia tipizálás (MLST)**

Az egyazon sertéstelepről származó 6 *qnrS1* sertéstörzs klonális kapcsolatát MLST segítségével határoztuk meg Tartof et al. (2005) leírása alapján. A használt *E. coli* MLST az alábbi hét háztartási gén PCR fragmentjeinek szekvenálásán alapult: *adk* (adenilát kináz), *fumC* (fumarát hidratáz), *gyrB* (DNS giráz), *icd* (izocitrát dehidrogenáz), *mdh* (malát dehidrogenáz), *purA* (adenilo-szukcinát szintetáz), valamint a *recA* (ATP/GTP kötőhely) géneken. A kapott szekvenciákat az *E. coli* MLST adatbázis (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) szerint értékeltük ki, és a törzsek multilókusz szekvencia típusát (ST) a fenti háztartási gének mutációi alapján határoztuk meg.

#### **4.2.5. Plazmid profil vizsgálatok és a *qnrS1* plazmidok jellemzése**

A *qnrS1* gént hordozó plazmidok jellemzése céljából konjugációs kísérleteket végeztünk, recipiens törzsként a plazmidmentes *E. coli* K-12 XL1-Blue MR nalidixinsav rezisztens törzset használva. A recipiens törzs genotípusáról bővebb információt a SuperCos 1 Cosmid Vector Kit (Stratagene) használati útmutatója szolgáltat. A transzkonjugáns törzsek szelekciója a laktóz-negatív recipiensre való tekintettel nalidixinsav (50 µg/ml) és ampicillin (60 µg/ml) tartalmú LB és BTK agar lemezekon történt. Az Ec 36 jelű törzs esetében a konjugáció nem volt sikeres, ezért ebből a törzsből a PureLink HiPure Plasmid Filter

Midiprep Kit (Invitrogen) gyártói utasításai szerint plazmidot tisztítottunk, majd hősokk transzformációval az *E. coli* TOP10 kémiai kompetens sejtekbe (One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*; Invitrogen) vittük át, majd a transzformáns sejteket ciprofloxacinnal (0.06 µg/ml) tartalmú LB agar lemezen szelektáltuk. A szülő törzsek és transzkonjugánsok/transzformánsok plazmid profil vizsgálata Kado, Liu (1981) módszere alapján történt.

A *qnrS1* és egyéb, a szülő törzsekben az AMR05 illetve az Ec03 PCR microarray rendszerekkel azonosított antibiotikum rezisztencia és virulencia gének jelenlétét a transzkonjugánsokban/transzformánsokban PCR segítségével verifikáltuk, a XIV. táblázatban listázott primerek felhasználásával.

#### **4.2.6. PCR alapú replikon tipizálás**

A szülő és transzkonjugáns/transzformáns törzsekben levő plazmidok inkompatibilitási csoportjának (Inc) meghatározása PCR alapú replikon tipizálással (PBRT) történt, a Carattoli et al. (2005) által közölt primerekkel és reakciókörülményeknek megfelelően. A PBRT rendszer multiplex és simplex PCR vizsgálataihoz templátként szolgáló genomi DNS-t a Wizard Genomic DNA Purification System (Promega) segítségével vontuk ki. A fenti közleményben megnevezett Inc csoportok mellett a replikon tipizálási vizsgálatokat a ColE-szerű ( $colE_{Tp}$ ), IncU és IncR csoportokra is kiterjesztettük (García-Fernández et al. 2009).

#### **4.2.7. Restrikciós fragmenthossz polimorfizmus analízis (RFLP) és Southern hibridizáció**

Az RFLP vizsgálatokhoz a plazmidokat az érintett *E. coli* szülő törzsekből és transzkonjugánsokból/transzformánsból a PureLink HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen) segítségével a gyártói útmutatásoknak megfelelően vontuk ki. A transzkonjugánsok/transzformánsokban levő *qnrS1* gént hordozó IncN plazmidokat *PvuII* enzimmel (Bioline) 1 órát emésztettük, majd a fragmenteket 0.8%-os agaróz gélben szeparáltuk. Az RFLP fragmenteket, valamint az emésztetlen plazmid DNS-t pozitív töltésű nylon membránra (Roche Applied Science) blottoltuk. Az IncN- és a *qnrS1*-specifikus próbák jelölése a PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Applied Science) felhasználásával történt a gyártó útmutatásai szerint, míg a hibridizált DNS-t a DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche Applied Science) segítségével mutattuk ki. Az *E. coli* *qnrS1* plazmidok restrikciós mintázatának értékelésekor kontrollként két holland, humán eredetű *qnrS1*-pozitív *Salmonella* Kentucky transzformáns törzset használtunk (García-Fernández et al. 2009).

#### 4.2.8. A *qnrS1* inszert klónozása és szekvenálása

A *qnrS1* gén genetikai környezetét az Ec 48-1 jelű transzkonjugáns törzsön jellemeztük, és ez esetben az előzőekben használt *PvuII* helyett a *PstI* restrikciós enzimmel dolgoztunk. A restrikciós hasítással kapott fragmenteket a pZero-2.1 vektorba (Invitrogen) ligáltuk a klónozó kit útmutatója szerint. Az enzimcsere oka az volt, hogy az előzetes kísérletekben a *PvuII* fragmentek ligálása a fenti vektorba nem járt sikerrel. A ligátumot hősokk transzformációval az *E. coli* TOP10 kémiai kompetens sejtekbe (One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*; Invitrogen) juttattuk. A *qnrS1* fragment klónjaira kanamicin (100 µg/ml) és ciprofloxacín (0.06 µg/ml) kombinációt tartalmazó LB agar lemezen szelektáltunk, majd a *qnrS1* inszert szekvenálására egyetlen klónt jelöltünk ki. A kijelölt klónból a rekombináns plazmidot Qiagen Plasmid Miniprep Kit (Qiagen) felhasználásával vontuk ki. A plazmid *PstI* hasítása egy 3.6 kb méretű *qnrS1* inszertet eredményezett, melynek teljes szekvenálásához használt primereket a XIV. táblázat tartalmazza. A szekvenciát a Geneious szoftvercsomag segítségével elemeztük és hasonlítottuk össze a génbanki adatokkal. Az Ec 48-1 *E. coli* törzs 3.6 kb méretű *qnrS1* gént tartalmazó fragmentjét a JN157839 génbanki szám alatt helyeztük el.

### 4.3. Eredmények

#### 4.3.1. A *qnrS1* gén kimutatása és a vizsgált sertés *E. coli* törzsek klonális kapcsolata

A 41 Gen<sup>R</sup>/MDR sertés *E. coli* törzsek közül a *qnrS* gént összesen 17 törzsben mutattuk ki, melyek mindegyike a romániai sertéstelepről származott. Hat általunk kijelölt *qnrS*-pozitív törzs esetében a *qnrS* PCR fragment szekvenálásával valamennyi törzsben a *qnrS1* génvariánst azonosítottuk.

Multilókusz szekvencia tipizálás alapján a 6 *qnrS1 E. coli* törzs az alábbi három szekvencia típusba (ST) tartozott: a 48, 206 és 542 típusokba (XVI. táblázat).

**XVI. táblázat.** A *qnrS1 E. coli* szülőtörzsek és transzkonjugánsok/transzformáns klonális kapcsolata, valamint antibiotikum rezisztencia és virulencia génmintázata.

Törzs	ST	Rezisztencia gének	Integron típus	Virulencia gének
Ec 10	ST542	<i>qnrS1, strA, strB, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A), dfrA12</i>	<i>int11</i>	-
10-11 tk		<i>qnrS1, strA, strB, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A)</i>	<i>int11</i>	-
Ec 29	ST206	<i>qnrS1, strA, strB, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A)</i>	<i>int11</i>	-
29-1 tk		<i>qnrS1, strA, strB, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A)</i>	<i>int11</i>	-
Ec 36	ST48	<i>qnrS1, strA, strB, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A), sul2</i>	<i>int11</i>	-
36 t		<i>qnrS1, strA, strB, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A)</i>	<i>int11</i>	-
Ec 40	ST48	<i>qnrS1, strA, strB, aadA1-like, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A)</i>	<i>int11, int12</i>	<i>cba, cma, sepA, iss, katP</i>
40-1 tk		<i>qnrS1, strA, strB, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A)</i>	<i>int11</i>	-
Ec 48	ST542	<i>qnrS1, strA, strB, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A), sul2</i>	<i>int11</i>	-
48-1 tk		<i>qnrS1, strA, strB, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A)</i>	<i>int11</i>	-
Ec 49	ST48	<i>qnrS1, strA, strB, aadA1-like, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A)</i>	<i>int11, int12</i>	<i>cba, cma, sepA, iss, katP</i>
49-2 tk		<i>qnrS1, bla<sub>TEM-1</sub>, tet(A)</i>	<i>int11</i>	<i>cba, cma, sepA, katP</i>

Jelölések: tk: transzkonjugáns; t: transzformáns.

#### 4.3.2. A *qnrS1 E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia fenó- és genotípusa és virulencia génjei

Annak ellenére, hogy eltérő szekvencia típusba tartoztak, a 6 törzs antibiotikum rezisztencia mintázata nagyfokú hasonlóságot mutatott. A gentamicinen kívül valamennyien rezisztensek voltak egyéb aminoglikozidokra (kanamicin és streptomycin) is, de az ampicillin és tetraciklin rezisztencia is közös jellemzőjük volt (a részletes eredményeket mellőzzük). Ami a kinolon rezisztenciát illeti, MIC értékeik alapján a törzsek csökkent érzékenységet mutattak a ciprofloxacinnal és a nalidixinsavval szemben: MIC<sub>ciprofloxacinnal</sub>: 0.25-0.5 µg/ml, MIC<sub>nalidixinsav</sub>: 4-16 µg/ml.

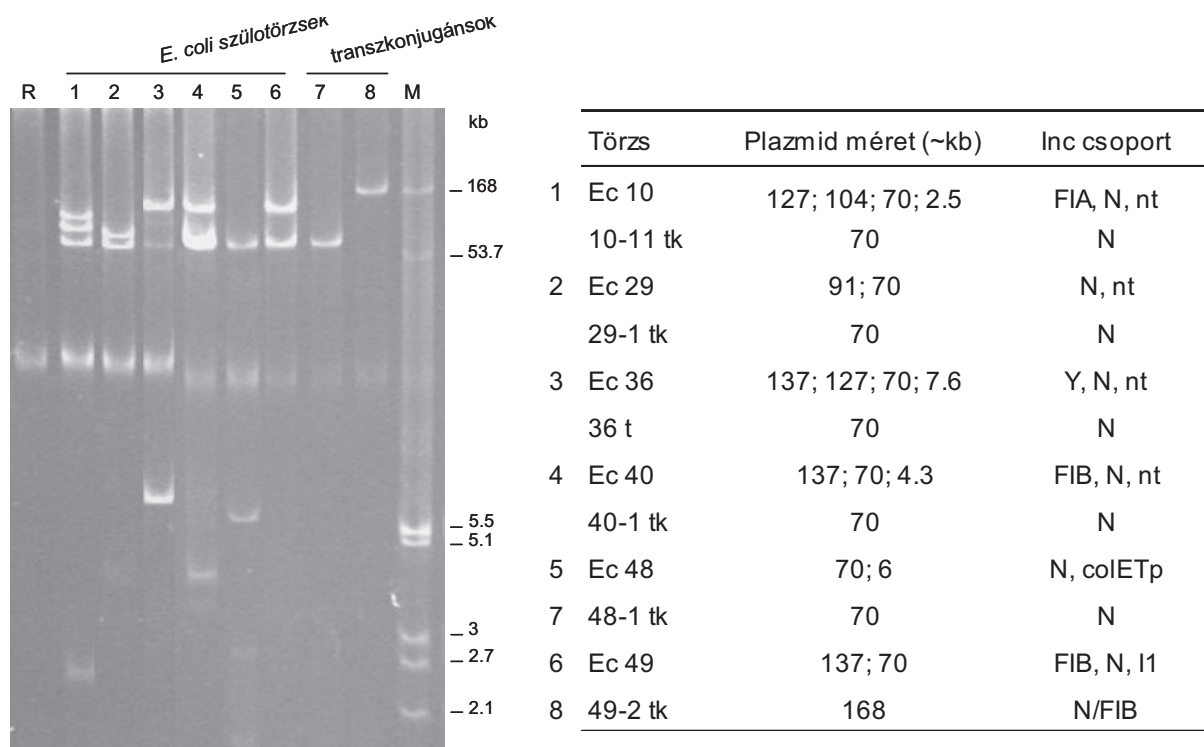
Az antibiotikum rezisztencia géneknek AMR05 PCR microarray-el való feltérképezése az antibiotikum rezisztencia fenotípusra vonatkozó eredményeket teljes egészében megerősítette, így a streptomycin rezisztenciáért felelős gének közül az *aadA1*, *strA*, *strB* géneket, a *bla*<sub>TEM-1</sub> ampicillin rezisztencia gént valamint a *tet(A)* tetraciklin rezisztencia gént azonosította. A ciprofloxacinnal és nalidixinsavval szembeni csökkent érzékenység nagy valószínűséggel a *qnrS1* gén jelenlétének köszönhető, ugyanis a *gyrA* és *parC* génekben az említett, *E. coli*-ra leginkább jellemző pontmutációk egyikét sem mutattuk ki. Továbbá az említett feno- és genotípusok mellett két törzsben a *sul2* szulfametoxazol, míg egy törzsben a trimetoprim rezisztenciáért felelős *dfrA12* gént mutattuk ki a megfelelő rezisztencia fenotípusok mellett. Mind a 6 *E. coli* törzsben megtaláltuk az 1-es típusú integron jelenlétére utaló *int11* gént, míg az *int12* pozitívitás alapján két törzs 2-es típusú integront hordozott (XVI. táblázat).

Az Ec03 microarray adatai szerint viszont virulencia gének tekintetében a vizsgált törzsek meglehetősen szegényesek voltak, és jelenlétük csupán az Ec 40 és Ec49 jelű törzseket jellemezte. A fenti két, az ST48 klónba tartozó törzs antibiotikum rezisztencia mintázata megegyezett, és virulencia génjeik is azonosak voltak, és egyidejűleg több különböző virulencia mechanizmust képviseltek. Ennek értelmében a *cba*, *cma* bakteriocin gének mellett, a szérum rezisztenciában szerepet játszó *iss* gént, egy SPATE fehérjét kódoló *sepA* gént továbbá a kolonizációt elősegítő kataláz-peroxidáz *katP* gént azonosítottuk.

#### **4.3.3. A *qnrS1 E. coli* törzsek plazmid profilja és a *qnrS1* gént hordozó IncN plazmidok jellemzése**

A plazmid profil vizsgálatok számos plazmid együttes jelenlétére mutattak rá a *qnrS1 E. coli* szülő törzsekben, leggyakrabban 2-4 plazmid jellemezte a törzseket, melyek mérete tág határok között ~2.5 – 137 kb között változott (6. ábra).

A konjugációs plazmid transzfer öt törzs esetében volt sikeres, míg az Ec 36 jelű törzsnél transzformációra volt szükség. A szülő törzsek PCR alapú plazmid replikon tipizálási vizsgálata egyetlen közös, az IncN típusú plazmidot mutatott ki, melynek mérete ~70 kb. Az IncN plazmidok leggyakrabban az IncF (FIA és FIB) plazmidokkal együtt fordultak elő, de három különböző törzsben IncY, Inc11 és colE<sub>TP</sub> típusú plazmidokkal is társultak. A plazmidok egy része a fenti PBRT rendszerrel nem volt tipizálható (6. ábra).



**6. ábra.** A *qnrS1* *E. coli* szülő és transzkonjugáns/transzformáns (tk/t) törzsek plazmid profilja és a plazmidok replikon típusa.

Annak okán, hogy a legtöbb transzkonjugáns plazmid mintázata azonos, az ábrán csak két reprezentatív törzs (48-1 tk és 49-2 tk) eltérő méretű (~70 és 168 kb) plazmidjait tüntettük fel.

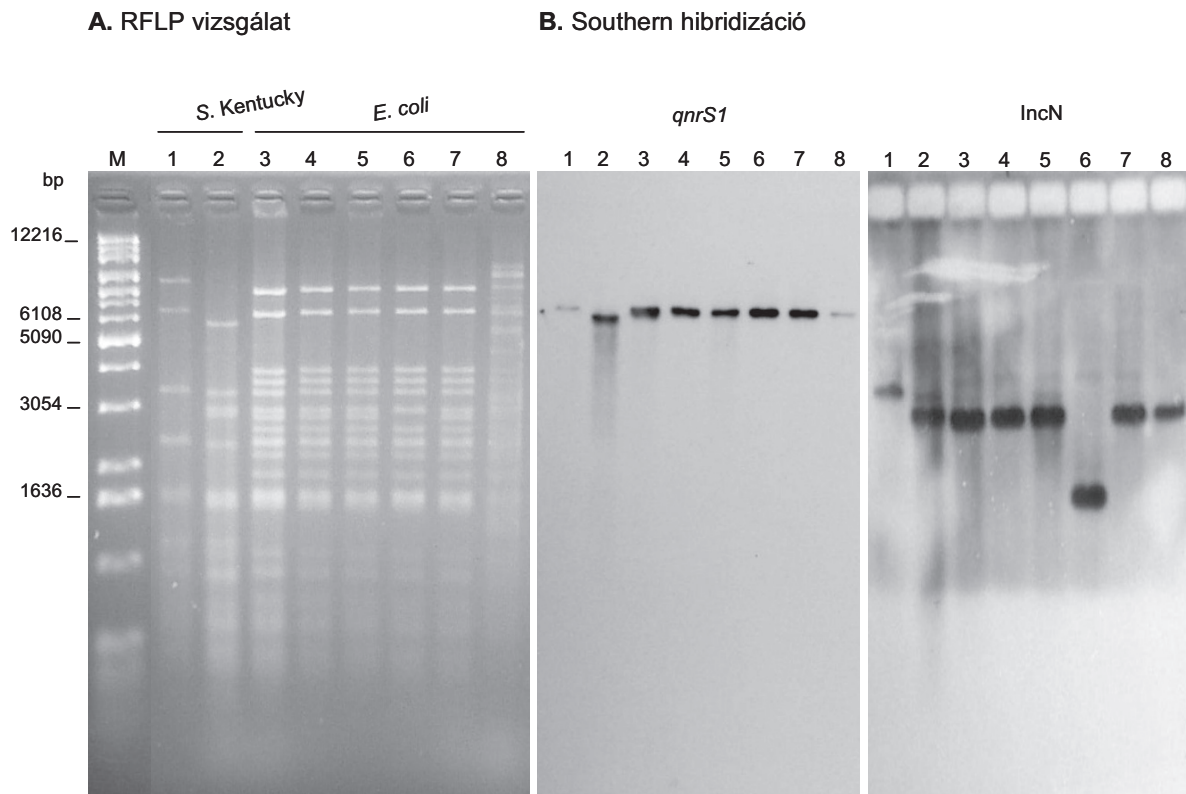
Jelölések: R: *E. coli* K12 XL1 recipiens; 1-6 sorok: *qnrS1* szülő törzsek (Ec 10, Ec 29, Ec 36, Ec 40, Ec 48 és Ec 49); 7 sor: a ~70 kb IncN plazmidot tartalmazó 48-1 tk törzs; 8 sor: a ~168 kb IncN-IncF fúziós plazmidot tartalmazó 49-2 tk törzs; M: *E. coli* MD112 és V517 törzsekből izolált plazmid marker, az alábbi mérettartományban: 168, 53.7, 5.5, 5.1, 3, 2.7 és 2.1 kb. nt: nem tipizálható.

A szülő törzsek plazmidjaira jellemző variabilitás ellenére, csak az IncN típusú plazmidok jutottak át a transzkonjugáns/transzformáns törzsekbe (6. ábra). Azt, hogy valamennyi *E. coli* törzsben a *qnrS1* gén az IncN plazmidhoz kötött, Southern hibridizációval is alátámasztottuk, *qnrS1*- és IncN-specifikus próbák felhasználásával (7. ábra). Amint a 6. ábra is mutatja, a transzkonjugáns/transzformáns törzsek egy ~70 kb méretű *qnrS1* IncN plazmidot tartalmaztak a 49-2 tk jelű transzkonjugáns kivételével, ahol érdekes módon a *qnrS1* gént egy ~168 kb méretű plazmid hordozta, mely feltehetően egy IncN-IncF fúzió eredményeként jöhetett létre.

A továbbiakban az *E. coli* transzkonjugáns/transzformáns törzsek IncN plazmidjainak *PvuII* hasítási mintázatait a humán *Salmonella* Kentucky eredetű *qnrS1* plazmidokéval hasonlítottuk össze, amelyeket IncN plazmid kontrollként használtunk. Az RFLP eredmények szerint a sertés *E. coli* törzsek IncN plazmidjainak *PvuII* mintázata különbözött a humán eredetű *S. Kentucky* törzsekétől. A sertés *E. coli* törzsek IncN plazmidjainak restrikciós mintázata egymással nagy hasonlóságot mutatott, kivéve a már említett 49-2 tk törzset,



amely az IncN-IncF fúziót mutató ~168 kb méretű plazmidot hordozta (7. ábra). A *qnrS1*- és IncN-specifikus Southern hibridizáció eredményei szerint a *qnrS1* gén valamennyi *E. coli* törzsben egy ~7 kb fragmenten helyezkedett el, az IncN replikációs origót pedig a 40-1 tk törzs kivételével egy ~2.5 kb méretű fragment tartalmazta (7. ábra).



**7. ábra.** (A) *qnrS1* és IncN plazmid kontrollként szolgáló humán *Salmonella* Kentucky transzformáns törzsek és a sertés *qnrS1* *E. coli* transzkonjugánsok/transzformáns *PvuII* hasítási mintázatait, valamint (B) *qnrS1*- és IncN-specifikus próbákkal végzett Southern hibridizáció.

A *qnrS1* gén azonos vagy hasonló méretű (~7 kb) fragmenten helyezkedik el. A *S. Kentucky* és a sertés *E. coli* hasítási mintázataiban fellelhető különbségeket részben a Southern hibridizáció eredményei is megerősítik. Ennek megfelelően, a sertés *E. coli* törzsekben egy kivételtől eltekintve (40-1 tk) az IncN replikációs origó egy ~2.5 kb fragmenten lokalizált, míg a 174.70 (T) *Salmonella* törzsben egy ennél nagyobb fragmenten található.

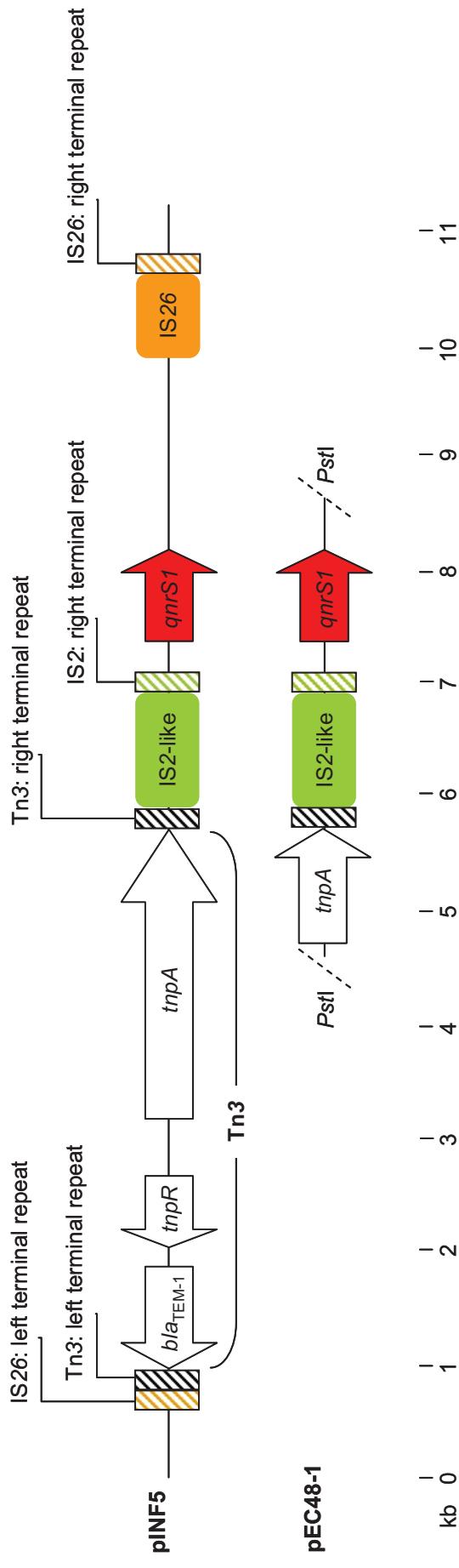
Jelölések: M: 1 kb DNS létra; 1-2 sorok: 174.70 (T) és 128.12 (T) jelű *S. Kentucky* transzformáns törzsek; 3-8 sorok: sertés *E. coli* transzkonjugáns/transzformáns (tk/t) törzsek (10-11 tk, 29-1 tk, 36 t, 40-1 tk, 48-1 tk és 49-2 tk).

Az transzkonjugáns/transzformáns törzsek antibiotikum rezisztencia génjeinek PCR-es kimutatása alapján az IncN plazmidok a *qnrS1* gén mellett egyéb, aminoglikozid (*aadA1*, *strA*, *strB*) ampicillin (*bla*<sub>TEM-1</sub>) és tetraciklin (*tet(A)*) rezisztencia gének átvitelében is szerepet játszottak. További PCR reakciókkal kimutattuk, hogy a *tet(A)* gén a Tn1721 transzpozon része (a részletes eredményeket mellőzzük).

Az 1-es és 2-es típusú integronok közül viszont csak az előbbi volt az IncN plazmidhoz köthető (XVI. táblázat). Ezen integronok jellemzése a jelen tanulmány kereteit túllépte volna, de további terveink között természetesen szerepel. Ellentétben a *qnrS1* gént hordozó IncN plazmidokkal, amelyek minden esetben csupán rezisztencia géneket továbbítottak, a 49-2 tk törzsben azonosított, IncN-IncF fúziót mutató ~168 kb méretű plazmid a *qnrS1*, *bla*<sub>TEM-1</sub> és *tet(A)* rezisztencia gének mellett a *cba-cma-sepA-katP* virulencia génmintázattal volt jellemezhető. Ezen virulencia gének minden valószínűség szerint az Ec 49 szülőtörzs IncF plazmidjáról kerültek át e nagyméretű fúziós plazmidra (XVI. táblázat, 6. ábra).

#### **4.3.4. A *qnrS1* gén genetikai környezete a pINF5 plazmid megfelelő régiójával homológ**

Az Ec 48-1 tk törzsből származtatott *qnrS1* klón rekombináns plazmidjának *Pst*I hasítása egy 3.6 kb méretű *qnrS1* inszertet eredményezett, amelyet teljes egészében megszekvenáltunk. A kapott szekvencia adatbanki adatokkal való összehasonlításakor, a *qnrS1* gén 5' és 3' környezetében ≥99% homológiát találtunk egy csirke *Salmonella* Infantis-ból izolált pINF5 plazmid (GenBank: AM234722; Kehrenberg et al. 2006) megfelelő kinolon rezisztencia régiójával (8. ábra). Így a *qnrS1* géntől 5' irányban található ~2.4 kb szegmensen a Tn3 transzpozon *tnpA* transzpozáz génjének résszekvenciáját mutattuk ki, amelyet 3' egy IS2-szerű inszerciós (IS) elem, és a hozzá tartozó 42 bp terminális ismétlődő régió határol. Ettől 3' irányban megközelítőleg 300 bp-nyira a *qnrS1* gén található, melyet egy 542 bp méretű szekvencia követ (8. ábra).



**8. ábra.** A sertés eredetű Ec 48-1 törzs IncN plazmidjából (pEC48-1) szekvenált 3.6 kb *qnrS1* régió (GenBank: JN157839) fizikai térképe összehasonlításban a csirke eredetű *Salmonella* Infantis törzsből izolált pINF5 plazmid (GenBank: AM234722) megfelelő kinolon rezisztencia régiójával.

#### 4.4. Megbeszélés

Mielőtt a fejezet címét adó, plazmidon kódolt kinolon rezisztenciával kapcsolatos diszkusszió részleteibe bocsátkoznánk, érdemes röviden kitérni arra, hogy a vizsgált sertés eredetű *E. coli* törzsekben - PCR alapú szekvenálás alapján – az *E. coli* kinolon rezisztenciájáért elsősorban felelős kromozómális *gyrA* és *parC* génekben mutációt nem találtunk. Így tehát az itt vizsgált sertés eredetű *E. coli* törzsek nalidixinsavval és ciprofloxacinnal szemben tapasztalt csökkent érzékenységet ( $MIC_{\text{ciprofloxacinnal}}: 0.25-0.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $MIC_{\text{nalidixinsavval}}: 4-16 \mu\text{g/ml}$ ) nem a „szokásos” kromozómális mutációknak, hanem a plazmidon kódolt *qnrS1* génnek tulajdoníthatjuk, ami ezen gén gyakorlati jelentőségére vonatkozó eddigi ismereteinkkel összhangban van (Strahilevitz et al. 2008, Cerquetti et al. 2009).

A plazmidon kódolt kinolon rezisztencia determinánsok elterjedése a humán enterális baktériumok körében világszerte növekvő gondokat jelent. Nem véletlen tehát, hogy az első leírás óta (Cavaco et al. 2007) számos tanulmány született a humán *E. coli* törzsekben elterjedő *qnrS* génekről is (Poirel et al. 2008). A nemzetközi humán eredetű adatok sokaságával ellentétben, a *qnrS* gén hazai előfordulásáról viszont mindössze egy ESBL-termelő tüdő eredetű *K. pneumoniae* izolátumban adtak számot (Szabó et al. 2008). A haszonállatokat illetően a *qnrS* gént eddig főként beteg állatokban mutatták ki (Ma et al. 2009, Yue et al. 2008), viszont újabban egyre több tanulmány számol be előfordulásáról egészséges csirkékből (Cerquetti et al. 2009, Huang et al. 2009, Kmet, Kmetová 2010), valamint sertésekből izolált *E. coli* törzsek között is (Xia et al. 2010). Jelen tanulmányban a *qnrS1* plazmidon kódolt kinolon rezisztencia gént, egy romániai sertéstelep hat egészséges állatából származó *E. coli* törzsben mutattuk ki és jellemeztük. Ezzel tudomásunk szerint elsőként jeleztük nem csak a *qnrS1*, hanem egyáltalán a plazmidon kódolt kinolon rezisztencia megjelenését európai sertés *E. coli* törzsekben.

Annak ellenére, hogy a vizsgált *qnrS1 E. coli* törzsek ugyanarról a sertéstelepről származnak, három eltérő multilókusz szekvencia típust (ST) képviselnek. E három MLST klónnak (ST48, ST206 valamint ST542) az *E. coli* MLST adatbázisban (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) utánanévezve azt találtuk, hogy az ST48 és ST206 a humán környezetben és bizonyos haszonállatok körében (csirke, szarvasmarha) interkontinentálisan elterjedt. Ezzel szemben az 542-es szekvencia típust (ST542) eddig csak humán, főként klinikai hátterű törzsekben írták le. Tekintve, hogy a fent említett, adatbázisban szereplő állati és humán eredetű *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia tulajdonságairól adataink nincsenek, az itt vizsgált sertés eredetű *qnrS1 E. coli* törzsek a fenti szekvencia típusok, rezisztencia fenotípusukkal elsőként jellemzett reprezentánsaiként tarthatók számon. Továbbá, mivel a fenti szekvencia típusba tartozó törzsek az ismert, haszonállatokból származó *qnrS1 E. coli* törzsekkel (Cerquetti et al. 2009) klonális kapcsolatot nem mutatnak,

a fenti három ST típus egyértelműen új sertés eredetű *E. coli* MLST klónként tekinthető. Eltérő klonalitásuk ellenére, az itt vizsgált *qnrS1 E. coli* törzsek plazmidon kódolt antibiotikum rezisztencia mintázata meglehetősen egységes, ami arra utal, hogy ugyanazon antimikrobiális hatásának kitett, egymástól klonálisan eltérő törzsek antibiotikum rezisztencia mintázata a horizontálisan átadható rezisztencia determinánsoknak, többek között az itt jellemzett multirezisztencia plazmidon található és *qnrS1* génnel kapcsolt Tn3 transzpozonnak, az 1-es típusú integronnak (és antibiotikum rezisztencia kazettáinak), valamint a *tet(A)* és *bla<sub>TEM-1</sub>* géneknek köszönhetően egyenlítődik ki.

Az *Enterobacteriaceae* családon belül a *qnrS1* gént különböző inkompatibilitási csoportokba tartozó rezisztencia plazmidok közvetítik (Carattoli 2009), melyek közül az IncN plazmidok a humán eredetű *Salmonella enterica* (García-Fernández et al. 2009, Hopkins et al. 2007), *E. coli* (Karah et al. 2010) és *Klebsiella oxytoca* (Carattoli et al. 2010) törzsekben méretgazdagságukkal tűnnek ki. A humán törzsek mellett a *qnrS1* gént hordozó IncN plazmidokat újabban vízimadarakban is kimutatták (Literak et al. 2010), viszont háziállatokra vonatkozó előfordulásukról és jellemzésükről elsőként a jelen tanulmány szolgáltat információt.

A plazmidon kódolt kinolon rezisztencia gyakran társul  $\beta$ -laktám és/vagy aminoglikozid rezisztenciával, melyek genetikai determinánsai gyakran ugyanazon plazmidokon helyezkednek el (Paterson 2006, Cerquetti et al. 2009). Ezzel összhangban, a transzkonjugáns/transzformáns törzseink antibiotikum rezisztencia génjeinek PCR vizsgálata szerint az itt bemutatott IncN plazmidok egyéb rezisztencia gének: aminoglikozid (*aadA1*, *strA*, *strB*), ampicillin (*bla<sub>TEM-1</sub>*), és tetraciklin (*tet(A)*) átvitelében is szerepet játszottak. Ezzel szemben viszont a *sul2* szulfametoxazol, és a *dfrA12* trimetoprim gének átvitelének hiánya arra utal, hogy azok vagy kromoszómálisan kódoltak vagy pedig terjesztésükben egyéb plazmid típusok vesznek részt. Továbbá, az hogy az 1-es típusú integron hat törzs közül mindössze négy esetében volt jelen az IncN plazmidon, egyértelműen jelzi a *qnrS1* gén és az 1-es típusú integron közötti kapcsolat hiányát. A *qnrS1* régió szekvencia vizsgálata viszont azt mutatja, hogy a *qnrS1* gén törzseink esetében a Tn3 transzpozonnal áll kapcsolatban. Egyetlen transzkonjugáns (49-2 tk) esetében a *qnrS1* gént és a *bla<sub>TEM-1</sub>* ampicillin, illetve *tet(A)* tetraciklin rezisztencia géneket, egy IncN-IncF fúziót mutató nagyméretű (~168 kb) plazmidon azonosítottuk, amely az IncN típusú plazmidoktól eltérően különböző virulencia mechanizmusokat képviselő virulencia géneket (*cba*, *cma*, *sepA*, *katP*) is hordozott. Ezen eddigiek során általunk még nem tapasztalt rekombinációs folyamat multi-replikon típusú, ráadásul rezisztencia és virulencia géneket egyaránt hordozó hibrid plazmidokat eredményezhet. A kombinált géntartalom mellett a multi-replikon jelleg további előnyt jelenthet a plazmidon kódolt gének sikeres terjesztésében.

A vizsgált *qnrS1* sertés *E. coli* és a humán *Salmonella* Kentucky törzsek IncN plazmidjainak eltérő RFLP mintázata, egy előző tanulmány adataival összhangban azt jelzi, hogy azonos genetikai determinánsokat hordozó plazmidok genetikai szerkezete az állati és humán eredetű törzsekben különbözhet (García-Fernández et al. 2009). Érdekes módon viszont a *qnrS1* gén közvetlen környezete a K38-15, K4-43 és a K40-79 humán *E. coli* törzsek IncN plazmidjain levő *qnrS1* régióval (Karah et al. 2010), valamint egy csirke *Salmonella* Infantisból izolált pINF5 plazmid (GenBank: AM234722; Kehrenberg et al. 2006) megfelelő kinolon rezisztencia régiójával  $\geq 99\%$  homológiát mutatott.

Következésképp, a sertés és humán *E. coli* törzsek IncN plazmidjain levő *qnrS1* gének genetikai környezetének azonossága, valamint a mobilis elemekkel (Tn3) való kapcsolatuk, az állati és humán eredetű *Salmonella* és *E. coli* törzsek közötti *qnrS1* plazmid-transzfer lehetőségére mutat, melyre - ismereteink szerint – elsőként jelen tanulmányunk szolgáltat konkrét adatot. Adataink alapján joggal feltételezhető, hogy egyes sertés *E. coli* törzsek a *qnrS1* plazmidon kódolt kinolon rezisztencia gén(ek) rezervoárjai és Európán belüli térhódításának esetleges letéteményesei lehetnek.

## Záró megbeszélés

Disszertációm záró fejezetének kezdetén legyen szabad az előző fejezetekben részletesen ismertetett munkának a tetraciklin-, a gentamicin-, és a plazmidon kódolt kinolon rezisztencia témakörökben megfogalmazott három fő célját, alábbiak szerint rekapitulálni.

Célunk volt tehát:

- vizsgálni a tetraciklin rezisztenciát közvetítő *tet(A)* plazmidok szerepét, az antibiotikum rezisztencia (és virulencia) gének átadásában, a választott sertés törzsekből izolált multirezisztens enterotoxikus *Escherichia coli* (ETEC) törzsek általános és virulencia/rezisztencia gén-, valamint plazmid analízise alapján,
- aminoglikozid (gentamicin) rezisztens klinikai és kommenzalista *E. coli* törzsek rezisztencia-, és virulencia genotípusát, egyes gének esetleges kapcsolt előfordulását elemezni, haszonállatokból és emberből származó minták alapján,
- plazmidon kódolt kinolon rezisztencia (és esetlegesen társult virulencia) géneket felkutatni és azonosítani, kinolon rezisztenciát hordozó plazmidokat jellemezni, egészséges sertésekből származó, kommenzalista multirezisztens *E. coli* törzsekben.

Ezen célok követését szolgáló kutatásaink – a rendelkezésre álló irodalmi adatokkal egybevetve – az egyes témakörökben az alábbi megállapításokhoz és új tudományos eredményekhez vezettek:

### I. A multidrog rezisztens sertés ETEC törzsek *tet(A)* plazmidjainak sajátosságai

Mint a bevezetőben is írtam, a *tet(A)* plazmidok szerepét az antibiotikum rezisztencia (és virulencia) gének átadásában választott sertés törzsekből izolált, multidrog rezisztens enterotoxikus *Escherichia coli* (ETEC) törzsekben eddig igen kevesen, F18<sup>+</sup> ETEC törzsekben pedig egyáltalán nem vizsgálták (Goswami et al. 2008).

Az itt ismertetett vizsgálatokkal a tetraciklin rezisztenciát közvetítő *tet(A)* plazmidok szerepét az antibiotikum rezisztencia (és virulencia) gének átadását illetően a négy országból (Ausztria, Cseh Köztársaság, Magyarország, USA) származó sertés ETEC törzsek vizsgálatával kezdtük. Megállapítottuk, hogy a sertések választási hasmenésének terápiájában a legutóbbi időkhöz gyakran használt antibiotikumok közül leggyakoribbnak a tetraciklin elleni rezisztenciát találtuk. Az egyes tetraciklin rezisztencia gének a különböző

geográfiai régiókat képviselő ETEC törzsek között eltérők voltak. A cseh törzsek túlnyomó részét a *tet(A)* genotípus jellemezte, míg a magyar és osztrák tetraciklin rezisztens törzsek többsége viszont hasonló mértékben tartalmazta a *tet(A)* (38% illetve 21%) és a *tet(B)* (25% illetve 32%) géneket. Ezen megállapítások megerősítik és kiegészítik az idevonatkozó korábbi saját és az érintett országokból rendelkezésre álló irodalmi adatokat (Mayrhofer et al. 2004, Michalova et al. 2004, Fekete et al. 2006).

A tetraciklin rezisztencia gének típusát, valamint az enterotoxin géneket (*estA*, *estB*, *astA*, *elt*), a konjugációra kijelölt *tet(A)*- és *tet(B)*-pozitív törzseken PCR-el mutattuk ki. Az amplikonokat szükség szerint szekvenálással jellemeztük. A konjugáció eredményeként a *tet(A)* transzkonjugánsok (1 magyar, 1 cseh törzs) egy-egy nagy (~138 és ~106 kb), virulencia géneket nem hordozó multidrog rezisztens (MDR) plazmidot tartalmaztak. A *tet(A)* plazmidot hordozó magyar törzs 138 kb plazmidján ún. klasszikus 1-es típusú integront mutattunk ki és jellemeztünk egy újszerű génkazetta kombinációval, melyet korábban a különböző geográfiai eredetű humán *Shigella sonnei* és *E. coli* törzsekben ugyan már kimutattak, de ismereteink szerint eddig mindössze két, hasmenéses sertésből izolált *E. coli* törzsben került megállapításra, anélkül, hogy a törzsek patogenetikai jellemzése, kommenzalista vagy patogén voltára irányuló vizsgálata megtörtént volna. Az értekezésemben egyplazmidos transzkonjugáns formájában vizsgált cseh-, és magyar eredetű *E. coli* törzsek replikon tipizálása szerint mindkét *tet(A)* plazmid uni-replikon típusú és az IncI1 inkompatibilitási csoportokba tartozott.

Eddigi adataink tehát azt jelzik, hogy a *tet(A)* és *tet(B)* gének igen gyakran MDR plazmidokon vagy azokkal együtt, egyszerre több antibiotikum rezisztenciát közvetítve terjedhetnek, ellentétben a korábban, csoportunk által jellemzett, pTC (90 kb) sertés ETEC plazmiddal. Ennek ugyanis egyedüli antibiotikum rezisztencia génje a *tet(B)* gén volt.

További PCR-, és szekvenálási vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy az itt kimutatott, *tet(A)* rezisztencia génnel jellemzett, új típusú konjugatív MDR plazmidok az esetek nagy részében 1-es típusú integronokat is hordoznak, melyek közül a ~138 kb méretű, hazai F18<sup>+</sup> ETEC-ből származó *tet(A)* plazmid integronját egy szokatlan elrendezésű (*estX-aadA1*), ~2 kb méretű variábilis régió jellemzi.

Összességében megállapítható volt tehát, hogy a *tet(A)* és *tet(B)* génekkel jellemzett MDR plazmidok gyakori átvitele mellett, jelen vizsgálataink szerint az ETEC virulencia gének átvitele - pl. a pTC plazmidra jellemző toxin specifikus lókus (TSL) - jóval ritkábban fordult elő, mint azt a korábbi, pTC-vel kapcsolatos vizsgálatok alapján vélhettük. Ehelyett az itt kimutatott, nem-pTC jellegű plazmidokra irányuló vizsgálatsorozatunk első lépéseként két, multidrog rezisztenciát kódoló *tet(A)* plazmidot tudtunk jellemezni, melyek azonban – az eddigi vizsgálatok szerint – ismert virulencia gént nem hordoztak.



Az általános bevezetőben, idevonatkozóan feltett kérdésre, miszerint az egyéb, nem-*tet(B)* típusú, de igen gyakori, *tet(A)* tetraciklin rezisztencia gént közvetítő plazmidok jelentősége a virulencia és egyéb rezisztencia gének hordozásában, hogyan ítélné meg, azt kell válaszolnunk, hogy a két különböző országból származó, választott sertés eredetű F18<sup>+</sup> ETEC törzsek *tet(A)* plazmidjai egyéb antibiotikum rezisztencia kazettát vagy integront hordoznak ugyan, és e tekintetben a *tet(B)* prototípus plazmidhoz képest kedvezőtlenebb megítélés alá eshetnek, viszont virulencia génektől ezen plazmidok mentesek.

A vélhetően még számos vonatkozásban érdekes összefüggéseket rejtő *tet(B)* plazmidok részletes tanulmányozását, a pTC plazmiddal esetleg fennálló rokonságuk vizsgálatát a jövőbeni feladataink között tartjuk számon.

## **II. Gentamicin rezisztens *E. coli* törzsek – multidrog rezisztencia / virulencia genotípusok jellemzése**

Mint az idevonatkozó fejezetben ismertettük, a gentamicin a korábban elterjedtebben használt aminoglikozidokkal (streptomycin, kanamicin) szemben, ma már mind humán, mind állatgyógyászati vonatkozásban egyre nagyobb teret nyerő aminoglikozid antibiotikum. Ennek következtében az utóbbi évtizedben a gentamicin rezisztencia már nemcsak a humán- és állatpatogén törzsek körében, hanem a kommenzalistákban is gyakoribbá vált (Catry et al. 2003, EFSA 2010a). Munkánk megkezdése előtt ismeretes volt, hogy a haszonállatokból származó patogén *E. coli* törzsek multidrog rezisztenciájához virulencia is társulhat, mely az esetek jelentős részében a különböző plazmidok együttes hordozásának tulajdonítható (Boerlin et al. 2005), de épp a témacsoportunk korábbi adatai (Fekete et al. 2003, Olasz et al. 2005), majd azokat megerősítő, baromfi eredetű *E. coli* törzsekre vonatkozó amerikai adatok (Johnson et al. 2010) igazolták, hogy néha e kapcsolatok a patogén törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia géneket egyaránt hordozó, konjugatív plazmidjaihoz is köthetők. Mivel ezen esetleges asszociációkat illetően a humán és állati eredetű kommenzalista *E. coli* törzsekre vonatkozóan igen kevés információval rendelkezünk, helyesnek véltük, hogy e téren molekuláris epidemiológiai megközelítéssel adatokat gyűjtsünk.

Az angliai együttműködő partnereink által a közleműltban, *E. coli* és *Salmonella* törzsekre kidolgozott antibiotikum rezisztencia és *E. coli*-ra tervezett virulencia microarray rendszer alkalmazásával, a hazai humán és állati eredetű klinikai és kommenzalista *E. coli* törzseket képviselő gyűjteményünk microarray analízise és kiegészítő antibiotikum rezisztencia fenotípus vizsgálata alapján általában elmondható, hogy a rezisztencia fenó- és genotípusra vonatkozó eredményeink egymással jó összhangban vannak. A néhány kivételt képviselő

esetekre az idevonatkozó részletes ismertetésben kitértünk. Néhány esetben (pl. *catB3* gének) a genotípust nem kísérte a megfelelő rezisztencia fenotípus. Ezzel ellentétben, néhány egyéb (pl. tetraciklin, szulfametoxazol, trimetoprim és gentamicin) rezisztenciát mutató *E. coli* törzs esetén a jelenség fordítottját is megfigyelhettük. Amint már korábban is rámutattunk, a gentamicin rezisztencia esetében ennek részben technikai magyarázata lehet, ugyanis az AMR05 microarray a gentamicin rezisztenciát meghatározó számos, aminoglikozid módosító enzimet kódoló gén közül csak néhányra (*aac(3)-I*, *aac(3)-IV*, *ant(2<sup>''</sup>)-Ia*) „keresett rá” (Batchelor et al. 2008).

Érdekes volt megtapasztalni azt is, hogy az itt vizsgált Gen<sup>R</sup> *E. coli* törzsek esetében az antibiotikum rezisztencia génekhez hasonlóan virulencia génmintázatok is jelentős heterogenitást mutattak. A virulencia gének közül leggyakoribb az *iss* szérum rezisztencia gén volt mely a klinikai háttértől függetlenül, vagyis a kommenzalisták esetében is előfordult, és a törzsek 70%-át jellemezte, hasonlóan a néhány baromfi és humán kommenzalista törzsben kimutatott *tsh* és *sat* génekhez, melyeket korábban csak a kórokozó *E. coli* törzsekben mutattak ki (Parham et al. 2005), de az újabb adatok szerint gyakorinak látszik pl. a baromfi eredetű *intestinalis E. coli* törzsekben is (Ewers et al. 2009, Tóth et al. kézirat bírálólat alatt).

Mint a fentiek is jelzik, a klinikai törzsekkel ellentétben nagyon keveset tudni a haszonállatokból és humán mintákból származó kommenzalista *E. coli* törzsek virulencia tulajdonságairól. A fenti T3SS effektorok, SPATE-, és az *eae* (intimin) gének néhány kommenzalista *E. coli* törzsünkben való azonosítása megerősíti és gazdagítja az egészséges szarvasmarhákból (Tóth et al. 2009), valamint broiler csirkékből (Diarrassouba et al. 2007, Ewers et al. 2009) származó *E. coli* törzsekre vonatkozó eredményeket. Emellett viszont itt is hangsúlyoznunk kell, hogy virulencia géntartalmuknál fogva, a nyers élelmiszerből illetve egészséges sertések bélsarából izolált kommenzalista *E. coli* törzsek élelmiszerbiztonsági kockázatot is képviselhetnek.

Általánosságban ugyan elmondható, hogy az antibiotikum rezisztencia és virulencia mintázatok tekintetében szignifikáns különbséget a különböző gazdafajokból izolált *E. coli* törzsek között nem találtunk, de bizonyos antibiotikum rezisztencia gének és mintázataik kizárólag a humán törzseket jellemezték. A kommenzalista és klinikai összehasonlítás tekintetében viszont a rezisztencia gének a várakozásnak megfelelően szignifikánsan gyakoribbak voltak a klinikai esetekből izolált (kórokozónak tekintett) *E. coli* törzsekben. Ugyanakkor a virulencia gének többsége a várakozással ellentétben, a klinikai háttértől függetlenül fordult elő, megerősítvén a „Bevezetőben” említett „szürke zóna” elméletünket, miszerint a fakultatív kórokozók patogenitási- és virulencia skáláján az egyes törzsek helyét a virulencia gének mennyiségi, minőségi és expressziós viszonyai határozzák meg, s így a

különbség ezen baktériumok klinikai és kommenzalista törzseinek virulencia génekészlete között esetenként a vártnál kisebb lehet.

Az antibiotikum rezisztencia és virulencia gének kapcsolt előfordulását illetően tehát mindössze néhány antibiotikum rezisztencia és virulencia gén között mutattunk ki szoros kapcsolatot. Érdekes módon, ezek rendszerint bizonyos gazdafajokat jellemeztek: pl. a *catB3*, *aac(6)-Ib* és *bla<sub>CTX-M-1</sub>* rezisztencia gének és a *sat* SPATE gén kapcsolatát a humán törzsekben, míg a *tet(A)* együttállását az *iroN* és *iss* virulencia génekkel a baromfi törzsekben mutattuk ki. Az ehhez hasonló antibiotikum rezisztencia és virulencia gének közötti korrelációk nagyméretű ún. hibrid *E. coli* plazmidok esetleges hordozásának lehetőségét vetik fel (Johnson et al. 2010, Nógrády et al. 2006). Egyébként - mint már említettük - ezt látszanak alátámasztani az idevonatkozó előzetes plazmidprofil vizsgálataink is.

Idevonatkozó záró következtetésként elmondható tehát, hogy a különböző eredetű és klinikai hátterű gentamicin rezisztens *E. coli* törzsekben a gentamicinnel szembeni rezisztencia multidrog rezisztencia mechanizmusokkal társult, és mind a fenó- mind a genotípus szintjén leggyakrabban a tetraciklin, ampicillin és szulfametoxazol rezisztenciával járt együtt. Összehasonlító genotipizáló vizsgálataink eredményei szerint az antibiotikum rezisztencia gének többsége, valamint néhány virulencia gén, a gazdafajtól és a klinikai háttértől függetlenül fordult elő, az egyes törzsek rezisztencia és virulencia mintázatának nagyfokú heterogenitását eredményezve. Emellett azonban adataink rávilágítottak arra is, hogy a vizsgált humán és állati eredetű klinikai és kommenzalista törzsekben bizonyos rezisztencia és virulencia gének közötti asszociációkkal kell számolnunk, melyek az *E. coli* fertőzések hatékony terápiás lehetőségeit tovább szűkíthetik, és a rezisztencia fenotípus vizsgálata mellett a rezisztencia és virulencia tulajdonságokat hordozó genetikai vektorok (plazmidok, transzpozonok, integronok, profágok, patogenitási szigetek) vizsgálatának szükségességére is felhívják a figyelmet. Mint adatainkból is kitűnik, a klinikai *E. coli* törzsek mellett a kommenzalisták rezisztencia és virulencia génmintázatának együttes jellemzése a humán-, és állat-egészségügyi szempontból egyaránt jelentős genotípusok megjelenését is előrevetítheti (Bielaszewska et al. 2011).

### **III. A *qnrS1* kinolon rezisztencia plazmidok jellemzése sertés eredetű kommenzalista *E. coli* törzsekben**

A kromoszómálisan meghatározott, DNS giráz és topoizomeráz enzimek génjeiben bekövetkező pontmutációk okozta kinolon rezisztencia mellett, a kinolon rezisztencia plazmid által közvetített új formáinak előfordulását több okból is fokozott figyelem övezi. Ráadásul, a

plazmidon kódolt kinolon rezisztencia gyakran társul  $\beta$ -laktám és/vagy aminoglikozid rezisztenciával, melyek genetikai determinánsai esetenként ugyanazon plazmidon helyezkednek el (Paterson 2006, Cerquetti et al. 2009), s így élelmiszerbiztonsági jelentőségük fokozott lehet. Ezért különösen is fontosnak véltük, hogy ezen új típusú rezisztencia determinánsok egyik fontos képviselőjének a *qnrS1* génnek, a sertések közötti, Európában eddig még nem ismert előfordulásáról és jellemzéséről, az élelmiszerbiztonsági szempontból gyakoribb kockázatot jelentő kommenzalista *E. coli* törzsek vizsgálata alapján szerezzünk ismereteket.

Vizsgálataink eredményeként a *qnrS1* gént hordozó plazmidokat egy romániai sertéstelepről izolált, kommenzalista sertés *E. coli* törzsekben mutattuk ki, melyek változatos genetikai vonalakat képviseltek, és egyéb ( $\beta$ -laktám, aminoglikozid, tetraciklin) rezisztencia géneket, valamint integront is hordoztak. Ezen plazmidok az eddigiekben leírt *qnrS1* plazmidoktól eltérően IncN típusúak voltak, de restriktációs mintázatuk alapján eltértek a *Salmonella* Kentucky IncN típusú *qnrS1* plazmidjától, ami azt jelzi, hogy azonos genetikai determinánsokat hordozó plazmidok genetikai szerkezete az állat és humán törzsekben különbözhet (García-Fernández et al. 2009). Egyébként, maguk a plazmid hordozó *E. coli* törzsek is három új, sertésben eddig nem ismert MLST klónt képviseltek

A fenti törzseink IncN plazmidon kódolt *qnrS1* régiójának szekvencia vizsgálata viszont azt mutatja, hogy a *qnrS1* gén, törzseink esetében, a Tn3 transzpozonnal áll kapcsolatban, melynek megfelelő határoló régiókat *qnrS1* plazmidon, humán *E. coli* törzseken és csirke eredetű *Salmonella* Infantisban ugyancsak kimutattak (Kehrenberg et al. 2006, Karah et al. 2010). Az utóbbi, pINF5 nevű *Salmonella* plazmid *qnrS1* génje egyébként az *E. coli* törzseink kinolon rezisztencia (*qnrS1*) régiójával  $\geq 99\%$  homológiát mutatott.

Adataink tehát az állati és humán eredetű *Salmonella* és *E. coli* törzsek közötti plazmid- és transzpozon transzferek lehetőségeire mutatnak rá, melyek alapján feltételezhető, hogy egyes sertés *E. coli* törzsek a *qnrS1* plazmidon kódolt kinolon rezisztencia gén(ek) rezervoárjai és Európán belüli térhódításának esetleges letéteményesei lehetnek.

## Új tudományos eredmények és megállapítások

**Értekezésem nemzetközileg is új tudományos eredményeit és megállapításait az alábbi tézisekben foglalom össze:**

Az ETEC törzsek tetraciklin rezisztenciát közvetítő plazmidjainak genetikai vizsgálata terén:

1. A korábban részletesen tanulmányozott, *tet(B)* osztályt képviselő tetraciklin rezisztenciáért és enterotoxigenitásért felelős hibrid plazmid (pTC) jellemzése után egy magyar és egy cseh sertés ETEC törzs *tet(A)* gént hordozó plazmidjait jellemeztünk. Ennek eredményeként elsőként mutattuk ki, hogy az F18<sup>+</sup> ETEC törzsek *tet(A)* plazmidjai azonos, Inc11 replikon típusúval rendelkeznek, s a tetraciklin rezisztencián kívül egyéb rezisztencia determinánsokat is hordoznak.
2. Megállapítottuk továbbá, hogy a hazai Inc11 replikon típusú F18<sup>+</sup> ETEC törzs *tet(A)* plazmidján 1-es típusú integron is található, mely a sertés eredetű *E. coli* törzseknél igen szokatlan összetételű, streptotricin-aminoglikozid rezisztenciát meghatározó *estX-aadA1* génkazettából álló variábilis régiót tartalmaz.

A gentamicin rezisztens, humán és állati eredetű klinikai és kommenzalista *E. coli* törzsek rezisztencia és virulencia genotípusát illetően:

3. Elsőként szolgáltatunk microarray alapú, szisztematikus összehasonlító genotipizálási adatokat emberben és élelmiszertermelő állatokban előforduló klinikai és kommenzalista *E. coli* törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia gén rezervoár szerepéről, és ezen belül egyes rezisztencia és virulencia gének társult előfordulásáról.
4. Egyes aminoglikozid-, és klóramfenikol rezisztencia gének (*ant(2'')*-Ia, *aac(6')*-Ib és *catB3*) kizárólagosan humán eredetű törzsekben észlelt előfordulása alapján elsőként hívjuk fel a figyelmet arra, hogy ezek a rezisztencia gének a humán *E. coli* törzsekben – az általánosan elterjedt felfogástól eltérően – az állati eredetű törzsektől függetlenül jelenhettek meg.
5. Elsőként mutattunk rá arra is, hogy az állati eredetű kórokozók mellett a kommenzalista *E. coli* törzsek nem csak indikátor szerepet játszanak, hanem bizonyos esetekben élelmiszerbiztonsági kockázatot is képviselhetnek.

A sertés eredetű *E. coli* törzsek, *qnrS1* kinolon rezisztencia gént hordozó plazmidjainak jellemzésére vonatkozóan:

6. A fenti *qnrS1*-pozitív *E. coli* törzsek három olyan MLST klónját írtuk le, melyeket eddig elsősorban humán klónként ismertünk, s előfordulásukról az állati eredetű törzsek között (ST542) vagy a sertés eredetű törzsek között (ST48, ST206) nem volt tudomásunk. Ezen túl, elsőként ismertettük a fenti klónok antibiotikum rezisztencia és virulencia genotípusát.
7. Nemzetközi elsőséggel jellemeztünk *qnrS1* plazmidot sertés eredetű *E. coli* törzsekben, és számoltunk be IncN replikonnal jellemezhető, *qnrS1* gént hordozó *E. coli* plazmidról háziállatokban, ezzel egyben elsőként jelezve a sertés eredetű *E. coli* törzsek plazmidon közvetített kinolon rezisztenciáját Európában.
8. Megállapítottuk, hogy az itt vizsgált *qnrS1* gén környezete, egy európai csirke eredetű *Salmonella* Infantisból izolált plazmid (pINF5) - ugyancsak Tn3-hoz kapcsolt - kinolon rezisztencia régiójával mutat  $\geq 99\%$  homológiát, mely azt jelzi, hogy a *qnrS1* gének *E. coli* és *Salmonella* törzsek közötti átvitelével és ennek közegészségügyi vonzataival komolyan számolnunk kell. Adataink a külföldi adatokkal egybevetve arra utalnak, hogy a sertés és baromfi a *qnrS1* gén rezervoárjai lehetnek.

## Irodalomjegyzék

Ahmed A.M., Furuta K., Shimomura K., Kasama Y., Shimamoto T.: **Genetic characterization of multidrug resistance in *Shigella* spp. from Japan**, J. Med. Microbiol., 55. 1685-91, 2006.

Alexa P., Rychlík I., Nejezchleb A., Hamrík J.: **Identification of enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli* by PCR and biological methods**, Vet. Med. (Praha), 42. 97-100, 1997.

Allmeier H., Cresnar B., Greck M., Schmitt R.: **Complete nucleotide sequence of Tn1721: gene organization and a novel gene product with features of a chemotaxis protein**, Gene., 111. 11-20, 1992.

Anjum M.F., Mafura M., Slickers P., Ballmer K., Kuhnert P., Woodward M.J., Ehricht R.: **Pathotyping *Escherichia coli* by using miniaturized DNA microarrays**, Appl. Environ. Microbiol., 73. 5692-5697, 2007.

Anjum M.F., Choudhary S., Morrison V., Snow L.C., Mafura M., Slickers P., Ehricht R., Woodward M.J.: **Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance within *Salmonella* isolated from food animals in Great Britain**, J. Antimicrob. Chemother., 66. 550-559, 2011.

Barl T., Dobrindt U., Yu X., Katcoff D.J., Sompolinsky D., Bonacorsi S., Hacker J., Bachmann T.T.: **Genotyping DNA chip for the simultaneous assessment of antibiotic resistance and pathogenic potential of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli***, Int. J. Antimicrob. Agents., 32. 272-277, 2008.

Batchelor M., Hopkins K., Threlfall E.J., Clifton-Hadley F.A., Stallwood A.D., Davies R.H., Liebana E.: ***bla*(CTX-M) genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003**, Antimicrob. Agents. Chemother., 49. 1319-1322, 2005.

Batchelor M., Hopkins K.L., Liebana E., Slickers P., Ehricht R., Mafura M., Aarestrup F., Mevius D., Clifton-Hadley F.A., Woodward M.J., Davies R.H., Threlfall E.J., Anjum MF.:

**Development of a miniaturised microarray-based assay for the rapid identification of antimicrobial resistance genes in Gram-negative bacteria**, *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 31. 440-451, 2008.

Bielaszewska M., Mellmann A., Zhang W., Köck R., Fruth A., Bauwens A., Peters G., Karch H.: **Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study**, *Lancet. Infect. Dis.*, 11. 671-676, 2011.

Boerlin P., Travis R., Gyles C.L., Reid-Smith R., Janecko N., Lim H., Nicholson V., McEwen S.A., Friendship R., Archambault M.: **Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario**, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71. 6753-6761, 2005.

Bortolaia V., Guardabassi L., Trevisani M., Bisgaard M., Venturi L., Bojesen A.M.: **High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks**, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 54. 1623-1626, 2010.

Briñas L., Zarazaga M., Sáenz Y., Ruiz-Larrea F., Torres C.: **Beta-lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals**, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 46. 3156-3163, 2002.

Bustamante A.V., Sanso A.M., Lucchesi P.M., Parma A.E.: **Multiplex PCR assay for the detection of five putative virulence genes encoded in verotoxigenic *Escherichia coli* plasmids**, *Curr. Microbiol.*, 62. 1411-1415, 2011.

Carattoli A., Bertini A., Villa L., Falbo V., Hopkins K.L., Threlfall E.J.: **Identification of plasmids by PCR-based replicon typing**, *J. Microbiol. Methods.*, 63. 219-228, 2005.

Carattoli A.: **Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae***, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 53. 2227-2238, 2009.

Carattoli A., Aschbacher R., March A., Larcher C., Livermore D.M., Woodford N.: **Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid pKOX105 encoding VIM-1, QnrS1 and SHV-12 proteins in *Enterobacteriaceae* from Bolzano, Italy compared with IncN plasmids encoding KPC enzymes in the USA**, *J. Antimicrob. Chemother.*, 65. 2070-2075, 2010.



Catry B., Laevens H., Devriese L.A., Opsomer G., De Kruif A.: **Antimicrobial resistance in livestock**, J. Vet. Pharmacol. Ther., 26. 81-93, 2003.

Cavaco L.M., Hansen D.S., Friis-Møller A., Aarestrup F.M., Hasman H., Frimodt-Møller N.: **First detection of plasmid-mediated quinolone resistance (*qnrA* and *qnrS*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans in Scandinavia**, J. Antimicrob. Chemother., 59. 804-805, 2007.

Cerquetti M., García-Fernández A., Giufrè M., Fortini D., Accogli M., Graziani C., Luzzi I., Caprioli A., Carattoli A.: **First report of plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* in an *Escherichia coli* strain of animal origin in Italy**, Antimicrob. Agents. Chemother., 53. 3112-3114, 2009.

Chopra I., Roberts M.: **Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance**, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 65. 232-260, 2001.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2010.: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI Document M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Cocchi S., Grasselli E., Gutacker M., Benagli C., Convert M., Piffaretti J.C.: **Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin**, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 50. 126-132, 2007.

DeLappe N., O'Halloran F., Fanning S., Corbett-Feeney G., Cheasty T., Cormican M.: **Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolates from western Ireland, an area of low incidence of infection**, J. Clin. Microbiol., 41. 1919-1924, 2003.

Diarrassouba F., Diarra M.S., Bach S., Delaquis P., Pritchard J., Topp E., Skura B.J.: **Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms**, J. Food. Prot., 70. 1316-1327, 2007.

ELSINGHORST E.A.: Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli Virulence mechanisms of a versatile pathogen*. Szerk.: DONNENBERG M.S. San Diego: Academic Press, 2002. p. 155-187.

EC (European Community), 2003a.: Council Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC, Official Journal of the European Union, L 325/31.

EC (European Community), 2003b.: Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition, Official Journal of the European Union, L 268/29.

EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System), 2008.: Antimicrobial resistance in Europe. *Escherichia coli*. In: Annual Report 2008 On-going surveillance of *S. Pneumoniae*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, pp. 132.

EFSA (European Food Safety Authority), 2009.: Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. EFSA Journal 7, 1372.

EFSA (European Food Safety Authority), 2010a.: The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007. EFSA Journal 8, 1309.

EFSA (European Food Safety Authority), 2010b.: The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. EFSA Journal 8, 1658.

Everett M.J., Jin Y.F., Ricci V, Piddock L.J.: **Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals**, Antimicrob. Agents. Chemother., 40. 2380-2386, 1996.

Ewers C., Antão E.M., Diehl I., Philipp H.C., Wieler L.H.: **Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential**, Appl. Environ. Microbiol., 75. 184-192, 2009.

Fairbrother J.M., Nadeau E., Gyles C.L.: ***Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies**, Anim. Health. Res., 6. 17-39, 2005.

Fekete P.Z., Schneider G., Olasz F., Blum-Oehler G., Hacker J.H., Nagy B.: **Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18+ enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs**, Int. J. Med. Microbiol., 293. 287-98, 2003.

Fekete P.Z., Nógrády N., Olasz F., Nagy B.: **Mobilis genetikai elemek szerepe egyes *Escherichia coli* és *Salmonella* baktériumok tetraciklin rezisztenciájának és virulenciájának terjedésében**, Magyar Állatorvosok Lapja., 128. 39-47, 2006.

Fekete P.Z., Brzuszkiewicz E., Blum-Oehler G., Olasz F., Szabó M., Gottschalk G., Hacker J., Nagy B.: **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, 2012.

Fluit A.C., Schmitz F.J.: **Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology**, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 18. 761-770, 1999.

Frana T.S., Carlson S.A., Griffith R.W.: **Relative distribution and conservation of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in *Salmonella enterica* serotype typhimurium phage type DT104**, Appl. Environ. Microbiol., 67. 445-448, 2001.

Frech G., Schwarz S.: **Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. enterica serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes**, J. Appl. Microbiol., 89. 633-641, 2000.

Fàbrega A., Sánchez-Céspedes J., Soto S., Vila J.: **Quinolone resistance in the food chain**, Int. J. Antimicrob. Agents., 31. 307-315, 2008.

García-Fernández A., Fortini D., Veldman K., Mevius D., Carattoli A.: **Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella***, J. Antimicrob. Chemother., 63. 274-281, 2009.

Goswami P.S., Gyles C.L., Friendship R.M., Poppe C., Kozak G.K., Boerlin P.: **Effect of plasmid pTENT2 on severity of porcine post-weaning diarrhoea induced by an O149 enterotoxigenic *Escherichia coli***, Vet. Microbiol., 131. 400-405, 2008.

Grape M., Motakefi A., Pavuluri S., Kahlmeter G.: **Standard and real-time multiplex PCR methods for detection of trimethoprim resistance *df* genes in large collections of bacteria**, Clin. Microbiol. Infect., 13. 1112-1118, 2007.

Graziani C., Luzzi I., Corro M., Tomei F., Parisi G., Giufre M., Morabito S., Caprioli A., Cerquetti M.: **Phylogenetic background and virulence genotype of ciprofloxacin-susceptible and ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strains of human and avian origin**, J. Infect. Dis., 199. 1209-1217, 2009.

Guerra B., Junker E., Schroeter A., Malorny B., Lehmann S., Helmuth R.: **Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry**, J. Antimicrob. Chemother., 52. 489-492, 2003.

Guillaume G., Verbrugge D., Chasseur-Libotte M., Moens W., Collard J.: **PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium**, FEMS Microbiol. Ecol., 32. 77-85, 2000.

Hacker J., Blum-Oehler G., Mühldorfer I., Tschäpe H.: **Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution**, Mol. Microbiol., 23. 1089-1097, 1997.

HACKER J., KAPER J. B.: The concept of pathogenicity islands. In: *Pathogenicity islands and other mobile virulence elements*. Szerk.: KAPER, J.B., . HACKER J., Washington: American Society for Microbiology, 1999. p. 1-13.

Haesebrouck F., Pasmans F., Chiers K., Maes D., Ducatelle R., Decostere A.: **Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?** Vet. Microbiol., 100. 255-68, 2004.

Hamelin K., Bruant G., El-Shaarawi A., Hill S., Edge T.A., Fairbrother J., Harel J., Maynard C., Masson L., Brousseau R.: **Occurrence of virulence and antimicrobial resistance**

**genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit River areas**, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73. 477-484, 2007.

Hammerum A.M., Heuer O.E.: **Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin**, *Clin. Infect. Dis.*, 48. 916-921, 2009.

Hartman A.B., Essiet I.I., Isenbarger D.W., Lindler L.E.: **Epidemiology of tetracycline resistance determinants in *Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli*: characterization and dissemination of *tet(A)*-1**, *J. Clin. Microbiol.*, 41. 1023-1032, 2003.

Ho P.L., Wong R.C., Lo S.W., Chow K.H., Wong S.S., Que T.L.: **Genetic identity of aminoglycoside-resistance genes in *Escherichia coli* isolates from human and animal sources**, *J. Med. Microbiol.*, 59. 702-707, 2010.

Hopkins K.L., Wootton L., Day M.R., Threlfall E.J.: **Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK**, *J. Antimicrob. Chemother.*, 59. 1071-1075, 2007.

Huang S.Y., Dai L., Xia L.N., Du X.D., Qi Y.H., Liu H.B., Wu C.M., Shen J.Z.: **Increased prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in chicken *Escherichia coli* isolates from 2001 to 2007**, *Foodborne Pathog. Dis.*, 6. 1203-1209, 2009.

Imberechts H., Van Pelt N., De Greve H., Lintermans P.: **Sequences related to the major subunit gene *fedA* of F107 fimbriae in porcine *Escherichia coli* strains that express adhesive fimbriae**, *FEMS Microbiol. Lett.*, 119. 309-314, 1994.

Jakobsen L., Sandvang D., Hansen L.H., Bagger-Skjøt L., Westh H., Jørgensen C., Hansen D.S., Pedersen B.M., Monnet D.L., Frimodt-Møller N., Sørensen S.J., Hammerum A.M.: **Characterisation, dissemination and persistence of gentamicin resistant *Escherichia coli* from a Danish university hospital to the waste water environment**, *Environ. Int.*, 34. 108-115, 2008.

Johnson JR, Kuskowski MA, Menard M, Gajewski A, Xercavins M, Garau J.: **Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status**, *J. Infect. Dis.*, 194. 71-78, 2006.

Johnson J.R., Sannes M.R., Croy C., Johnston B., Clabots C., Kuskowski M.A., Bender J., Smith K.E., Winokur P.L., Belongia E.A.: **Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004**, *Emerg. Infect. Dis.*, 13. 838-846, 2007.

Johnson T.J., Wannemuehler Y.M., Nolan L.K.: **Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli***, *Appl. Environ. Microbiol.*, 74. 2360-2369, 2008.

Johnson T.J., Jordan D., Kariyawasam S., Stell A.L., Bell N.P., Wannemuehler Y.M., Alarcón C.F., Li G., Tivendale K.A., Logue C.M., Nolan L.K.: **Sequence analysis and characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal *Escherichia coli***, *Infect. Immun.*, 78. 1931-1942, 2010.

Johnson T.J., Shepard S.M., Rivet B., Danzeisen J.L., Carattoli A.: **Comparative genomics and phylogeny of the IncI1 plasmids: A common plasmid type among porcine enterotoxigenic *Escherichia coli***, *Plasmid.*, 66. 144-151, 2011.

Kadlec K., Schwarz S.: **Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study**, *J. Antimicrob. Chemother.*, 62. 469-73, 2008.

Kado C.I., Liu S.T.: **Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids**, *J. Bacteriol.*, 145. 1365-1373, 1981.

Karah N., Poirel L., Bengtsson S., Sundqvist M., Kahlmeter G., Nordmann P., Sundsfjord A., Samuelsen Ø.; Norwegian Study Group on PMQR.: **Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6)-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* from Norway and Sweden**, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 66. 425-431, 2010.

Kaszanyitzky E.J., Tarpai A., Jánosi S., Papp M., Skáre J., Semjén G.: **Development of an antibiotic resistance monitoring system in Hungary**, *Acta. Vet. Hung.*, 50. 189-197, 2002.

Kehrenberg C., Friederichs S., de Jong A., Michael G.B., Schwarz S.: **Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis**, *J. Antimicrob. Chemother.*, 58. 18-22, 2006.

Kmet V., Kmetová M.: **High level of quinolone resistance in *Escherichia coli* from healthy chicken broilers**, Folia. Microbiol. (Praha)., 55. 79-82, 2010.

Köhler C.D., Dobrindt U.: **What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?** Int. J. Med. Microbiol., 301. 642-7, 2011

Lanz R., Kuhnert P., Boerlin P.: **Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland**, Vet. Microbiol., 91. 73-84, 2003.

Lawley T.D., Burland V., Taylor D.E.: **Analysis of the complete nucleotide sequence of the tetracycline-resistance transposon Tn10**, Plasmid., 43. 235-239, 2000.

Lee C.H., Hu S.T., Swiatek P.J., Moseley S.L., Allen S.D., So M.: **Isolation of a novel transposon which carries the *Escherichia coli* enterotoxin STII gene**, J. Bacteriol., 162. 615-620, 1985.

Levy S.B., McMurry L.M., Burdett V., Courvalin P., Hillen W., Roberts M.C., Taylor D.E.: **Nomenclature for tetracycline resistance determinants**, Antimicrob. Agents. Chemother., 33. 1373-1374, 1989.

Libisch B., Gacs M., Csiszár K., Muzslay M., Rókusz L., Füzi M.: **Isolation of an integron-borne *bla*VIM-4 type metallo-beta-lactamase gene from a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Hungary**, Antimicrob. Agents. Chemother., 48. 3576-3578, 2004.

Literak I., Dolejska M., Janoszowska D., Hrusakova J., Meissner W., Rzyska H., Bzoma S., Cizek A.: **Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland**, Appl. Environ. Microbiol., 76. 8126-8134, 2010.

Ma J., Zeng Z., Chen Z., Xu X., Wang X., Deng Y., Lü D., Huang L., Zhang Y., Liu J., Wang M.: **High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals**, Antimicrob. Agents. Chemother., 53. 519-524, 2009.

Mainil J.G., Daube G., Jacquemin E., Pohl P., Kaeckenbeeck A.: **Virulence plasmids of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from piglets**, Vet. Microbiol., 62. 291-301, 1998.

Martínez-Martínez L., Eliecer Cano M., Manuel Rodríguez-Martínez J., Calvo J., Pascual A.: **Plasmid-mediated quinolone resistance**, Expert. Rev. Anti. Infect. Ther., 6 685-711, 2008.

Mathew A.G., Saxton A.M., Upchurch W.G., Chattin S.E.: **Multiple antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from swine farms**, Appl. Environ. Microbiol., 65. 2770-2772, 1999.

Maynard C., Fairbrother J.M., Bekal S., Sanschagrin F., Levesque R.C., Brousseau R., Masson L., Larivière S., Harel J.: **Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs**, Antimicrob. Agents. Chemother., 47. 3214-3221, 2003.

Mayrhofer S., Paulsen P., Smulders F.J., Hilbert F.: **Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry**, Int. J. Food. Microbiol., 97. 23-29, 2004.

Mazel D., Dychinco B., Webb V.A., Davies J.: **Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene**, Antimicrob. Agents. Chemother., 44. 1568-1574, 2000.

McVeigh A., Fasano A., Scott D.A., Jelacic S., Moseley S.L., Robertson D.C., Savarino S.J.: **IS1414, an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable enterotoxin gene embedded in a transposase-like gene**, Infect. Immun., 68. 5710-5715, 2000.

Michalova R., Novotna T., Schlegelova J.: **Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them**, Vet. Med. (Czech), 49. 79-100, 2004.

Nagy B., Casey T.A., Moon H.W.: **Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary**, J. Clin. Microbiol., 28. 651-653, 1990.

Nagy B., Fekete P.Z.: **Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals**, Vet. Res., 30. 259-284, 1999.



Nolan L.K., Horne S.M., Giddings C.W., Foley S.L., Johnson T.J., Lynne A.M., Skyberg J.: **Resistance to serum complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli***, Vet. Res. Commun., 27. 101-110, 2003.

Nógrády N., Pászti J., Pikó H., Nagy B.: **Class 1 integrons and their conjugal transfer with and without virulence-associated genes in extra-intestinal and intestinal *Escherichia coli* of poultry**, Avian Pathol., 35. 349-356, 2006.

Olasz F., Fekete P.Z., Blum-Oehler G., Boldogkoi Z., Nagy B.: **Characterization of an F18+ enterotoxigenic *Escherichia coli* strain from post weaning diarrhoea of swine, and of its conjugative virulence plasmid pTC**, FEMS Microbiol. Lett., 244. 281-289, 2005.

ORSKOV F., ORSKOV I.: Serotyping of *Escherichia coli*. In: *Methods in microbiology, Vol. 14*. Szerk.: BERGAN T. London, United Kingdom: Academic Press, 1984. p. 43-112.

Parham N.J., Pollard S.J., Desvaux M., Scott-Tucker A., Liu C., Fivian A., Henderson I.R.: **Distribution of the serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae* among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli***, J. Clin. Microbiol., 43. 4076-4082, 2005.

Paterson D.L.: **Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae***, Am. J. Infect. Control., 34(5 Suppl 1):S20-8; discussion S64-73, 2006.

Pfaff-McDonough S.J., Horne S.M., Giddings C.W., Ebert J.O., Doetkott C., Smith M.H., Nolan L.K.: **Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis**, Avian Dis., 44. 23-33, 2000.

Poirel L., Cattoir V., Nordmann P.: **Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem?** Clin. Microbiol. Infect., 14. 295-297, 2008.

Roberts M.C.: **Update on acquired tetracycline resistance genes**, FEMS Microbiol. Lett., 245. 195-203, 2005.

Rosengren L.B., Waldner C.L., Reid-Smith R.J.: **Associations between antimicrobial resistance phenotypes, antimicrobial resistance genes, and virulence genes of fecal *Escherichia coli* isolates from healthy grow-finish pigs**, Appl. Environ. Microbiol., 75. 1373-1380, 2009.

Sabaté M., Prats G., Moreno E., Ballesté E., Blanch A.R., Andreu A.: **Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater**, Res. Microbiol., 159. 288-293, 2008.

Savarino S.J., McVeigh A., Watson J., Cravioto A., Molina J., Echeverria P., Bhan M.K., Levine M.M., Fasano A.: **Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli***, J. Infect. Dis., 173. 1019-1022, 1996.

Schlör S., Riedl S., Blass J., Reidl J.: **Genetic rearrangements of the regions adjacent to genes encoding heat-labile enterotoxins (*eltAB*) of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains**, Appl. Environ. Microbiol., 66. 352-358, 2000.

Schwarz S., Chaslus-Dancla E.: **Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance**, Vet. Res., 32. 201-225, 2001.

Schønheyder H.C., Højbjerg T.: **The impact of the first notification of positive blood cultures on antibiotic therapy. A one-year survey**, APMIS. 103. 37-44, 1995.

Sköld O.: **Resistance to trimethoprim and sulfonamides**, Vet. Res., 32. 261-273, 2001.

Smith M.G., Jordan D., Chapman T.A., Chin J.J., Barton M.D., Do T.N., Fahy V.A., Fairbrother J.M., Trott D.J.: **Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea**, Vet. Microbiol., 145. 299-307, 2010.

So M., McCarthy B.J.: **Nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains**, Proc. Natl. Acad. Sci., 77. 4011-4015, 1980.

Strahilevitz J., Jacoby G.A., Hooper D.C., Robicsek A.: **Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat**, Clin. Microbiol. Rev., 22. 664-689, 2009.

Szabó D., Kocsis B., Rókusz L., Szentandrassy J., Katona K., Kristóf K., Nagy K.: **First detection of plasmid-mediated, quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in Budapest, Hungary**, J. Antimicrob. Chemother., 62. 630-632, 2008.

Szmolka A., Anjum M.F., La Ragione R.M., Kaszanyitzky E.J., Nagy B.: **Microarray based comparative genotyping of gentamicin resistant *Escherichia coli* strains from food animals and humans**, Vet. Microbiol., (nyomtatás alatt), 2011.

Sáenz Y., Briñas L., Domínguez E., Ruiz J., Zarazaga M., Vila J., Torres C.: **Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins**, Antimicrob. Agents. Chemother., 48. 3996-4001, 2004.

Tartof S.Y., Solberg O.D., Manges A.R., Riley L.W.: **Analysis of a uropathogenic *Escherichia coli* clonal group by multilocus sequence typing**, J. Clin. Microbiol., 43. 5860-5864, 2005.

Taylor N.M., Davies R.H., Ridley A., Clouting C., Wales A.D., Clifton-Hadley F.A.: **A survey of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* and thermophilic *Campylobacter* spp. on poultry and pig farms in Great Britain**, J. Appl. Microbiol., 105. 1421-1431, 2008.

Thorsteinsdottir TR, Haraldsson G, Fridriksdottir V, Kristinsson KG, Gunnarsson E.: **Prevalence and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolated from animals, foods and humans in Iceland**, Zoonoses Public. Health., 57. 189-196, 2010.

Tóth I., Schmidt H., Kardos G., Lancz Z., Creuzburg K., Damjanova I., Pászti J., Beutin L., Nagy B.: **Virulence genes and molecular typing of different groups of *Escherichia coli* O157 strains in cattle**, Appl. Environ. Microbiol., 75. 6282-6291, 2009.

Tóth I., Ulrich D., Koscsó B., Kósa A., Herpay M., Nagy B.: Genetic and phylogenetic analysis of avian intestinal and extraintestinal *Escherichia coli*, and existence of cytolethal toxin gene cdt-IV carrying strains of O53 and O115, Avian Pathol., (kézirat bíráló alatt), 2011.

Valverde A, Cantón R, Galán JC, Nordmann P, Baquero F, Coque TM.: **In117, an unusual In0-like class 1 integron containing CR1 and *bla*(CTX-M-2) and associated with a Tn21-like element**, Antimicrob. Agents. Chemother., 50. 799-802, 2006.

van den Bogaard A.E., Stobberingh E.E.: **Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans**, Int. J. Antimicrob. Agents., 14. 327-335, 2000.

Veilleux S., Dubreuil J.D.: **Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals**, Vet. Res., 37. 3-13, 2006.

Webber M., Piddock L.J.: **Quinolone resistance in *Escherichia coli***, Vet. Res., 32. 275-284, 2001.

WHITE D.: Antimicrobial resistance in pathogenic *Escherichia coli* from animals. In: *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. Szerk.: AARESTRUP F.M. Washington: American Society for Microbiology, 2006. p. 145-166.

Xia L.N., Li L., Wu C.M., Liu Y.Q., Tao X.Q., Dai L., Qi Y.H., Lu L.M., Shen J.Z.: **A survey of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes from *Escherichia coli* isolates and their dissemination in Shandong, China**, Foodborne Pathog. Dis., 7. 207-215, 2010.

Yagi T., Kurokawa H., Shibata N., Shibayama K., Arakawa Y.: **A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan**, FEMS Microbiol. Lett., 184. 53-56, 2000.

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.: **Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in poultry and swine clinical isolates of *Escherichia coli***, Vet. Microbiol., 132. 414-420, 2008.

## **A doktori kutatás eredményeit tartalmazó közlemények és konferencia anyagok**

### **Közlemények:**

1. **Szmolka A.**, Anjum M.F., La Ragione R.M., Kaszanyitzky E.J., Nagy B.: Microarray based comparative genotyping of gentamicin resistant *Escherichia coli* strains from food animals and humans. *Vet. Microbiol.*, (nyomtatás alatt) 2011, doi:10.1016/j.vetmic.2011.09.030.
2. **Szmolka A.**, Fortini D., Villa L., Carattoli A., Anjum M.F., Nagy B.: First Report on IncN Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Gene *qnrS1* in Porcine *Escherichia coli* in Europe. *Microb. Drug. Resist.*, 17. 567-73, 2011.
3. **Szmolka A.**, Fortini D., Villa L., Carattoli A., Anjum M.F., Nagy B.: Kinolon rezisztencia plazmidok molekuláris epidemiológiai jellemzése sertés eredetű multirezisztens kommenzalista *E. coli* törzsekben. *Magy. Áo. Lapja*, (nyomtatás alatt) 2011.

### **Konferencia kiadványok:**

1. **Szmolka A.**, Fortini D., Villa L., Carattoli A., Anjum M.F., Nagy B.: First report on IncN plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* in porcine *Escherichia coli* in Europe. 16th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology. Abstract in: *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 58. 226, 2011.
2. **Szmolka A.**, Anjum M.F., La Ragione R.M., Kaszanyitzky É., Nagy B.: Gentamicin rezisztens állati és humán *Escherichia coli* törzsek antibiotikum rezisztencia és virulencia genotípusa. *Akadémiai beszámolók programfüzete*, p. 11., 2011.
3. **Szmolka A.**, Anjum M., Woodward M., González-Zorn B., Tóth Á., Adrián E., Kaszanyitzky É., Nagy B.: Microarray-based analysis of antimicrobial resistance genes in gentamicin-resistant *Escherichia coli* of food, human-, and animal origin isolated in Hungary. *MedVetNet 5th Annual Scientific Meeting Abstract Book*, p. 58., 2009.

## **A doktori kutatás témájához közvetlenül nem kapcsolódó eredmények közlései**

### **Közlemények:**

1. Rychlik I., Karasova D., Sebkova A., Volf J., Sisak F., Havlickova H., Kummer V., Imre A., **Szmolka A.**, Nagy B.: Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. BMC Microbiol., 9. 268, 2009.
2. **Szmolka A.**, Libisch B., Pászti J., Füzi M., Emody L., Nagy B.: Virulence and antimicrobial resistance determinants of human pathogenic and commensal strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Microbiol. Immunol. Hung., 56. 399-402, 2009.
3. Imre A., **Szmolka A.**, Olasz F., Nagy B.: Szerovarspecifikus plazmidok szerepe a *Salmonella*-törzsek virulenciájában. Magy. Áo. Lapja, 129. 428-440, 2007.
4. **Szmolka A.**, Kaszanyitzky E., Nagy B.: Improved diagnostic and real-time PCR in rapid screening for *Salmonella* in the poultry food chain. Acta Vet. Hung., 54. 297-312, 2006.

### **Konferencia kiadványok:**

1. **Szmolka A.**, Cramer N., Wiehlmann L., Nagy B.: Genomic analysis and clonality of Hungarian bovine and human strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Abstract Book, FEMS-Leopoldina-Symposium on Emerging Topics in Microbial Pathogenesis, p.108, 2011.
2. **Szmolka A.**, Imre A., Nagy B.: Colonization, invasion and interleukin induction by the strain *Salmonella* Hadar-18 and its SPI-1 mutants. Abstract CD, Poster Presentations „Microbial pathogens, host susceptibility and response”, 3rd Congress of European Microbiologists FEMS 2009, „Microbes and Man - independence and future challenges”. 2009.
3. **Szmolka A.**, Imre A., Nagy B.: *In vitro* assessment of virulence of invasive *Salmonella* serovars and by some of their mutants. 4th Annual Scientific Meeting Abstract Book, p. 43-44., 2008.

## Köszönetnyilvánítás

Köszönet illeti az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet vezetőit, munkatársait számos formában megnyilvánuló segítségükért és támogatásukért.

Köszönöm témavezetőmnek, **Nagy Béla** akadémikus úrnak, hogy tudásával, tapasztalatával és biztatásával megteremtette a munkához, majd a dolgozat elkészítéséhez szükséges szellemi és anyagi háttérrel. Köszönet konzulenseimnek **Fekete Péter Zsoltnak**, **Tuboly Tamásnak** hasznos tanácsaikért, és külön köszönöm **Imre Arielnek**, hogy önzetlen segítségére mindig számíthattam.

Köszönöm a témacsoport valamennyi munkatársának, **Puruczki Mártának**, **Sváb Domonkosnak**, **Tóth Istvánnak**, hogy tanácsaikkal és türelemmel segítették dolgozatom elkészültét. Kiemelten köszönöm **Sajtós Erikának** a munka egészéhez nyújtott jelentős technikai segítséget, továbbá **Lestár Barbarának**, aki a *tet(A)* plazmidok vizsgálatában nyújtott jelentős segítséget.

A dolgozat külföldön végzett részmunkáiban **Muna Anjumnak**, **Alessandra Carattolinak** és **Roberto La Ragionenak** tartozom köszönettel, akik lehetőséget adtak arra, hogy laboratóriumukban a munkához szükséges módszertani ismereteket elsajátíthassam. A vizsgált *E. coli* törzseket **Adrián Erzsébetnek**, **Barcsa Mártonnak**, **Füzi Miklósnak**, **Kaszanyitzky Évának** és **Tóth Ákosnak** köszönhetem, míg a plazmid profil vizsgálatokban **Király Margitnak** és **Pászti Juditnak** szíves együttműködésére és segítségére számíthattam.

Munkáink anyagi fedezetét jelentős részben az EU FP6 NoE (EuroPathoGenomics, Contract No. 512061) valamint az EU FP6 NoE (MedVetNet., WP29, Contract No. 506122) pályázatok jelentették.