

DIPLOMADOLGOZAT

Fodor Zsófia Csenge

**Mezőgazdasági biotechnológus
MSc hallgató**



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus
Mezőgazdasági Biotechnológus Szak**

**Brojler csirke eredetű *Salmonella* és *Escherichia coli* törzsek
antibiotikum rezisztenciával kapcsolt tulajdonságainak össze-
hasonlító vizsgálata**

- Belső konzulens:** Dr. Libisch Balázs
tudományos főmunkatárs,
MATE Genetika és biotechno-
lógia Intézet
- Külső konzulens:** Rapcsák Fanni
PhD hallgató, Enterális bakteri-
ológia és alimentáris zoonózis
témacsoport, Eötvös Loránd Ku-
tatási Hálózat (ELKH), Állator-
vostudományi Kutatóintézet
- Készítette:** **Fodor Zsófia Csenge**
BCIDU3
Mezőgazdasági biotechnológus
MSc hallgató, Levelező tagozat
- Intézet/Tanszék:** **Genetika és Biotechnológia Int.**

**Gödöllő
2023**

Tartalom

1.0	Rövidítések.....	4
2.0	Bevezetés	5
3.0	Szakirodalmi áttekintés	9
3.1	Az antibiotikumok rövid története	9
3.2	Az antibiotikumok használata a mezőgazdaságban.....	12
3.3	Antibiotikumok használata brojler csirke állományokban	13
3.4	Az antibiotikum rezisztencia megjelenése és elterjedése	14
3.5	Multidrog rezisztencia	16
3.6	A biofilm, mint komplex bakteriális közösség	17
3.7	Az enterális baktériumok szerepe.....	18
3.8	<i>Escherichia coli</i>	19
3.9	A különböző <i>Salmonella</i> szerovárok jellemzői.....	20
3.10	Enterális baktériumok elterjedése brojler csirke állományokban.....	21
3.11	Közegészségügyi vonatkozások	21
3.12	Az AR elleni küzdelem lehetőségei.....	22
4.0	A vizsgálatok módszerei.....	25
4.1	A felhasznált minták és baktérium törzsek.....	25
4.2	AR fenotípus meghatározás korong diffúzióval	27
4.3	Teljes genom szekvenálás	27
4.4	ResFinder 4.1 program használata szerzett AR gének azonosítására	28
4.5	Biofilm morfortípus és kvantitatív biofilm meghatározás.....	28
4.6	Statisztikai számítások.....	29
5.0	Eredmények és értékelésük	30
5.1.	Antibiotikum rezisztencia fenotípusok fajok és szerovárok közötti megoszlása	30
5.2	Mobilis antibiotikum rezisztencia gének WGS-alapú <i>in silico</i> analízise	32
5.3	<i>Salmonella</i> és kohabitáns <i>E. coli</i> törzsek biofilm morfortípusa	35
5.4	<i>Salmonella</i> és cohabitáns <i>E. coli</i> törzsek biofilm aktivitása.....	38
5.5	Az antibiotikum rezisztencia és biofilm kapcsolata.....	41
6.0	Következtetések és javaslatok	43
7.0	Összefoglalás.....	45
8.0	Köszönetnyilvánítás	45
9.0	Felhasznált irodalom.....	48
10.0	Nyilatkozat.....	55

1.0 Rövidítések

AMP*: ampicillin

AMR: antimikrobiális rezisztencia

AR: antibiotikum rezisztencia

bas: brown-and-smooth

bdar: brown-dry-and-rough

CHL*: kloramfenikol

CIP*: ciprofloxacim

CR: Kongóvörös és Coomassie brilliant kék agar

CTX: cefotaxim

EPS: extracelluláris polimer anyag

EU: Európai Unió

GEN*: gentamicin

HGT: horizontális géntranszfer

JPIAMR: Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance

LB agar: Luria-Bertani agar

MDR: multidrog rezisztencia

NAL*: nalidixinsav

pas: pink-and-smooth

PCR: polimeráz láncreakció

pdar: pink-dry-and-rough

ras: red-and-smooth

rdar: red-dry-and-rough

saw: smooth-and-white

SUL: szulfonamid vegyületek

TET*: tetraciklin

TOB*: tobramicin

TRI*: trimetoprim

WHO: World Health Organisation

XLD agar: Xylulose Deoxychocolate agar

*EUCAST (2022) alapján (<https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments>)

2.0 Bevezetés

Az antimikrobiális szerek, köztük az antibiotikumok alkalmazása a humán- és állatgyógyászatban olyan jelentős előnyökkel jár, mint a fertőző betegségek okozta morbiditás és mortalitás csökkentése, de az említett előnyök mellett számos hátrányos következménnyel is számolni kell. Az antibiotikumok széles körű használata ugyanis hozzájárul az antimikrobiális rezisztencia (AMR) kialakulásához, és az úgynevezett „szuperbaktériumok” elterjedéséhez, mivel a baktériumok fel tudnak venni, akár egymástól, akár a környezetükből antibiotikum rezisztencia (AR) géneket, melyek beépülhetnek a saját genomjukba (Martínez, 2014, Hutchings et al. 2019). A rezisztens baktériumok még komolyabb egészségügyi kockázatot jelenthetnek, ha szélesebb körben elterjednek, mivel a kialakult rezisztenciának köszönhetően ellenállhatnak az ellenük felhasznált antibiotikumnak és/vagy egyéb antimikrobiális szereknek. Mindezek miatt a World Health Organisation (WHO) 2015-ben megrendezett Közgyűlésén elfogadott egy az antibiotikum rezisztencia elleni küzdelemre vonatkozó Globális Cselekvési Tervet (WHO, 2015). A Cselekvési Tervben öt fő célt tűztek ki, melyek között szerepel az ismeretek bővítése adatok gyűjtésével és tudományos kutatások folytatásával az AMR-ről, valamint az antimikrobiális szerek optimalizált használata a humán- és állatgyógyászatban egyaránt (WHO, 2015). A célkitűzéseket a „One Health” („Egy Egészség”) elvek figyelembevételével fogalmazták meg. Ez egy olyan megközelítése a tudományos kutatásoknak, melynek során az emberekre, az állatokra és az ökoszisztémára gyakorolt hatásokat együttesen elemzik, mivel ez a három terület szorosan összefügg egymással. Ezen elvek figyelembevételével az Európai Unió (EU) is megfogalmazott az AMR elleni küzdelemre vonatkozó közös célkitűzéseket, és erőfeszítéseket tesz, hogy az AMR terjedést visszaszorítsa (The European Commission, 2017). Az európai célok között szintén szerepel a tudományos kutatás támogatása, és az is, hogy az EU vezető szerepet vállaljon az AMR terjedése elleni küzdelemben az egyre gyorsabban globalizálódó világban. Az Európai „One Health” Cselekvési Terv keretében (The European Commission, 2017) a 2017-ben kitűzött céloknak megfelelően az EU létrehozta a Joint Programming Initiative on Antimicrobial Resistance (JPIAMR) kezdeményezést, melynek célja, hogy nemzetközi szinten koordinálja a kutatási célokat és programokat, illetve segítse az országokat abban, hogy az AMR ellen megfelelő stratégiával lépjenek fel (The European Commission, 2017; JPIAMR, 2023). Jelenleg a JPIAMR-nek huszonkilenc tagállama van (1. ábra).



1. ábra JPIAMR tagországai; <https://www.jpiaamr.eu/about/jpiaamr-members>

A humánegészségügy mellett az antibiotikumok egy másik fontos felhasználója a mezőgazdaság, azon belül különösen az állattenyésztés, ami nem csak az AMR terjedését segítheti elő, de egyes zoonotikus betegségek megjelenését és előretörését is. Az állati eredetű termékek előállítási folyamatának több lépésében is használnak antimikrobiális szereket (Brown et al., 2017). Antimikrobiális szereket nem csak betegségek kezelésére vagy megelőzésére alkalmazhatnak, hanem az Európai Unión kívül, számos országban továbbra is elfogadott módszer, hogy antibiotikumokat élelmiszertermelő állatok tömeggyarapodása érdekében használjanak fel, illetve, hogy növeljék azok reprodukciós sikerét és a tápanyagok hasznosulását (Brown et al., 2017). Napjainkban leginkább fejlődő országokban alkalmazzák az antibiotikumokat, mint hozamfokozó készítményeket. Ezekben az országokban a gyors ütemű népességnövekedést, és az ezzel járó élelmiszerek iránti megnövekedett keresletet intenzív mezőgazdasági termeléssel próbálják kielégíteni. E folyamatokban közrejátszik az is, hogy az elmúlt időszakban világszerte megnövekedett a kereslet az állati eredetű fehérjék iránt. Ezért a hozamfokozás érdekében szubklinikai dózisban az állati takarmányhoz adagolt antibiotikumokat alkalmaznak, hogy a lakosság számára megfelelő mennyiségű és minőségű hústermék álljon rendelkezésre (Maron et al., 2013). Egyéb antimikrobiális szereket használhatnak a csomagolás során is, hogy csökkentsék a baktériumok vagy a penészgombák szaporodását, így növelve a termékek eltarthatóságát (Appendini & Hochkiss, 2002). Az élelmiszeripari antibiotikum használat miatt rezisztensé váló mikroorganizmusok nem csak az állatok egészségére jelentenek kockázatot, hanem az emberi egészségre is. A termékek feldolgozása során felhasznált antibiotikumok kijuthatnak a környezetbe is mint szennyező

szermaradványok, ahol további potenciális közegészségügyi kockázatot képviselnek. Bár az elmúlt években az az Európai Unió egészére számítva az élelmiszer-termelő állatok körében csökkent az antimikrobiális szerek felhasználása, az antibiotikum rezisztencia megfékezésére kitűzött célok még korántsem teljesültek (ECDC, EFSA, EMA, 2021, Manyi-Loh et al. 2018).

Az antibiotikum hatásnak jelentősen kitett brojlerállományokban világszerte nagymértékben elterjedtek az antibiotikum rezisztens *Salmonella* és *Escherichia coli* törzsek. A több antibiotikum csoporttal szembeni egyidejű rezisztenciát mutató multirezisztens (MDR) kórokozók hazai viszonylatban is egyre nagyobb kockázatot jelentenek, ezzel növelve a brojler és egyéb állati eredetű termékek potenciális élelmiszerbiztonsági kockázatát. Európában és számos más országban a brojler eredetű salmonellosisok első számú okozója a *S. Infantis*, míg a leggyakrabban előforduló humán megbetegedést okozó szerovár továbbra is a *S. Enteritidis*. Humán viszonylatban a *S. Infantis* a harmadik leggyakoribb szerovár (EFSA&ECDC, 2022). Az *E. coli* törzsek nagyfokú heterogenitást mutatnak a különböző antibiotikumokkal szemben mutatott rezisztenciára (Szmolka & Nagy 2013; Szmolka et al., 2021; EFSA & ECDC 2023). A rezisztens *Salmonella* szerovárok mint a *S. Infantis* továbbá a MDR *E. coli* törzsek elterjedése komoly élelmiszerbiztonsági- és közegészségügyi kockázatokat vethet fel, ezért fontos, hogy ezekről a baktériumokról minél több információt szerezzünk (EFSA&ECDC, 2022).

Egy további mechanizmus, ami elősegítheti a fenti kórokozó baktériumok elterjedését a biofilm-képző képessége. A biofilmek a Földön a legelterjedtebb életformák közé számítanak (Flemming et al., 2016). Azzal, hogy a baktériumok biofilmet képeznek számos számukra előnyös jellemzőre tesznek szert, melyek közé tartozik a fertőtlenítőszerekkel és a különböző antibiotikumokkal szembeni ellenállóképesség. A különböző biofilmekben nemcsak egy baktérium species vagy baktérium törzs lehet jelen, hanem egyszerre több baktérium is alkothatja a biofilmet, aminek következtében a különböző törzsek között létrejöhet a konjugáció, aminek segítségével akár rezisztencia gének horizontális átvitelére is sor kerülhet e mikroba közösségekben (Martínez 2014; Soucy et al. 2015).

Feltételezésünk szerint a *S. Infantis* törzsek előretörésében és globális elterjedésében azok biofilm képzése és a velük társultan előforduló (cohabitáns) MDR *E. coli* törzsek is aktív szerepet játszhattak.

Ezen hipotézisből kiindulva e dolgozat célkitűzései a következők:

1. Recens *E. coli*, *S. Infantis* és *S. Enteritidis* törzsek antibiotikum rezisztencia fenotípusának meghatározása, a rezisztencia-asszociált mintázatok és jellegzetes különbségek azonosítása.
2. A fent említett *E. coli* és *Salmonella* speciesek/szerovárak biofilm képző képességének és a biofilm morfológiájának összehasonlítása.
3. A rezisztencia gének és a biofilm képzés közötti potenciális összefüggések vizsgálata, a MDR esetleges hatása a biofilmképzésre.

A felvázolt célkitűzések és az azok vizsgálatából származó megfigyelések segíthetnek megérteni e baktérium közösségeken belül létrejövő komplex folyamatokat.

3.0 Szakirodalmi áttekintés

3.1 Az antibiotikumok rövid története

A XX. század elejéig számos olyan fertőző betegség létezett, ami jelentősen megrövidítette az emberek élettartamát. A baktériumok XVII. századi felfedezése, majd a következő századokban történő egyre alaposabb megismerése választ adott arra, hogy az egyes fertőző betegségeket milyen patogének okozzák. Elkezdődtek azok a kutatások is, amik arra irányultak, hogy e patogének által okozott fertőzéseket sikeresen kezelni lehessen. E kutatások során számos hatékony antimikrobiális szer, köztük antibiotikumokat fedeztek fel a XX. század második felében (Hutchings et al., 2019). Az antibiotikumok felfedezésük óta javították az életminőséget, segítettek leküzdeni a fertőzéseket, és ezek következményeként jelentősen megnövelték a várható élettartamot. Az antibiotikum első definícióját Selman Waksmannek (1888-1973) köszönhetjük: „az antibiotikumok olyan mikrobiális eredetű anyagok, amik gátolják a baktériumok és mikroorganizmusok növekedését vagy elpusztítják a baktériumokat és más mikroorganizmusokat”. Waksman eredeti definíciója előtt az antibiotikum megnevezést tágabb értelemben használták, így ez segített pontosítani annak használatát (Waksman 1947).

Az Európai Unió jogszabályai az antibiotikumok definícióját tovább szűkítik és pontosítják. Az Európai Parlament és a Tanács (EU) 2019/6 rendelete szerint egy **antimikrobiális szer**: „bármely olyan anyag, amely közvetlen hatást fejt ki a mikroorganizmusokra, fertőzések vagy fertőző betegségek kezelésekor vagy megelőzésekor alkalmazva, beleértve az antibiotikumokat, az antivirális szereket, a gombaölő szereket és a protozoaellenes szereket” az **antibiotikum** definíciója pedig a következő: „bármilyen olyan anyag, amely közvetlen hatást fejt ki a baktériumokra, és amelyet fertőzések vagy fertőző betegségek kezelésére vagy megelőzésére alkalmaznak”.

Az egyik első antimikrobiális szer, amit széles körben kezdtek el használni az 1910-es évektől kezdve a szalvarzán (salvarsan) volt. Ezt az arzén tartalmú vegyületet a szifilisz kezelésére alkalmazták (Lloyd et al., 2005). Mivel ez egy arzén tartalmú vegyület, a penicillin felfedezésével az alkalmazása is visszaesett. A talán a legismertebb antibiotikum a penicillin, ennek felfedezése Alexander Fleminghez (1881-1955) kötődik. A Fleming kísérletei során *Staphylococcus* baktériumok tenyésztésre szolgáló Petri csészék egy része penészgombával fertőződött be, és Fleming azt vette észre, hogy a megjelent penész telepek körül egy gátlási zóna alakult ki, ahol a *Staphylococcus* izolátumok elpusztultak. A penészgombát megvizsgálva megállapította, hogy az izolátum a *Penicillium* nemzetségbe tartozik. Különböző baktérium

fajokra tesztelve az izolátum hatását, és azt tapasztalta, hogy a penész által termelt hatóanyag baktericid, bakteriolitikus és növekedést gátló tulajdonságokkal rendelkezik a vizsgált baktériumokkal szemben (Fleming 1930). Mivel a leggyakoribb kórokozó baktériumok ellen jól használhatónak bizonyult a hatóanyag (amit penicillinnek nevezett el), a penicillin az egyik leggyakrabban használt antibiotikumává vált a felfedezését követő években. Azonban már 1950-es évekre sok baktérium fajnál megjelent a rezisztencia erre a vegyületre (Hutchings et al., 2019).

Waksman nevéhez nemcsak az első antibiotikum definíció megalkotása fűződik, de több antibakteriális hatással rendelkező anyagot is felfedezett. Talajban élő baktériumokat tanulmányozott, aminek során több antibakteriális hatással rendelkező *Streptomyces* törzset is azonosított. Az általa felfedezett antibiotikumok közé tartozik a neomicin és a sztreptomycin is, ezek voltak az első vegyületek, amiket sikeresen alkalmaztak a tuberkulózis kezelésére (Waksman et al., 1946).

A 1970-es évektől kezdve egyre kevesebb új természetes eredetű antimikrobiális vegyületet fedeztek fel, és vontak be klinikai kutatásokba. Jelenleg a legtöbb ilyen új hatóanyagot a már rendelkezésre álló antibiotikumok valamilyen kémiai tulajdonságának megváltoztatásával hozzák létre. A napjainkban használt főbb antibiotikum típusok (antibiotikum osztályok) nagy része már legalább hatvan éve használatban van, de ezeknek a hatásossága jelentősen lecsökkent az AR kialakulásának köszönhetően (Katz & Baltz; 2016, Hutchings et al., 2019). Azonban a kórokozó mikrobák genom szekvenálásainak és szerkesztéseknek köszönhetően új lehetőségek jelentek meg az új antimikrobiális szerek felfedezésének és fejlesztésének terén. A teljes genom szekvenálások felfedték, hogy a mikrobák bioszintetikus útvonalai több antimikrobiális hatású vegyületet hoznak létre, mint az eddig ismeretes volt (Katz & Baltz, 2016). Az új kutatási és fejlesztési eljárások széles körű alkalmazása új lendületet adhat újabb és hatásosabb antibiotikumok felfedezésének, ami hozzájárulhat az antibiotikum rezisztencia terjedése által okozott kihívások megoldáshoz.

Az antibiotikumok hatásmechanizmusuk és összetételük alapján különböző antibiotikum osztályokba tartoznak. Hatásuk alapján meg lehet különböztetni olyan antibiotikumokat, amik a sejtfal szintézist gátolják (például: β -laktámok), amik a fehérjék szintézisét gátolják (például: tetraciklinek), a nukleinsav szintézist gátolják (például: fluorokinolonok) vagy a metabolikus útvonalakat gátolják (például: szulfonamidok). Mindegyik osztályba többféle antibiotikum is tartozik (Uddin et al., 2021, CDC 2023, 2. táblázat).

2. táblázat Főbb antibiotikum osztályok, a CDC Antibiotic Resistance & Patient Safety Portal Outpatient Antibiotic Prescription Data alapján, módosítva (CDC, 2023)

Antibiotikum osztály	Példák	Hatásmechanizmus
Penicillinek	Penicillin, amoxicillin	Sejtfal szintézis gátlása
Makrolidok	Azitromicin, eritromicin	Fehérje szintézis gátlása
Cefalosporinok	Cefalexin, ceftazidim	Sejtfal szintézis gátlása
Fluorokinolonok	Ciprofloxacín, levofloxacín	DNS szintézis gátlása
β -laktám/ β -laktamáz gátló kombinációk	Amoxicillin/klavulánsav; Ceftazidim/avibaktam	Két hatóanyag kombinációja, ahol az egyik komponens feladata, hogy a β -laktamáz enzimet gátolja
Tetraciklinek	Tetraciklin, doxiciklin	Sejtosztódás gátlása a fehérjeszintézis gátlásával
Trimetoprim-sulfametoxazol	Trimetoprim-sulfametoxazol	Sejtosztódás gátlása, a folsav szintézisének megakadályozásával
Nitrofurán	Nitrofurantoin	Gátolja a citromsavciklust, valamint a DNS-, RNS- és fehérjeszintézist
Linkozamidok	Klindamicin	Sejtosztódás gátlása a fehérjeszintézis gátlásával

3.2 Az antibiotikumok használata a mezőgazdaságban

Az antimikrobiális szereket, köztük az antibiotikumokat nem csak a humán gyógyászatban használják, hanem a mezőgazdaságban is jelentős a különböző antimikrobiális hatású vegyületek felhasználása. Az antibiotikumokat a fertőző betegségek kezelése mellett az 1950-es évektől hozamfokozóként is alkalmazták, hogy az állattartás gazdaságosabb legyen, így csökkentve a termelés költségeit (Van Boeckel et al., 2015). Az elmúlt évtizedek során megnövekedett a kereslet az állati eredetű termékek iránt, így az antibiotikum használat is megnövekedett, hogy az állattenyésztés el tudja látni a fogyasztói igényeket. Míg kezdetben az antibiotikum használat elsősorban a fejlett országokra volt jellemző, addig az elmúlt időszakban a fejlődő országokban is egyre elterjedtebbé vált a használatuk. Részben azért, mert ezekben az országokban is megnövekedett az igény az állati eredetű fehérjék iránt, részben pedig mivel könnyebben hozzáférhetővé váltak az antibiotikumok. A fejlődő országokban azonban az antimikrobiális szerek alkalmazása általában kevésbé szabályozott, mint az európai vagy az észak-amerikai országokban. Az elkövetkező években az állattartók körében történő fokozott antibiotikum használat miatt várhatóan tovább terjedhet a baktériumok körében az AR (Kirchhelle, 2018; Van Boeckel et al., 2015). Az antibiotikumok hozamfokozóként történő használata elősegíti az állatállományon belül a gyorsabb növekedést, a hosszabb élettartam elérését, illetve a termelési hatékonyság optimalizálását. A hozamfokozás céljából használt antimikrobiális szerek ellen is ki tud alakulni AR, mivel ezeket a szereket szubklinikai dózisban adagolják az állatok táplálékához vagy ivóvizéhez, ami nem elégséges ahhoz, hogy a baktériumokat elpusztítsa. A hozamfokozókat többféle haszonállatnál is alkalmazzák, mint például a szarvasmarha, sertés, brojler csirke és egyéb szárnyasok (Brown et al., 2017). A felhasznált antibiotikumok szermaradékai az állati eredetű termékekben felhalmozódhatnak és a nem megfelelő tartási körülményeknek köszönhetően kikerülhetnek a talajba, talajvízbe. Így az ott élő baktériumok számára is könnyen hozzáférhető válnak a le nem bomlott szermaradványok. Az Európai Unió tagállamaiban 2006 óta teljeskörűen tiltott (European Commission, 2005), míg az Amerikai Egyesült Államokban részlegesen tiltott az antimikrobiális szerek hozamfokozásra történő alkalmazása. Továbbá, az Európai Bizottság (EU) 2022/1255 végrehajtási rendelete szerint a humán fertőzések kezelésére fenntartott antimikrobiális szerek mezőgazdasági felhasználása tiltott. Ennek az intézkedésnek az a célja, hogy a mezőgazdaságban és a humán egészségügyben használt kritikus fontosságú antibiotikumok között átfedés legyen, mivel ezek a korlátozások szintén csökkenthetik az AR terjedését (European Commission, 2005).

Az antimikrobiális anyagokat nemcsak az állattartók használják a mezőgazdaságban, de antibiotikumokat használnak a növénytermesztésben is, elsősorban fertőző betegségek megelőzésre és kezelésére. Ennek mennyisége elhanyagolható az állattartáshoz képest. A leggyakrabban használt ilyen antibiotikum a sztreptomycin. A sztreptomocint leginkább gyümölcsösökben, azon belül is almafáknál alkalmazzák betegségek kezelésére (Stockwell & Duffy, 2012). Annak ellenére, hogy ezt az antibiotikumot a humán gyógyászatban is használják, kevés esetben bizonyosodott be az AR kialakulása klinikailag fontos patogének körében, ahol visszavezethető lenne az AR kialakulása a mezőgazdasági felhasználásra. Donato és munkatársai 2010-ben közölt tanulmányukban kimutatták, hogy a sztreptomocinnal kezelt almafák vizsgálata során kimutatható volt több AR gén is. Az antibiotikumok nemcsak így kerülhetnek kapcsolatba növényekkel, hanem az állati eredetű trágyák felhasználásával vagy szennyezett öntözővízzel is a növényekre vagy a talajba kerülhetnek antibiotikumok. A talajban vagy a vízben is szert tehetnek egyes baktériumok AR génekre a horizontális géntranszfer (HGT) által (Donato et al., 2010).

Az antibiotikumok használata a mezőgazdaságban egy olyan komplex kérdéskör, ami sok összetevőből áll. Ide tartoznak az állatjólét, az etikai vonatkozások, a gazdasági környezet, valamint a környezetre gyakorolt hatások, így ezek összességét kell vizsgálni ahhoz, hogy teljes képet kaphassunk arról, milyen hatásokkal járhat az antimikrobiális szerek alkalmazása.

3.3 Antibiotikumok használata brojler csirke állományokban

A baromfitartás jövedelmezőbb a többi élelmiszer-termelő állat (szarvasmarha, sertés) tartásához képest mivel egyszerűbb és olcsóbb feltételeket igényel, így nagyobb lehet a profit is, ami az állattartóknál realizálódik (Siekkinen et al., 2012). Az alacsonyabb költségeknek köszönhetően könnyebben ki tudja elégíteni a világszerte egyre nagyobb keresletet az állati eredetű fehérjék iránt.

Antimikrobiális szereket, köztük antibiotikumokat brojler csirke állományokban szintén használnak a felfedezésük óta, mint más haszonállatoknál. Kezdetben elsősorban betegségek megelőzése és további terjedésük megelőzése céljából alkalmazták ezeket a szereket. Az XX. század közepén, az 1950-es években azonban azt tapasztalták, hogy az antibiotikum tartalmú táppal etetett brojlerek tömege gyorsabban gyarapodott, mint azoké az állatoké, amelyek nem kaptak ilyen takarmányt. Ezért azokban az országokban, ahol ilyen célra is elérhetőek voltak az antibiotikumok (beleértve Európát és Észak-Amerikát is) elterjedt lett a hozamfokozásra való alkalmazásuk. Az egyik ilyen alkalmazott antibiotikum a virginiamicin volt, amely már

alacsony dózisban alkalmazva is elősegítette az állatok tömeggyarapodását. Ebben az időszakban a táplálékkiegészítőként alkalmazott antibiotikumokat gyakran ajánlották is a gazdáknak hozamfokozásra (Harms et al., 1986).

A számos előny mellett azonban a hátrányokat is figyelembe kell venni, ha a különböző antimikrobiális szerek gyakori használatáról beszélünk, így különös figyelmet kell fordítani azokra a baktériumokra, amik rezisztenssé válhatnak a használatuk következtében.

3.4 Az antibiotikum rezisztencia megjelenése és elterjedése

A 2000-es évekre sajnos az addig leggyakrabban használt antibiotikumok már nem bizonyultak elég hatásosnak a fertőzések ellen, valamint kevesebb olyan új típusú antibiotikum került forgalomba, amik újra hatásosak lehetnének a rezisztenssé vált baktériumok ellen. Rezisztenciáról akkor beszélhetünk, ha egy antibiotikum már nem hatásos az alkalmazott dózisban az adott baktérium ellen. Az AR megjelenésére és terjedésére már A. Fleming is figyelmeztetett az 1945-ben tartott Nobel Előadásában. Felhívta a hallgatóság figyelmét arra, hogy a nem megfelelő dózisban használt penicillin rezisztenciát válthat ki a baktériumokban. Kísérletei során felismerte, hogy a nem megfelelő dózisban adagolt penicillin kezelés hatására nem minden baktériumsejt pusztul el, hanem egyes sejtek rezisztensé válnak és a további kezelés már hatástalan rájuk nézve (A. Fleming, 1945). Az 1950-es évektől kezdve egyre szélesebb körben és egyre többféle antibiotikumot kezdtek el használni, így egyre gyorsabb mértékben tudott terjedni a baktériumok körében az AR jelensége (Katz & Baltz, 2016).

Az AR kialakulásán belül meg lehet különböztetni a szerzett, illetve természetes rezisztenciát (lásd alább). Az antibiotikumokra rezisztens baktériumok kialakulásához hozzájárulhat a biofilmek képzése is, valamint a horizontális géntranszfer vagy toxin-antitoxin rendszerek, illetve mutációk a genetikai állományukban (Banin et al., 2017).

Természetes rezisztenciáról akkor beszélünk, ha az adott baktérium species eleve rendelkezik az AR kialakulásához szükséges genetikai háttérrel. Számos olyan antibiotikum van használatban, amik csak egy bizonyos sejtfallal rendelkező baktériumra hatásosak. Így azok, amik csak Gram-pozitív baktériumokra hatnak, a Gram-negatív baktériumokkal szemben a sejtfallal szerkezetéből adódóan nem hatásosak, tehát a Gram-negatív baktériumok ezekkel szemben természetes rezisztenciával rendelkeznek. Ilyen antibiotikum például a vankomicin. Más mechanizmusok mellett efflux pumpák is elősegíthetik az AR kialakulását. Természetes AR mechanizmusok jelenléte jellemző számos talajlakó baktériumra (Cox & Wright, 2013; Martínez, 2014). Ezért a trágyázás során a talajjal érintkező enterális

baktériumok közvetlenül kapcsolatba kerülhetnek olyan talajlakó baktériumokkal, amelyek már rendelkeznek valamilyen antibiotikum rezisztencia mechanizmussal, így ezeket az enterális baktériumok is átvehetik horizontális géntranszfer (HGT) útján.

A szerzett AR gének terjedését segíti elő a horizontális géntranszfer (HGT). A horizontális géntranszfer fő mechanizmusai az AR gének átadása és terjedése során a konjugáció, a transzformáció és a transzdukció. A konjugáció során két baktérium között közvetlen kapcsolat (egy úgynevezett pilus) létesül, melyen át genetikai anyag jut az egyik sejtbe a másik sejtbe. A konjugáció további feltétele, hogy a donor sejtben legyen mobilizálható DNS. Transzformáció során az exogén genetikai anyag felvétele a környezetből történik. Transzdukció esetén pedig bakteriofágok a közvetítők (Cox & Wright, 2013; Martínez 2014; Soucy et al., 2015). A HGT során tehát nem a szülő és utód sejt között történik a genetikai anyag átadása. A szerzett AR géneket a baktériumok nem csak klinikai vagy mezőgazdasági környezetben vehetik fel, de a természetes környezetből is.

Az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló életforma a Földön a bakteriális biofilm. A biofilmeken belül közvetlenül érintkezhetnek egymással olyan baktériumok, amelyek közül egyesek már rendelkeznek AR génekkel, így a HGT által más baktériumok is szert tehetnek ezekre a génekre (Flemming et al., 2016).

Az AR terjedésében tehát nem csak a humán gyógyászatnak van szerepe, de jelentősen hozzájárul a mezőgazdasági antibiotikum felhasználás is. A szerzett AR kialakulásához hozzájárulhatnak az állati eredetű termékekben jelen lévő antibiotikum szermaradványok is. Ezek a maradék antibiotikumok olyan alacsony koncentrációban lehetnek jelen az állati termékekben, hogy a bélflórában található baktériumok rezisztenssé válhatnak velük szemben. Erre egy jellemző példa az Európában hozamfokozóként korábban használt avoparcin. Ennek hatására az állatállományban megnövekedett a vankomicin-rezisztens *Enterococcus* (VRE) törzsek száma. A későbbiekben nem csak az állati eredetű termékekben, de azon embereknek bélflórájában is kimutatható volt a VRE, akik VRE-vel szennyezett termékeket fogyasztottak és tünetmentesek voltak (Marshall & Levy, 2011). Már az 1970-es években felfigyeltek arra a jelenségre, hogy tetraciklin-rezisztens baktériumok baromfírről baromfira, majd baromfírről emberre terjedtek át (Levy et al., 1976). Azon emberek és családjaik béltraktusát, akik közvetlenül érintkeznek, ezekkel a haszonállatokkal tehát olyan baktériumok kolonizálhatják, amelyek már rendelkeznek valamilyen antibiotikum rezisztenciával. Ezeket a rezisztens baktériumokat pedig hordozóik tovább tudják adni további állatoknak és embereknek is (Van Den Bogaard et al., 2002).

A nemzetközi kereskedelem és szállítmányozás által az antibiotikumokkal szennyezett termékek és velük együtt az AR-t okozó gének távoli földrajzi régiókba is eljuthatnak. Az AR terjedéséhez az is hozzájárulhat, hogy az emberek egyre könnyebben és gyakrabban utaznak távoli földrajzi régiókba. A turizmus tehát nagyban elősegíti, hogy új földrajzi területeken jelenjenek meg olyan rezisztens baktériumok és AR gének, amelyek addig arra a régióra nem voltak jellemzőek. A turizmus által nem csak az AR tud terjedni, de új betegségek is meg tudnak jelenni olyan országokban, ahol addig nem voltak jellemzőek (MacPherson et al., 2009). Mindezekből következik, hogy a személyes higiénia is nagy gondot kell fordítani annak érdekében, hogy csökkentsük az antibiotikum-rezisztens kórokozók terjedésének kockázatát.

3.5 Multidrog rezisztencia

Az elmúlt évtizedek során egyre több baktérium speciesnél jelent meg az AR, és ezzel párhuzamosan megjelentek olyan baktériumok is, amelyek nem csak egy antibiotikum osztály ellen rezisztensek. Ha egy baktérium legalább három különböző antibiotikum osztály tagjaira rezisztens, akkor multidrog rezisztenciáról (MDR) beszélünk (Magiorakos et al., 2012). Az ilyen MDR baktériumok okozta fertőzések ellen még nehezebb védekezni, mivel nem csak egy antibiotikum osztályba tartozó antibiotikum ellen mutatnak rezisztenciát, így sokkal szűkebbek a lehetőségek a kezelésükre. Az ilyen tulajdonságokkal rendelkező baktériumokat „szuperbaktériumoknak” is nevezik. Szuperbaktériumokat egyaránt találhatunk a Gram-pozitív és Gram-negatív sejtfallal rendelkező speciesek körében is, mások mellett ilyenek lehetnek *E. coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Campylobacter jejuni* izolátumok, hogy csak néhány példát említsünk. Látható, hogy ezek között megtalálhatóak olyan baktériumok is, amelyek mind az állattartás, mind a humán egészségügy szempontjából fontosak (EFSA&ECDC, 2022). A multidrog rezisztencia kialakulása, ugyanúgy, mint az AR kialakulása egy természetes folyamat, de az MDR törzsek elterjedésében jelentős szerepet játszik az antimikrobiális szerek nem megfelelő használata is (Tanwar, et al., 2014).

Az antibiotikumokkal szembeni multirezisztenciának különböző szintjei vannak, ezek definíciói a következők:

- a. A multidrog rezisztens (multidrug-resistant, MDR) baktériumok három vagy több antibiotikum kategórián (osztályon) belül legalább 1-1 gyógyszerrel szemben rezisztensek.

- b. A kiterjedten-gyógyszerrezisztens (extensively drug-resistant, XDR) baktériumok olyan izolátumok, amelyek csak 1 vagy 2 antibiotikum-kategóriára (osztályra) maradnak érzékenyek
- c. A pánrezisztens (pandrug-resistant, PDR) baktériumok rezisztensek minden antibiotikummal szemben, minden antibiotikum kategóriában. A PDR baktériumok hordozzák a tehát a legmagasabb szintű rezisztenciát, ami azt jelenti, hogy nincsenek olyan engedélyezett antimikrobiális szerek, amelyek hatást fejtenek ki ezekkel a baktérium törzsekkel szemben (Magiorakos et al., 2012).

3.6 A biofilm, mint komplex bakteriális közösség

Az egyik legelterjedtebb komplex bakteriális közösség a biofilm. A biofilmek kialakításának képessége számos előnnyel jár a baktériumok számára, mivel a biofilmek a különböző mechanikai hatásoknak, vegyszereknek és az antibiotikumoknak is jobban ellenállhatnak. A biofilmek állhatnak egy baktérium fajból, de akár több fajból álló közösségeket is kialakíthatnak, ez utóbbiban a különböző fajok kölcsönhatásba léphetnek egymással, ami további előnyökkel járhat számukra. Biofilmek kialakulhatnak a környezetben vagy az állati, emberi szervezetben is. Az állatokat, embereket sok mikroba kolonizálhatja, mind a test felszínén, mind pedig a testen belül, a szervezetben. Ezek a mikroorganizmusok a szervezet számára lehetnek hasznosak, de mivel nem csak a hasznos mikroorganizmusok, hanem a kórokozók is képesek a biofilmek kialakítására (Yan & Bassler, 2021), fontos, hogy minél inkább megismerjük ezt az életformát, hogy minél hatékonyabban lehessen védekezni ellene.

A biofilmek kialakulásához több tényező is hozzájárul, ide tartoznak a megváltozott környezeti feltételek, a hozzáférhető tápanyag mennyisége, a sejtek közötti kommunikáció, a szignalizációs kaszkádok, valamint a másodlagos hírvivő molekulák. A biofilmek kialakulása egy több lépéses folyamat. A baktériumok maguk köré egy extracelluláris polimer anyagot (EPS) választanak ki maguk köré. Az EPS mátrix poliszacharidokból (általában cellulózból), fehérjékből, valamint extracelluláris DNS-ből áll. A mátrix elősegíti, hogy a sejtek hozzátapadassanak a felülethez, valamint egy elsődleges védelmi vonalat képez a különböző mechanikai és kémiai hatásokkal szemben (Rather, et al., 2021; Yan & Bassler, 2021).

Az EPS mátrix elősegítheti a biofilmben élő mikroorganizmusok toleranciáját valamint rezisztenciáját az alkalmazott antimikrobiális szerekkel szemben. Tolerancia kialakulhat a biofilm lassú növekedése révén, valamint az antibiotikumok inaktiválása vagy „becsomagolása” segítségével. Az EPS mátrix segít abban, hogy az antibakteriális hatóanyagoknak egy olyan

szintje, koncentrációja alakuljon ki a biofilmben, ami már nem képes elpusztítani az összes baktériumsejtet, így az antibiotikummal szemben először tolerancia, majd pedig AR alakulhat ki (Flemming et al., 2016).

A legtöbb tanulmány olyan bakteriális biofilmeket vizsgál, melyek csak egy baktérium speciesből állnak, de a környezetben az is előfordul, hogy a különböző fajokba, törzsekbe tartozó baktériumok közösen alakítanak ki biofilmeket. A közös biofilmek segítségével a különböző fajok segíthetik egymás túlélését, erősíthetik a másik faj egyes tulajdonságait, valamint új tulajdonságokra tehetnek szert HGT segítségével. A *Salmonella* és *E. coli* által közösen alkotott biofilmek jobban ellenállnak a klór tartalmú tisztítószernek, mintha egyedül alkotnák a biofilmet, vagy planktonikus formában lennének. Ez különösen fontos a húsfeldolgozó üzemek szempontjából, ahol az üzemi felületeken könnyebben fennmaradhatnak ilyen biofilmek a tisztítószerekkel szembeni nagyobb ellenállásuknak köszönhetően. A biofilm megnövekedett klór toleranciája miatt nehezebb tisztítani ezeket a felületeket, ami növeli a termékek szennyeződésének esélyét, ez pedig kockázatot jelenthet az emberi egészségre, valamint elősegítheti a vegyszerekkel szembeni tolerancia terjedését az üzemeken kívül is (Lin et al., 2022).

3.7 Az enterális baktériumok szerepe

A bélrendszerben természetesen előforduló mikroorganizmusok nélkülözhetetlenek az gazdaszervezet számára. Probléma akkor jelenik meg, ha kórokozók kerülnek be a bélrendszerbe a szervezet lecsökkent védekező képessége mellett, amik így betegségeket okozhatnak. A humán szempontból fontosabb enterális baktériumok körében megtalálhatóak olyan aerob és anaerob baktériumok is, amelyek elengedhetetlenek a normális bélműködéshez. A bél mikrobióta összetétele függ az étrendtől, az egyedre jellemző adottságoktól, valamint a környezettől is, amiben az egyed él, és attól is, hogy a bélrendszer melyik szakaszán vizsgáljuk (Adak & Khan, 2019). A bélrendszerben jelenlevő baktériumok részt vesznek a bevitt táplálék emésztésében, elindíthatnak különböző immunológiai válaszokat, szerepet játszanak különféle vitaminok szintézisében és hatással lehetnek az idegrendszerre is (Thursby & Juge, 2017). Egy megváltozott összetételű bél mikrobióta nem feltétlenül tudja ellátni minden funkcióját, így ha felborul az egyensúlya könnyebben teret nyerhetnek a kórokozók.

Az enterális baktériumok is hordozhatnak AR géneket, amiket tovább tudnak adni más baktériumoknak. A betegségek kezelésére felhasznált antibiotikumok nem csak a patogén baktériumokra vannak hatással, de a normál bélflóra tagjaira is. Ha a normál flóra abundanciája

lecsökken, és az alkalmazott antibiotikumok nem elég hatásosak a kórokozókkal szemben, ez utóbbiak még jobban elszaporodhatnak a bélrendszerben (Thursby&Juge,2017).

3.8 *Escherichia coli*

Az *E. coli* egy pálca alakú, fakultatív anaerob Gram-negatív baktérium, a normál bél mikrobióta tagja. A születés utáni néhány órában képes kolonizálni a vastagbelet (Kaper et al., 2004). A biotechnológiai kutatások kedvelt modell organizmusa. A természetesen előforduló nem patogén *E. coli* törzsek a bélrendszerben biofilmet képezve védelmet nyújthatnak a patogén baktériumokkal szemben (Eberl et al., 2021). Mivel ez a baktérium a bélflórában természetesen is előfordul, az AR gének megjelenése nem csak a patogén törzsekre jellemző.

A patogén *E. coli* törzsek a leggyakrabban előforduló kórokozó baktériumok közé tartoznak napjainkban. Sikerességük nagyban köszönhető a körükben elterjedt nagy számú virulencia faktornak és AR génnek, melyek segítségével számos új niche-t tudnak elfoglalni. Az *E. coli* törzsek jól jellemezhetőek a felületi lipopoliszacharid (O) és a csilló (H) antigének alapján, így szerotipizálás segítségével a kórokozó törzseket és patotípusokat megkülönböztethetjük a normál flóra tagjaitól. (Kaper et al., 2004). A különböző patotípusok különböző megbetegedéseket okozhatnak, amelyekben belül három fő csoportot lehet megkülönböztetni, ezek az alábbiak: enterális megbetegedést okozó, húgyúti fertőzést okozó, és a szepszist vagy meningitist okozó típusok (Kaper et al., 2004).

Az *E. coli* különböző antibiotikum osztályokba tartozó antibiotikumok elleni AR génjei lehetnek kromozómán vagy plazmidokon kódolva is, amik együttesen MDR fenotípust is eredményezhetnek. Az AR előfordul mind a patogén mind a kommenzalista *E. coli* törzsek körében is. A tetraciklinek elleni rezisztenciában nagy szerepet kapnak az efflux pumpák, a melyek eltávolítják a citoplazmából az antibiotikumot. Az ezt kódoló AR génekre példák a *tet(A)*, *tet(B)*, és *tet(C)* gének. A szulfonamid rezisztens törzsek pedig jellemzően *sul1*, *sul2*, vagy *sul3* géneket hordozhatnak plazmidjaikon (Wu et al., 2010; Urban-Chmiel et al., 2022).

Az *E. coli* törzsek azon tulajdonsága, hogy képesek biofilmet létrehozni különböző felületeken, a virulencia faktorokon és AR géneken felül nagyban hozzájárul ahhoz, hogy jelentős kórokozóvá váljon mind a humán gyógyászatban, mind a húsiparban (Kaper et al., 2004). Első lépésben a planktonikus formában a mozgó sejtek megközelítik a felületet, majd letapadnak a felületen és megkezdik a felület kolonizációját (Beloin et al., 2010). A curli-fimbria egy olyan *E. coli* felületi virulencia-faktor, amely az élő és élettelen felületekhez tapadást, s így a kolonizációt segíti elő (Prigent-Combaret et al., 2000). A biofilm érése közben

éri el a jellemző háromdimenziós szerkezetét, amiben nagy szerepet kapnak a baktériumok egymással létesített kapcsolatai, mivel e kapcsolatok segítségével tudnak egymással kommunikálni (Beloin et al., 2010).

3.9 A különböző *Salmonella* szerovárok jellemzői

A *Salmonella* szerovárok, az *E. coli*-hoz hasonlóan Gram-negatív, pálcá alakú, fakultatív anaerob baktériumok, amik a legismertebb kórokozók közé tartoznak. A legtöbb törzs képes a mozgásra, ami szintén elősegíti a terjedésüket. Az emlősöket és a madarakat fertőző szerovárok a *Salmonella enterica* speciesbe tartoznak (Ryan et al., 2017).

A különböző szerovárokkal az emberek leginkább a szárnyasok útján kerülhetnek kapcsolatba, de nem ritka, hogy más állati termékekben is kimutatásra kerülnek ezek a patogének (EFSA&ECDC, 2022). Míg a fejlődő országokban a tífuszos megbetegedést okozó szerovárok a jellemzők, addig a fejlett országokban más szerovárok kerültek előtérbe, ez utóbbiak zoonózis során kerülhetnek kapcsolatba az emberekkel (Threlfall et al., 2002). Míg a fejlődő országokban a fertőzések visszaszorítására elsősorban a közegészségügyi állapotokat próbálják fejleszteni a tiszta ivóvízhez történő hozzáférhetőség javításával, vagy a védőoltások bevezetésével, addig a fejlett országokban inkább az antibiotikum használatra fektetik a nagyobb hangsúlyt (Crump et al., 2015), és ez utóbbi elősegítheti a rezisztens törzsek megjelenését és terjedését.

Jellemzően a leggyakrabban használt antibiotikumokra alakult ki AR a *Salmonella* izolátumok körében, úgy mint az aminoglikozidok, β -laktámok, kloramfenikol, kinolonok, tetraciklinek, szulfonamidok, trimetoprim, valamint kolisztinek ellen (Urban-Chmiel et al., 2022). A β -laktám típusú antibiotikumok ellen gyakran β -laktamáz enzimeket termelnek, ezeket többek között *bla_{TEM}* gének kódolhatják, amik lehetnek kromoszómán vagy mobilis genetikai elemeken lokalizáltak (Urban-Chmiel et al., 2022). A tetraciklin rezisztenciát okozó gének leggyakrabban a *tet(A)* és *tet(B)* gének (Chen et al., 2004). A szulfonamidok elleni rezisztenciát jellemzően a *sul1*, *sul2* és/vagy *sul3* gének jelenléte okozza (Antunes et al., 2005).

A *Salmonella* elterjedését segítheti, hogy az *E. coli*-hoz hasonlóan a legtöbb szerovár szintén képes biofilmet kialakítani, és ezek segítségével túlélni a számukra kedvezőtlen környezetekben. A vágóhídi környezetben a feldolgozás során tehát baktériumokkal szennyeződhetnek a felületek, és biofilm képződés jöhet létre. A biofilm háromdimenziós szerkezetének köszönhetően az ebben található baktériumok jobban ellenállnak a vegyszeres kezeléseknél, valamint az antibiotikumok hatásainak (Merino et al., 2019). Laboratóriumi

körülmények között a különféle szerovárok különböző morfortípusokat hozhatnak létre, és Kongóvörös agaron a morfortípusok megjelenése függ a hőmérséklettől is. A leggyakrabban előforduló morfortípusok között meg lehet különböztetni a rdar (red-dry-and-rough), pdar (pink-dry-and-rough), bdar (brown-dry-and-rough), saw (smooth-and-white) típusokat. A morfortípusok kialakulása függ a cellulóz, illetve a *curli* fimbria jelenlététől is. Az rdar típusnál cellulóz és *curli* fimbria is jelen van, a bdar típusnál csak *curli* fimbria van jelen, a pdar típusnál pedig csak cellulózt tartalmaz a biofilm, míg a saw morfortípusnál sem cellulóz, sem pedig a *curli* fimbria nincs jelen a biofilmben (White et al., 2006; Malcova et al., 2008).

3.10 Enterális baktériumok elterjedése brojler csirke állományokban

A brojler csirke állományok és az egyéb baromfiállományok is sok esetben hordoznak humán szempontból fontos patogéneket, amelyek zoonotikusak is lehetnek. A legismertebb és leggyakoribb ilyen baktériumok a különböző *Salmonella* és *Campylobacter* fajok (EFSA&ECDC, 2022). Ezek a baktériumok nem feltétlenül okoznak az állatoknál megbetegedést vagy látható elváltozást, de komoly egészségi problémákat okozhatnak az emberek körében. Ezek a baktériumok leggyakrabban a fekális-orális úton terjednek, ezért a fertőzések megelőzése érdekében komoly figyelmet kell fordítani a személyi higiéniára.

Hazai viszonylatban a *Salmonella* szerovároknál a 2000-es évek elejétől, megfigyelhető egy szerovár váltás. A hazai brojler állományokban az *S. Enteritidis* visszaszorulását és a multirezisztens (MDR) *S. Infantis* törzsek egyidejű megjelenését és elterjedését lehetett megfigyelni. Az addig domináns *S. Enteritidis*-t felváltotta a *S. Infantis* mint domináns szerovár (Nógrády et al., 2008; Szmolka et al., 2018).

3.11 Közegészségügyi vonatkozások

Az AR ma már egy olyan világszerte elterjedt probléma, ami az emberi egészséget és az állategészségügyet egyaránt érinti, ezért a „One Health” („Egy Egészség”) alapelvek alapján kell megközelíteni. E megközelítés során a humán vonatkozású, az állategészségügyre és az ökoszisztémára gyakorolt hatásokat együttesen elemzik, mivel ez a három terület szorosan összefügg egymással (WHO, 2015). Az előzőekben láthattuk, hogy a humán populáció nem csak közvetlenül gyógyszeres kezelés során érintkezhet az antimikrobiális szerekekkel, hanem az állattartásban, növénytermesztésben történő alkalmazások következtében is kapcsolatba kerülhetnek antibiotikum szermaradványokkal, vagy antibiotikum-rezisztens baktériumokkal. Mezőgazdasági tevékenységek során (például termőföldek trágyázása vagy szennyvíziszappal történő kezelése) is AR gének juthatnak a környezetbe, így olyan baktériumok körében is el

tudnak terjedni, amik korábban nem rendelkeztek AR génekkel. Az antibiotikum szermaradványok pedig szelektív nyomást gyakorolnak az érintett baktérium közösségekre, és ki is szoríthatják a természetes közösségeket is az ökoszisztémából (Zhao et al.,2020).

Az antimikrobiális szerek használatának elsődleges célja a fertőző betegségek megelőzése és kezelése, de azok túlzott vagy nem megfelelő használata sok kockázattal járhat, mind az emberi, mind az állati egészségre nézve az AR terjedésének elősegítése miatt. A leggyakoribb zoonotikus kórokozók között található a *Campylobacter* spp., a *Salmonella* spp. valamint az *E. coli*. A *Campylobacter* spp., és a *Salmonella* spp. leggyakrabban baromfiállományokban fordul elő, így a legnagyobb valószínűséggel e baktériumokkal fertőzött vagy szennyezett baromfitermékekkel kerülhetnek kapcsolatba a vásárlók (EFSA&ECDC, 2022). Van den Bogaard és munkatársai a 2002-ben olyan munkavállalók enterális baktériumait vizsgálták, akik antibiotikumokat nagy mennyiségben használó brojler csirke farmokon dolgoztak. Vizsgálataik során megállapították, hogy az állatok bélsár mintáiból izolált AR gének a farmon dolgozók valamint családjuk körében is megjelentek a bélflórában (Van den Bogaard et al., 2002). E megfigyeléseik alapján elképzelhető, hogy más zoonotikus betegségeknél is összefüggésbe hozható az AR gének megjelenése, illetve terjedése a haszonállatok és a velük közvetlen kapcsolatban levő emberek körében.

3.12 Az AR elleni küzdelem lehetőségei

A világszerte nagy mennyiségben alkalmazott antibiotikumok használatát optimalizálni kell annak érdekében, hogy csökkenteni lehessen az antibiotikum-rezisztens baktériumok és AR gének terjedését. Ennek során az elérhető legjobb szakmai irányelveknek megfelelően kell alkalmazni a felhasználni az antibiotikumokat, be kell tartani a vonatkozó (például európai uniós, lásd: Európai Parlament és a Tanács (EU) 2019/6 Rendeletét) jogszabályokat és törvényeket, mivel ezek együttes alkalmazásától várhatóak ezen a területen pozitív irányú változások. Az antibiotikumok csökkent arányú alkalmazása mellett a bakteriális fertőzéseket megelőző intézkedések is szerepet játszhatnak az AR visszaszorításában, például védőoltások használata vagy a nem megfelelő higiénia javítás révén (WHO 2015). Mivel 1950-es és 1980-as évtizedek közötti időszakhoz képes lecsökkent a forgalomba kerülő, új típusú hatóanyagot tartalmazó antibiotikumok száma, egyre nagyobb figyelem fordul a vakcinák használatára, valamint az antibiotikumok alternatíváinak fejlesztésére, köztük a növényi kivonatokon alapú antimikrobiális szerekkel (Martínez 2014; Katz & Baltz 2016). A védőoltások használata a humán gyógyászatban jelenleg elterjedtebb, mint az állattenyésztésben. Mivel a vakcinák előállítási és fejlesztési költségei magasak, az állattartóknak nem feltétlenül éri meg anyagilag

ezt a módszert alkalmazni, amennyiben az antibiotikumok könnyebben hozzáférhetőek és olcsóbbak is (Xiong et al., 2018), mivel ez utóbbi esetben a várható profit magasabb lesz.

Az európai kormányzatok az első között ismerték fel, hogy a hozamfokozóként alkalmazott antibiotikumok hosszú távú hatásai károsak, ezért e hozamfokozók mezőgazdasági alkalmazásának törvényi korlátozását vezették be. Az első európai ország, amely betiltotta az antibiotikumok hozamfokozásra történő alkalmazását Svédország volt 1986-ban, példáját Dánia is követte 2000-ben, majd végül az Európai Unió egységes törvényi tiltást vezetett be 2006-tól (Xiong et al., 2018). Az Európai Unióban a „One Health” elvek figyelembevételével hozzák meg az antibiotikumokra vonatkozó új szabályozási döntéseket. Az egyik legújabb vonatkozó európai uniós jogszabály az „Európai Parlament és a Tanács (EU) 2019/6 rendelete az állatgyógyászati készítményekről”, amely 2022. január 28-án lépett hatályba. A Rendelet részletesen szabályozza az antimikrobiális szerek állatgyógyászati használatát, és más előírások mellett rögzíti, hogy:

- (1) Az antimikrobiális gyógyszerek nem alkalmazhatók a rossz higiénia, vagy a nem megfelelő gazdaságirányítás kompenzálására.
- (2) Az antimikrobiális gyógyszerek nem használhatók állatokon a növekedés elősegítésére vagy a hozam növelésére
- (3) Az antimikrobiális gyógyszerek csak kivételes esetekben használhatók megelőzésre, akkor, ha a fertőzés vagy egy fertőző betegség kockázata nagyon magas, és a következmények valószínűsíthetően súlyosak
- (4) Antimikrobiális gyógyszerek csak akkor használhatók metafilaris céljára, ha egy fertőzés vagy egy fertőző betegség állatcsoporton belüli terjedésének kockázata magas, és ha más megfelelő alternatíva nem áll rendelkezésre.

(részletesen lásd: az Európai Parlament és a Tanács (EU) 2019/6 Rendeletét).

Mint említettük, a fertőzések kezelésének és megelőzésének az antibiotikumok helyett alternatív módszerei is rendelkezésre állnak, például probiotikumok, védőoltások vagy növényi kivonatok alkalmazása. Nagy előrelépést jelenthet az antibiotikumokra rezisztens mikroorganizmusok terjedésének fékezésében az érintett izolátumok teljes genom szekvenálása is, mivel e módszer használatával átfogóan megismerhetők és így célzottan gátolhatóvá válhatnak azok a mobilis genetikai elemek és AR mechanizmusok, amik szerepet játszanak az AR kialakulásában és terjedésében. További eszköz lehet az AR terjedésének visszaszorításában bakteriofágok célzott alkalmazása is, melyeket az antibiotikumok

elterjedése előtt Oroszországban és Grúziában is sikeresen alkalmazták (Katz & Baltz, 2016; Uddin et al., 2021).

Az AR terjedésének megfékezésében az államoknak összehangoltan és nemzetközi együttműködések keretében kellene fellépnie, mivel ez egy az egész emberiséget érintő közös probléma, ami súlyos következményekkel járhat. Ezért is szükséges, hogy a mikroorganizmusokra vonatkozó tudásunkat minél inkább elmélyítsük, és hogy olyan új terápiás eljárásokat lehessen kifejleszteni, amelyek alkalmazása mellett visszaszorulhat az AR terjedése. Annak érdekében, hogy minél felelősségteljesebben használják az antimikrobiális szereket az állattartásban és a humán gyógyászatban egyaránt, fontos célkitűzés, hogy ezt a témakört minél szélesebb körben megismerje a közvélemény is.

4.0 A vizsgálatok módszerei

4.1 A felhasznált minták és baktérium törzsek

A felhasznált baktérium törzsek a rendelkezésre álló főleg brojler csirke eredetű törzsgyűjteményből választottuk ki. A törzsgyűjtemény recens *E. coli* (93 db), *Salmonella* Infantis (26 db), valamint *Salmonella* Enteritidis (91 db) törzseket tartalmaz, amik csirke vakbél, illetve humán széklet és humán haemokultúra mintákból lettek izolálva. A törzsgyűjteményt a biofilm vizsgálatok során 114 db törzs reprezentálja, melyek AR fenotípus alapján lettek kiválasztva. A 3. Táblázatban összesítve bemutatott *E. coli* és *S. Infantis* törzsek ugyanazon állatok vakbél mintáiból származnak, így ezek úgynevezett „kohabitáns” törzsek. A biofilmhez felhasznált 114 db törzs 20 csirke vakbél mintából származik, ami 69 db *E. coli*, és 21 db *S. Infantis*. törzset jelent. További 24 db *S. Enteritidis* törzs humán széklet, és humán haemokultúra eredetű (3. Táblázat). Az izoláláshoz XLD (Xylulose Deoxychocolate agar) táptalajt alkalmaztunk (Merck KGaA, Németország), majd a kitenyészett baktériumok species szintű meghatározása polimeráz lánreakcióval (PCR, Bio-Rad iCycler, Bio-Rad Laboratories, USA) történt. Az XLD táptalajon az *E. coli* telepek sárga színűek, míg a különböző *Salmonella* szerovarovok fekete színűek.

3. táblázat A biofilm vizsgálatra kiválasztott *E. coli*, *S. Infantis* és *S. Enteritidis* törzsek összefoglalása

Mintatípus	Állat kódja	Kitenyészett törzsek (darab)
Brojler csirke vakbél	VB1	<i>E. coli</i> (6 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB4	<i>E. coli</i> (6 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB9	<i>E. coli</i> (7 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB10	<i>E. coli</i> (4 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB12	<i>E. coli</i> (5 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB15	<i>E. coli</i> (4 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB17	<i>E. coli</i> (1 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB25	<i>E. coli</i> (1 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB33	<i>E. coli</i> (1 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB47	<i>E. coli</i> (5 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB51	<i>E. coli</i> (1 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB54	<i>E. coli</i> (1 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB56	<i>E. coli</i> (7 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB60	<i>E. coli</i> (2 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB62	<i>E. coli</i> (1 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB63	<i>E. coli</i> (2 db), <i>S. Infantis</i> (2 db)
	VB68	<i>E. coli</i> (3 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB69	<i>E. coli</i> (1 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
	VB71	<i>E. coli</i> (7 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)
VB79	<i>E. coli</i> (4 db), <i>S. Infantis</i> (1 db)	
Humán széklet		<i>S. Enteritidis</i> (20 db)
Humán haemokultúra		<i>S. Enteritidis</i> (4 db)

A DNS izoláláshoz a különböző fajoknál ugyanazt az eljárást alkalmaztuk. A tenyésztés során kiválasztott telepek Luria-Bertani (LB; Merck KGaA, Németország) agarra oltottuk, majd 37°C-on inkubáltuk 16-18 órán keresztül. A kitenyésztett telepekből 2-2 telepnyi mennyiséget vettünk fel 1 ml desztillált vízben, a desztillált vizet és törzseket is tartalmazó csöveket 10 percen keresztül melegítettük 100°C-on (AccuBlock™ Digital Dry Bath, Labnet International Inc. USA). Forralás után ezek centrifugálása következett 1000 rpm-en 5 percig. A PCR reakcióhoz a centrifugálás után a felülúszó részből 5 µL mennyiséget mértünk ki, majd alkalmaztuk a reakcióhoz (Dashti et al. 2009).

Az *E. coli* törzsek azonosítása a *lacZ* gén (ami a β-galaktózidáz enzimet kódolja) és az *uidA*, gén (ami a β-glükuronidáz enzim kódolásáért felelős) jelentétének kimutatása alapján történt a következő primerek alkalmazásával: *lacZ* forward primer szekvencia 5'-ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC-3', reverz primer szekvencia 5'- ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC-3', ahol a keletkező amplicon 264 bp hosszúságú. Az *uidA* gén kimutatásához az alábbi primerek alkalmazhatók: forward 5'-AAAACGGCAAGAAAAGCAG-3', a reverz primer szekvencia 5'-ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG-3', a keletkező amplicon 147 bp hosszúságú (Bej et al., 1991). A PCR reakció paraméterei: 95 °C-on 4 percig történik az első denaturáció. A ciklusok harmincszor ismétlődnek (95 °C 30 másodperc a további denaturációk; 62 °C-on 30 másodpercig történik az annealáció, ez a hőmérséklet a primerekhez lett igazítva; 72 °C-on 30 másodperc az extenzió). A szekvenálás céljából a programba szerepel egy végső extenzió, 72 °C-on 7 percig (PCRBIO Taq DNA Polymerase, PCR Biosystems Ltd., UK).

A különböző *Salmonella* szerovárok meghatározására szintén PCR-t használtunk. Kardos és munkatársai alapján a *S. Infantis* törzsek kimutatására *fljB* gén alkalmas. A forward primer szekvenciája: 5'-TTGCTTCAGCAGATGCTAAG-3', míg a reverz primer az alábbi szekvenciával rendelkezik: 5'-CCACCTGCGCCAACGCT-3', a keletkező amplicon pedig 413 bp hosszúságú (Kardos et al., 2007). A PCR beállításai az alábbiak voltak: 95°C-on 3 percig tart az első denaturáció. A ciklusok harmincszor ismétlődnek (95°C-on 30 másodperc a további denaturációk; 56°C-on 30 másodperc az annealáció; míg az extenzió 72°C-on 1 percig tart), szekvenálás céljából itt szerepel egy végső extenziós lépés, ami 72°C-on 1 percig tart (PCRBIO Taq DNA Polymerase, PCR Biosystems Ltd., UK). A *S. Enteritidis* törzsek azonosítása az ezekre a szerovárookra jellemző virulencia plazmid alapján történt. A detektáláshoz a következő forward primert használtuk: 5'-GCCGTACACGAGCTTATAGA-3', míg a reverz primer a

következő volt: 5'-AAAGTGATGCCTTCTGCATC-3', az amplifikált szakaszok 620 bp hosszúságúak (Wood et al.,1994). A PCR beállításai az alábbiak voltak: 95°C-on 3 percig tart az első denaturáció. A ciklusok 30x ismétlődnek (95°C-on 30 másodperc a további denaturációk; 56°C-on 30 másodperc az annealáció; míg az extenzió 72°C-on 30 másodpercig tart), a végső extenziós lépés 72°C-on 1 percig tart (PCRBIO Taq DNA Polymerase, PCR Biosystems Ltd., UK).

4.2 AR fenotípus meghatározás korong diffúzióval

Az AR fenotípus meghatározásra az EUCAST sztenderdizált korong diffúziós módszert alkalmaztuk. Mueller-Hinton agarra (Merck KGaA, Németország) oltottuk a vizsgálandó izolátumokat, 0.5 McFarland turbiditás mellett, ez utóbbi méréséhez egy denzitométert (Biosan DEN-1 McFarland Densitometer, Biosan, Latvia) alkalmaztunk. Kioltást követően antibiotikum korongokat [Ampicillin (AMP-10), Cefotaxim (CTX-5), Ciprofloxacín (CIP-5), Nalidixinsav (NAL-30), Gentamicin (GEN-10), Tobramicin (TOB-10), Tetraciklin (TET-30), Kloramfenikol (CHL-30), Trimetoprim (TMP-5), Szulfonamid vegyületek (szulfonamid vegyület elegy) (S3-300) (Bio-Rad Laboratories, USA)] helyeztünk fel a táptalajokra. Kontrollként az *E. coli* ATCC 25922 törzset használtuk. Az inkubálás 35 ± 1 °C-on történt, 18 ± 2 órán keresztül. Az inkubálást követően a felhelyezett antibiotikumok körüli gátlási zóna átmérője szerint értékeltük az eredményeket az EUCAST ajánlásai alapján (EUCAST standardised disk diffusion method, 2022).

4.3 Teljes genom szekvenálás

Az AR fenotípus alapján a vakbél mintákból 75 db törzset választottunk ki szekvenálásra, *E. coli* és *S. Infantis* törzseket vegyesen. A szekvenálást a Münsteri Egyetemen végezték (University of Münster, Németország), Illumina MiSeq Sequencing platform segítségével, 2x150 bp read hossz mellett, ami egy az új generációs szekvenálási (next generation sequencing, NGS) módszer. Ez négy alapvető szakaszból áll: (1) genomikus DNS (gDNS) izolálás (MagAttract® HMW DNA kit, Qiagen, Germany) (2) gDNS könyvtár készítés, (3) NGS szekvenálás, majd (4) bioinformatikai adatelemzés. A könyvtár készítéshez (Nextera XT DNA Library Preparation kit, Illumina, USA) a gDNS-t feldarabolják, a DNS fragmentumok 5' és 3' végére adaptereket ligálnak, ami biztosítja a szekvencia-specifikus szubsztrát kapcsolódását és a fragmentek azonosítását. Az így elkészült könyvtárak kerültek szekvenálásra Illumina MiSeq platformon (Illumina, 2023). Az utóbbi néhány évtizedben az NGS módszereknek

köszönhetően rövidebb idő alatt sokkal nagyobb számú baktérium izolátum teljes genom szekvenálása (whole genome sequencing, WGS) vált lehetővé.

4.4 ResFinder 4.1 program használata szerzett AR gének azonosítására

A ResFinder egy ingyenesen elérhető program, egy olyan platform, ami szerzett AR gének kimutatását teszi lehetővé. A szerzett AR gének mellett lehetőség van az antibiotikum-rezisztenciát okozó kromozómális pont mutációkat is vizsgálni a program segítségével, de ebben a dolgozatban ez a funkciót nem alkalmaztuk (Bortolia et al., 2020).

A ResFinder programot az alábbi paraméterek beállításával alkalmaztam:

- Chromosomal point mutations: Nem
- Acquired ARGs: Igen
- Threshold for sequence identity: 90%
- Minimum coverage: 80%
- Antimicrobial configuration: alapértelmezett beállítás, ami az alábbi konfigurációt jelenti: aminoglikozidok, béta-laktám típusúak, kolisztin, fertőtlenítőszer, fluorokinolonok, foszfomicin, fuzidinsav, glikopeptidek, MLS (makrolidok, linkozamidok, sztreptograminok), nitroimidazol, oxazolidin, fenikol, pszeudomonsav, rifampicin, szulfonamid, tetraciklin, trimetoprim
- Select species: *Salmonella spp.* vagy *E. coli*
- Type of your reads: assembled genome/contigs

4.5 Biofilm morfortípus és kvantitatív biofilm meghatározás

A morfológiai vizsgálatokhoz 18 órás LB levestenyészetekből 2-2 µL mennyiségeket cseppentettünk ki LB agarra, amihez Kongóvörös ($40 \mu\text{gml}^{-1}$) és Coomassie brilliant kék ($20 \mu\text{gml}^{-1}$) (CR) festékeket adtunk (Malcova et al., 2008). A baktérium tenyészeteket 96 órán keresztül inkubáltuk, 20°C , 28°C és 37°C -on. A kvantitatív biofilm meghatározás során Malcova et al. (2008) alapján először 500x-os hígítást készítettünk a 18 órás levestenyészetekből M9-es tápoldatban. Majd a hígított oldatokból 200 µL mennyiségeket mértünk ki 96 lyukú mikrotiter lemezekbe. Minden vizsgált törzs 2-2 párhuzamos mintaként szerepelt a 96 lyukú mikrotiter lemezeken. Inkubáció előtt megmértük a kiindulási szuszpenziók abszorbanciáját 620 nm -en (Multiskan™ FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific Inc., USA), ezt követően a lemezek inkubálása következett 96 órán keresztül,

20°C, 28°C és 37°C-on. Inkubálást követően Genevoux és munkatársainak módszere alapján (Genevoux et al., 1996) a tenyészetek abszorbanciájának a mérése következett 620 nm-en, a Multiskan™ FC Microplate Photometeren. Mérés után a planktonikus sejteket eltávolítottuk, ehhez a plate-eket megfordítottuk és kiráztuk/kicsapkodtuk azokat a sejteket, amik nem tapadtak le, majd 80°C-on (Labnet AccuPlate Digital Hotplate Stirrer 120V Model # D0420, Labnet International Inc., USA) 30 percen keresztül fixáltuk a tenyészeteket. Fixálás után 220 µl kristályibolya oldattal (0.1%) 1 percig festettük a vizsgált baktériumokat. A festéket rázó mozdulatokkal eltávolítottuk, papírtörölkőre csapkodtuk, desztillált víz segítségével a felesleges kristályibolyát lemostuk, majd mosás után addig csapkodtuk, amíg csepp mentes nem lett, majd 37°C-on 30 percen keresztül szárítottuk a lemezeket. A szárítás után, a színtelenítés során 220 µl etanol/aceton, 80:20% keverékét pipettáztuk a fixált lemezekre, majd szobahőmérsékleten negyedórát vártunk, hogy a festék be tudjon oldódni a keverékbe. A kioldott festék abszorbanciáját 560 nm-en mértük le Multiskan™ FC Microplate Photometerrel (Genevoux et al., 1996).

4.6 Statisztikai számítások

A kvantitatív biofilm adatok elemzéséhez az *R Commander* programot alkalmaztuk (Fox 2005), ez egy ingyenes használható statisztikai szoftver. A kiértékeléshez párosított t próbákat alkalmaztunk, hogy összehasonlítsuk az *E. coli*, *S. Infantis* és *S. Enteritidis* azonos hőmérsékleteken mért abszorbancia értékeit, valamint a különböző fajok és szerovárok különböző hőmérsékleteken mért abszorbanciáikat. A kapott p értékek alapján megállapítható, hogy a kapott értékek szignifikánsan különböznek vagy nem ($p=0.05$)

5.0 Eredmények és értékelésük

5.1. Antibiotikum rezisztencia fenotípusok fajok és szerovárok közötti megoszlása

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok alapján a kohabitáns *E. coli* és *S. Infantis* törzsek változatosabb AR fenotípussal rendelkeztek, mint a *S. Enteritidis* törzsek (4. táblázat). Ez utóbbiakra az antibiotikum rezisztencia nem volt jellemző, az izolátumok mindössze 2.2% (2/91) és 12.09%-ában (11/91) mutattunk ki ampicillin illetve nalidixinsav rezisztenciát, egyetlen törzs esetében sem tudtunk kimutatni multirezisztenciát a *S. Enteritidis* szerovárok között. Tehát többségük a vizsgált antibiotikumokra érzékeny volt.

4. táblázat Antibiotikum rezisztencia fenotípusok faj szerinti megoszlása. Az antibiotikumok rövidítései az alábbiak: ampicillin (AMP), cefotaxim (CTX), nalidixinsav (NAL), ciprofloxacín (CIP), gentamicin (GEN), tobramicin (TOB), tetraciklin (TET), kloramfenikol (CHL), trimetropin (TRI), szulfonamid vegyületek (SUL), míg az MDR: multidrog rezisztencia

Antibiotikum	<i>E. coli</i> (%)	<i>S. Enteritidis</i> (%)	<i>S. Infantis</i> (%)
AMP	60,22	2,20	19,23
CHL	12,90	0,00	0,00
CIP	55,91	0,00	19,23
CTX	5,38	0,00	0,00
GEN	9,68	0,00	0,00
NAL	21,51	12,09	80,77
SUL	38,71	0,00	73,08
TET	47,31	0,00	76,92
TMP	27,96	0,00	0,00
TOB	5,38	0,00	0,00
MDR	49,46	0,00	26,92

A leggyakoribb *Salmonella* szerovár amit európai humán mintákból izoláltak a *S. Enteritidis* volt. Ezekre az izolátumokra jellemző legkevésbé a MDR fenotípus a többi *Salmonella* szerovárhoz képest. Azonban az európai uniós adatokkal szemben, az általunk vizsgált *S. Enteritidis* törzsekre nem volt jellemző a ciprofloxacín rezisztencia, ami jellemző más európai uniós országokban (EFSA&ECDC 2023). Az AR fenotípus eltérés a hazai és európai uniós adatok között az országonként eltérő mértékű antibiotikum felhasználásból is adódhat.

A legváltozatosabb rezisztencia mintázatokat az *E. coli* törzsek mutatták (5. táblázat). Mind ezeknél, mind pedig a *S. Infantis* törzseknél találtunk MDR izolátumokat. A vizsgált izolátumok között két olyan *E. coli* (VB56 és VB63) törzs volt, ami 7 antibiotikumra is rezisztens volt, mind kettő az alábbi fenotípussal rendelkezett AMP-CIP-GEN-SUL-TET-TRI-TOB. A velük társultan élő 3 darab *Salmonella* *Infantis* törzs közül csak egy nem mutatott MDR

tulajdonságokat. A vizsgált antibiotikumok közül a legtöbb *E. coli* törzs a cefotaximra volt érzékeny, míg a leggyakrabban az ampicillinre (56/93, 60.22%) voltak rezisztensek, ezt követte a ciprofloxacín (52/93, 55.91%), majd a tetraciklin (46/93, 47.31%) rezisztencia. A kohabitáns *S. Infantis* mintákra jellemző a nalidixinsav-szulfonamidok (SUL)-tetraciklin (TET) rezisztencia volt a legjellemzőbb. A vizsgált *S. Infantis* törzsek nagyobb része mutatott rezisztenciát nalidixinsavra (21/26, 80.77%), ezt követte tetraciklinekkel szembeni rezisztencia (20/26, 76.92%) majd a szulfonamid vegyületekkel szembeni rezisztencia (16/26, 76%). Az említett antibiotikumok mellett a vizsgált antibiotikumok közül ampicillin és ciprofloxacín rezisztenciát lehetett még megfigyelni.

5. táblázat Kohabitáns *E. coli* és *S. Infantis* törzsekre jellemző AR fenotípusok mintákon belüli gyakorisága (*Gyakorisági index: a rezisztens izolátumok száma és a hozzájuk tartozó mintaszám aránya).

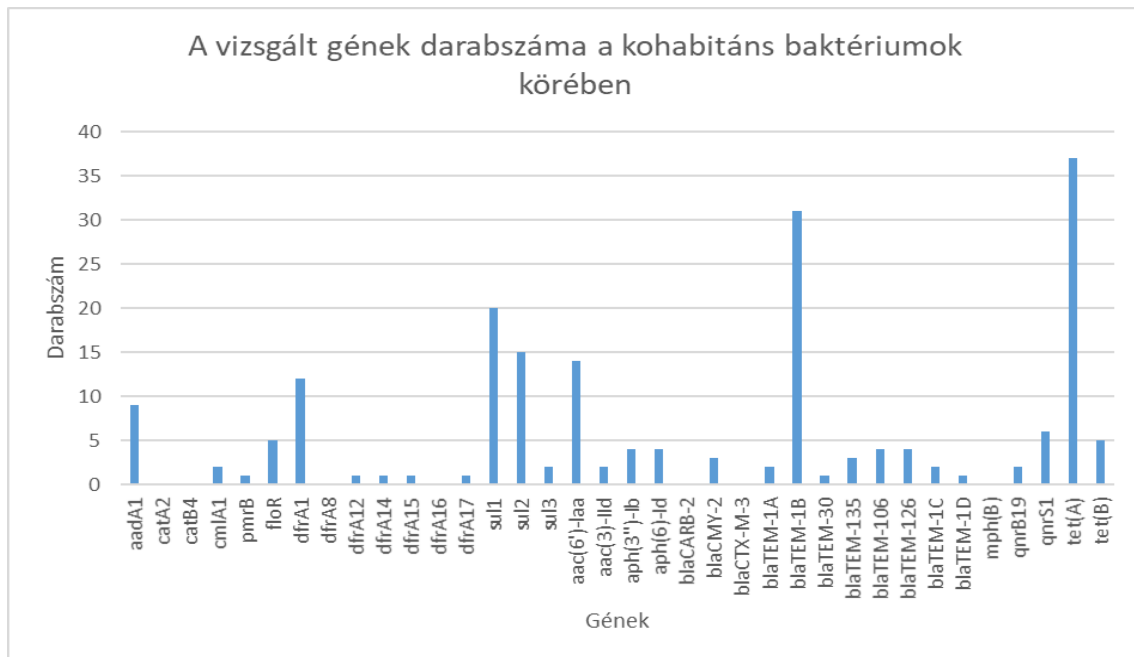
Antibiotikum	E. coli		S. Infantis		Gyakorisági index*	
	Izolátum (n)	Minta (n)	Izolátum (n)	Minta (n)	E. coli	S. Infantis
AMP	56	18	5	5	3,11	1,00
CHL	12	8	0	0	1,50	-
CIP	52	22	5	5	2,36	1,00
CTX	5	4	0	0	1,25	-
GEN	9	5	0	0	1,80	-
NAL	20	14	21	21	1,43	1,00
SUL	36	16	19	18	2,25	1,06
TET	44	18	20	19	2,44	1,05
TMP	26	13	0	0	2,00	-
TOB	5	5	0	0	1,00	-

A kapott adatok jó egyezést mutatnak a legfrissebb EFSA által kiadott jelentéssel „Az emberekből, állatokból és élelmiszerekből származó zoonózis- és indikátorbaktériumok antimikrobiális rezisztenciájáról 2020/2021-ben” (EFSA & ECDC 2023). A *S. Infantis* izolátumokról általánosságban elmondható, hogy az Európai Unió területén az egyik leggyakrabban kimutatott zoonózis kórokozó, amelyben előfordulhat MDR fenotípus (EFSA & ECDC 2023). Ezt támasztja alá az általunk megvizsgált 20 db brojler csirke vakbél minta eredménye is, amelyek (16/21 db) 76.19% mutatott rezisztenciát olyan antibiotikumokra, amik legalább három különböző antibiotikum-osztályba tartoznak. Az elmúlt 20 év távlatában Magyarországon a brojler állományokból izolált *S. Infantis* törzsek leggyakoribb MDR fenotípusa a NAL-SUL-TET (Nógrády et al., 2012; Szmolka et al., 2021). A vizsgálatban szereplők között is ez a típusú NAL-SUL-TET multirezisztencia jelent meg a leggyakrabban.

Európai viszonylatban baromfiban leggyakrabban olyan MDR *E. coli* izolátumok fordulnak elő, amik jellemzően az alábbi antibiotikumokra rezisztensek: tetraciklin, ampicillin, szulfometaxazol, trimetoprim, és/vagy kinolonok (EFSA&ECDC 2023). Brojler csirke mintáknál gyakran azonosítható a rezisztencia ciprofloxacinnal és a különböző szulfonamid vegyületekre, és az általunk vizsgált törzseknél is megfigyelhető, hogy erre a két antibiotikumra nagy fokú rezisztenciát mutatnak. Az Európai Unió országai között jelentős eltérések vannak abban, hogy a brojler eredetű *E. coli* törzsek milyen arányban rendelkeztek multirezisztenciával (ami 2.4% és 85.2% között változott). A vizsgálatban szereplő törzsek közül az *E. coli* izolátumok 49.46%-a (46/93), míg a *S. Infantis* izolátumok 26.92%-a (7/26) mutatott MDR tulajdonságokat (EFSA&ECDC 2023).

5.2 Mobilis antibiotikum rezisztencia gének WGS-alapú *in silico* analízise

A fenotípus eredményekkel összhangban a genom szekvenált kohabitáns törzsek körében nagyfokú változatosságot lehetett megfigyelni a szerzett AR génekre vonatkozóan. A vizsgált törzseknél a két leggyakoribb gén a *bla_{TEM-1b}* és a *tet(A)* gének voltak (6. ábra). A *bla_{TEM-1b}* gén egy β -laktamáz enzimet termel, ami a szubsztrátként szolgáló β -laktám antibiotikumokat, mint az ampicillint hasítja. A *tet(A)* gén tetraciklin antibiotikumok ellen okoz rezisztenciát. A *tet(A)* gének olyan efflux pumpákat kódolnak, melyek eltávolítják a tetraciklint a citoplazmából. A különböző szulfonamid vegyületekkel szembeni rezisztencia kialakításáért elsősorban három gén lehet felelős, és vizsgálataink során mindhárom gén jelenlétét ki tudtuk mutatni: *sul1*, *sul2* és *sul3*. Egy olyan *E. coli* (VB56/Ec5) törzset is azonosítottunk, amely a *sul1* és *sul2* géneket egyszerre hordozta. A szulfonamid vegyületek a folát szintézist gátolják a baktériumokban, a dihidropteorát szintáz kompetitív gátlása által. Az e vegyületek elleni rezisztencia gének integronokon (*sul1*) vagy plazmidokon (*sul2*) kódoltak. A szulfonamid vegyületek nem tudnak kötni a *sul* gének által termelt dihidropteorát-szintáz enzimekhez, így az alkalmazott szulfonamid antibiotikummal szemben rezisztencia alakul ki (Kapoor et al., 2017).



6. ábra A vizsgált gének összesített darabszáma a vizsgált kohabitáns *E. coli* és *Salmonella* izolátumok körében

A kohabitáns törzsek körében több esetben is megfigyelhető volt, hogy a vizsgált baktériumok azonos rezisztencia géneket hordoztak (7. táblázat). Ez a jelenség megfigyelhető a társult *E. coli* törzsek valamint a velük együtt élő *S. Infantis* baktériumok viszonylatában is (8. táblázat). Azoknál *S. Infantis* törzseknél amelyek NAL-SUL-TET fenotípusos rezisztenciával rendelkeztek, megfigyelhető volt, hogy az ezen antibiotikumok ellen hatásos szerzett AR géneket hordozták: *sul1*, valamint a *tet(A)* géneket. Az ugyanazon vakbél mintából származó *S. Infantis* izolátumok ugyanazokat a rezisztencia géneket hordozták, ilyen gének voltak a *sul1*, *tet(A)*, valamint az *aac(6')-Iaa* gének. Az *S. Infantis* törzsekkel társultan élő *E. coli* törzsek változatosabb rezisztencia génekkel rendelkeztek, mint a *Salmonella*-k, hasonlóan a fenotípusos rezisztencia eredményekhez. Ezen *E. coli* izolátumoknál a leggyakoribb gén, ami a kohabitáns *Salmonella* szerovárnál is megfigyelhető a *tet(A)* gén volt, ezen a génen kívül a *sul1* gén volt olyan, ami egyezett a *Salmonella* izolátumokkal. Ezen kívül megfigyelhető volt a társult *E. coli* izolátumok körében, hogy a szintén társultan előforduló *E. coli* izolátumok ugyanazokat a szerzett AR géneket hordozták. Azonosítottunk egy olyan *E. coli* törzset is, ami a VB56 jelű vakbél mintából származott (VB56/Ec5), ami egyszerre két szulfonamid rezisztencia gént is hordozott: a *sul1* és *sul2* géneket.

Az egyik leggyakrabban előforduló rezisztencia gén az *E. coli* izolátumokban a *bla_{TEM-1}* gén volt, ami az ampicillin rezisztencia kialakításáért lehet felelős. Egy további β -laktamáz

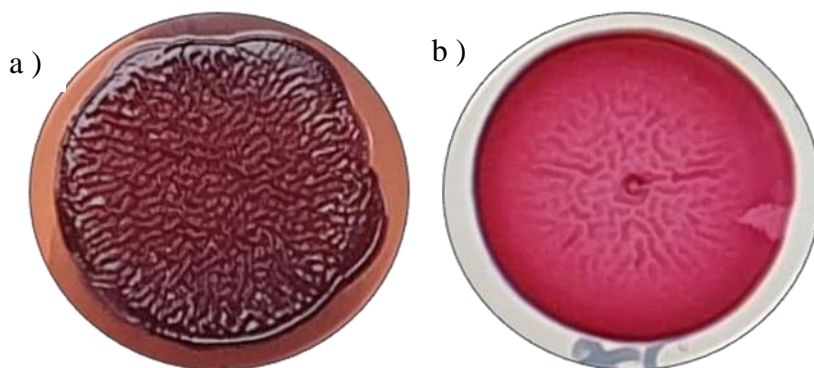
típusú rezisztencia gén ami szakirodalmi adatok alapján egyre több Gram-negatív baktériumban kimutatható a *bla*_{CTX-M}, ami egy széles-spektrumú β -laktamáz (ESBL) enzimet kódol (Poirel et al., 2017). Azonban az általunk vizsgált izolátumok egyike sem hordozta a *bla*_{CTX-M} gént. E munka során 9 esetben tudtunk *tet* rezisztencia gént kimutatni a vizsgált *E. coli* és *Salmonella* izolátumok körében. Az állati eredetű *E. coli* izolátumok körében irodalmi adatok szerint a leggyakrabban a *tet(A)* és *tet(B)* géneket lehet kimutatni (Poirel et al., 2017), és ezt támasztják alá az általunk vizsgált izolátumok is, melyekben e két géntípus jelenléte volt a leggyakoribb.

7. táblázat Rezisztencia gének együttes előfordulása a kohabitáns *S. Infantis* és *E. coli* törzsekkörében

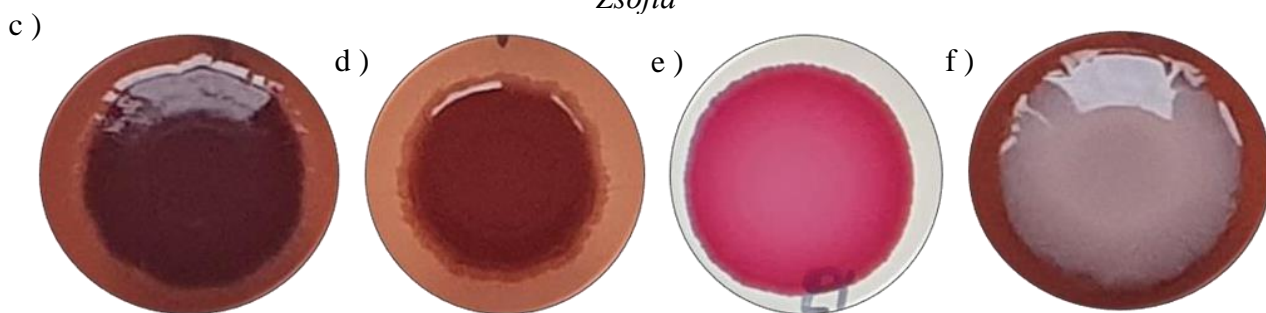
Szerzett rezisztencia gén	Előfordulás az összes kohabitáns baktérium körében	Százalékos arány
<i>aadA1</i>	2	10,0%
<i>dfrA1</i>	3	15,0%
<i>sul1</i>	6	30,0%
<i>sul2</i>	5	25,0%
<i>aac(6')-Iaa</i>	1	5,0%
<i>aac(3)-IIId</i>	1	5,0%
<i>aac(3)-VIa</i>	1	5,0%
<i>aph(3'')-Ib</i>	1	5,0%
<i>aph(6)-Id</i>	1	5,0%
<i>bla</i> _{CMY-2}	1	5,0%
<i>bla</i> _{TEM-1B}	8	40,0%
<i>bla</i> _{TEM-135}	1	5,0%
<i>qnrS1</i>	1	5,0%
<i>tet(A)</i>	10	50,0%

A magyarországi *S. Infantis* izolátumokra jellemző a NAL-SUL-TET rezisztencia. Az ilyen fentotípussal rendelkező baktériumok esetében gyakori a *tet(A)* gén jelenléte (Nógrády et al., 2007). Az általunk vizsgált *S. Infantis* izolátumok között kivétel nélkül ez a gén kapcsolódott a TET rezisztenciához. Az említett NAL-SUL-TET fenotípus kialakításában szerepe van szerzett szulfonamid rezisztencia géneknek is. A magyarországi

a fent említett morfortípusok mindegyike megjelent a táptalajon. A változatosság mellett elmondható, hogy az *E. coli* baktériumok között 28°C-on a törzsek nagyobb része rendelkezett rdar morfortípussal (59/114, 51%). A 20 db vakbél minta *E. coli* és *S. Infantis* izolátumai között mindössze kettő volt olyan, aminél egyik törzs sem mutatta a rough felszínt, ezeknél ezen a hőmérsékleten smooth felszínt lehetett megfigyelni, amiknek barna színe volt (bas).

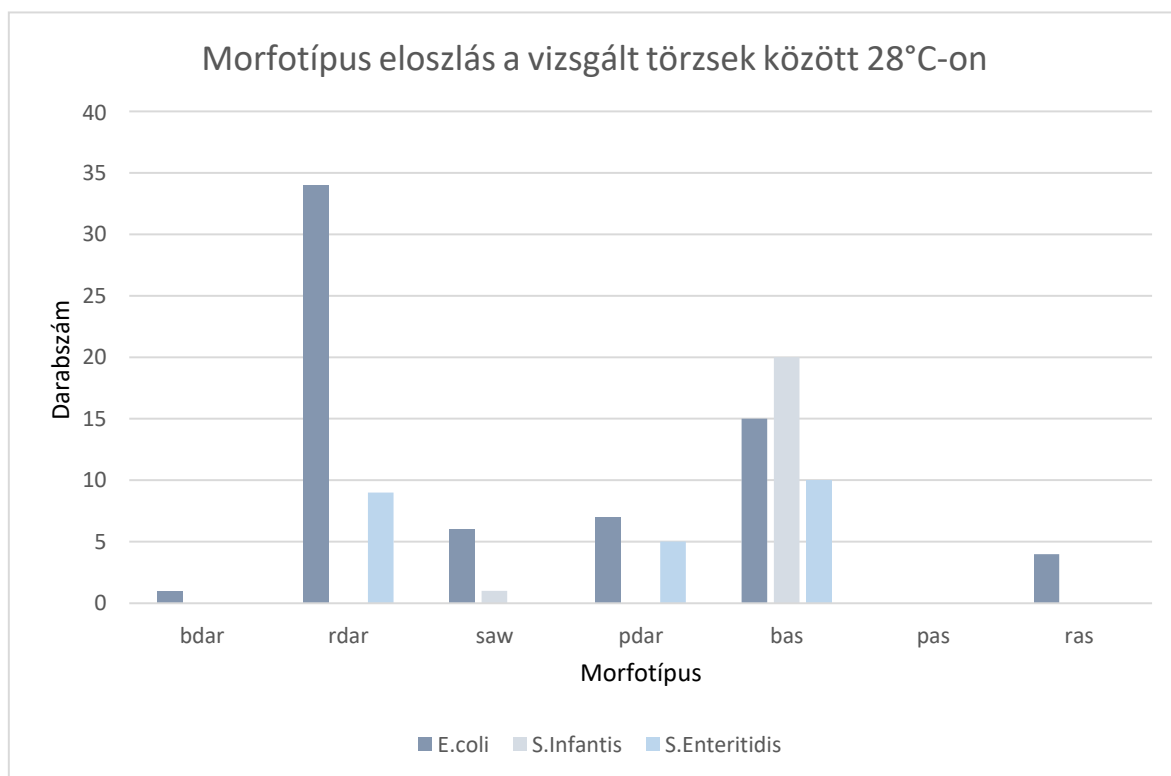


9. ábra *E. coli* és *Salmonella* morfortípusok Kongóvörös agaron, rdar (a) és pdar (b); Fodor Zsófia



10. ábra *E. coli* és *Salmonella* morfortípusok Kongóvörös agaron ras (c), bas (d), pas (e), saw (f); Fodor Zsófia

A vizsgált baktériumok közül a második legváltozatosabb csoportot 28°C-on a *S. Enteritidis* törzsek alkották. A *S. Enteritidis* izolátumoknál három különböző morfológiát lehetett megkülönböztetni: bas (10/24, 41.67%), rdar (9/24, 37.5%), pdar (5/24, 20.83%). A *S. Enteritidis* izolátumok nagyobb részére volt jellemző a rough felszín, hasonlóan az *E. coli* törzsekhez. 28°C-on a kohabitáns *S. Infantis* törzsek között nem volt egy izolátumnál sem megfigyelhető rough felszín ezen a hőmérsékleten, hanem egységesen smooth felszínt lehetett megfigyelni. A smooth felszínhez, a *S. Infantis* izolátumoknál, kétféle szín társult ezek pedig a barna, valamint a fehér színek voltak, előbbi a bas-, míg utóbbi a saw morfortípust alakítja ki.

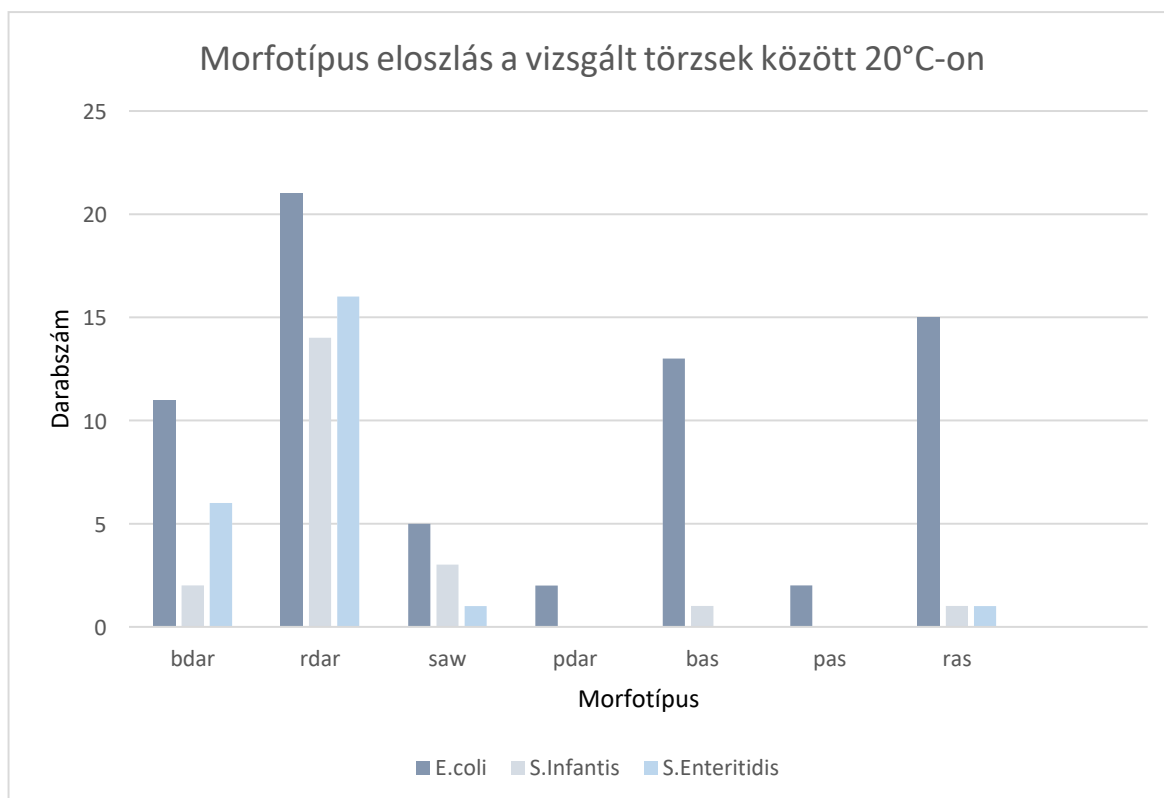


11. ábra Morfotípus eloszlás a három vizsgált faj és szerovár körében 28°C-on

A 37°C-on képzett biofilm morfológusokról elmondható, hogy méretük jelentősen elmaradt mind a 20°C-on, mind pedig a 28°C-on képződött telepek nagyságától, ezen felül a három a faj és szerovár között egy törzsnél sem volt megfigyelhető olyan, ami rough felszínnel rendelkezett. A smooth felszínhez barna szín társult, a különböző izolátumoknál nem lehetett eltéréseket tapasztalni. Ezen a hőmérsékleten többek között azért is fordulhat elő, hogy morfológus eltéréseket csak kis mértékben lehet tapasztalni, és mindegyik smooth felszínnel rendelkezik, mert a vizsgált baktériumok optimális hőmérséklete a 37°C, így nem szükséges a számukra, hogy biofilmet képezzenek. Az általunk kapott eredményekhez hasonlóan a különböző *Salmonella* szerovárak egységes kinézetet vesznek fel a 37°C-os hőmérsékleteken. Pande és munkatársai több szerovárt hasonlítottak össze, és az általunk kapott a morfológusokhoz hasonlóan az összes vizsgált szerovár smooth felszínnel rendelkezett. Ezek a szerovárak mindegyike saw morfológust mutatott, míg az általunk kicseppentett *Salmonella* törzsek kivétel nélkül bas morfológust hozták létre a CR agaron (Pande et al., 2016).

A vizsgált hőmérsékletek közül 20°C-on lehetett a legtöbb morfológust megfigyelni (12. ábra), ahol a 28°C fokhoz hasonlóan szintén az *E. coli* izolátumok hozták létre a legváltozatosabb morfológusokat. 20°C-on meg lehetett különböztetni bdar, rdar, pdar, saw, bas, pas, ras típusú telepeket a táptalajon. Elmondható, hogy az *E. coli* izolátumoknál a 28°C-hoz

hasonlóan a legtöbb baktérium rdar (21/69, 30.43%) morfortípussal rendelkezett, a második leggyakoribb a ras (15/69, 21.73%) volt, így megállapítható, hogy a vizsgált *E. coli* morfortípusok között a piros szín dominált. Avila-Novoa és munkatársai *Salmonella* biofilm vizsgálatait azt mutatják, hogy a különböző hőmérsékleteken a szerovárok többféle morfortípust is ki tudnak alakítani (Avila-Novoa et al., 2021). Vizsgálataikhoz hasonlóan mi is azt tapasztaltuk, hogy a *S. Infantis* törzsek az alacsonyabb vizsgált hőmérsékleten (20°C) inkább az rdar morfortípust preferálják.



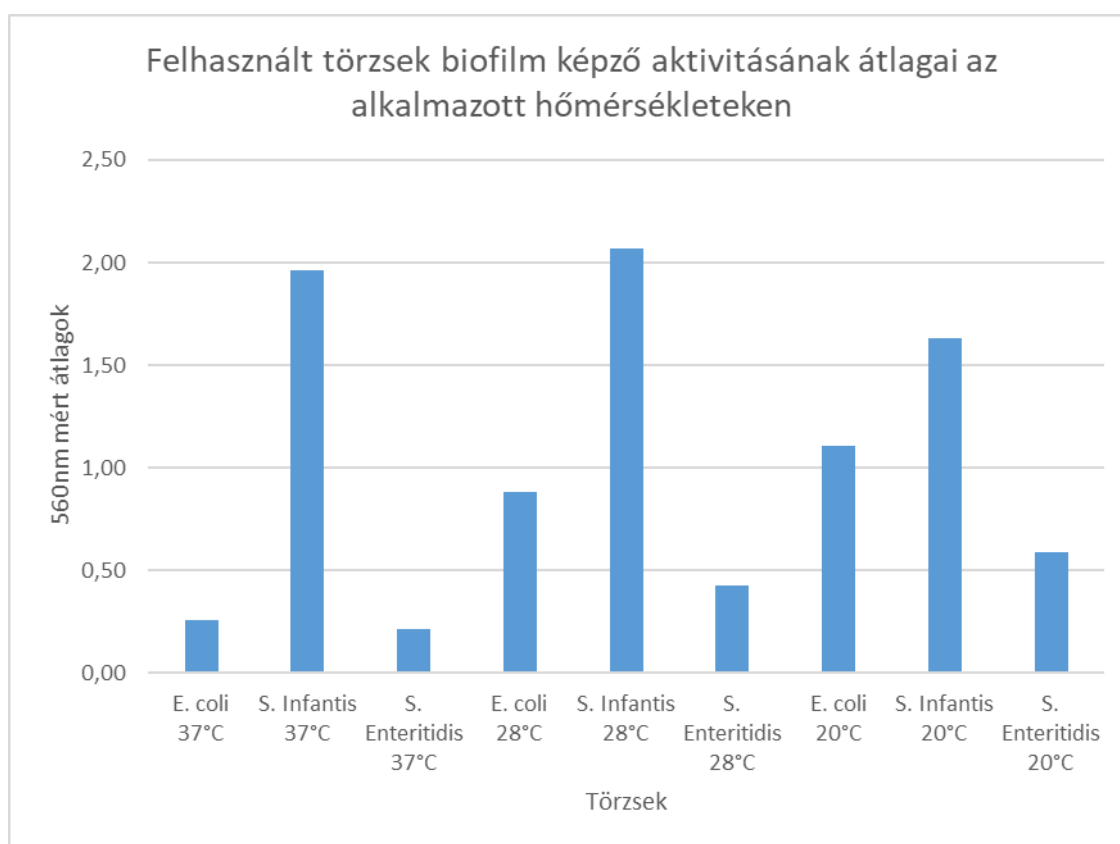
12. ábra Morfortípus eloszlás a három vizsgált faj és szerovár körében 20°C-on

A vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy annak ellenére, hogy a legváltozatosabb morfológiai adatokat az *E. coli* törzseknél lehetett megfigyelni a leggyakoribb morfortípus az rdar volt. Ezzel egyező eredményeket kaptak Nesse és munkatársai (2020), akik szintén azt tapasztalták, hogy a változatos *E. coli* morfortípusok között a leggyakrabban ezt a morfológia fordult elő (Nesse et al., 2020).

5.4 *Salmonella* és kohabitáns *E. coli* törzsek biofilm aktivitása

A kvantitatív analízis során elmondható, hogy a törzsek számára a biofilm képzéshez a legoptimálisabb hőmérséklet fajfüggő volt, a legmagasabb biofilm képző aktivitást mindhárom vizsgált hőmérsékleten a *S. Infantis* törzsek esetében figyelhattunk meg. Ezeknek a törzseknek a legoptimálisabb hőmérséklet a 28°C volt, mind a 20°C, mind pedig a 37°C-on mért

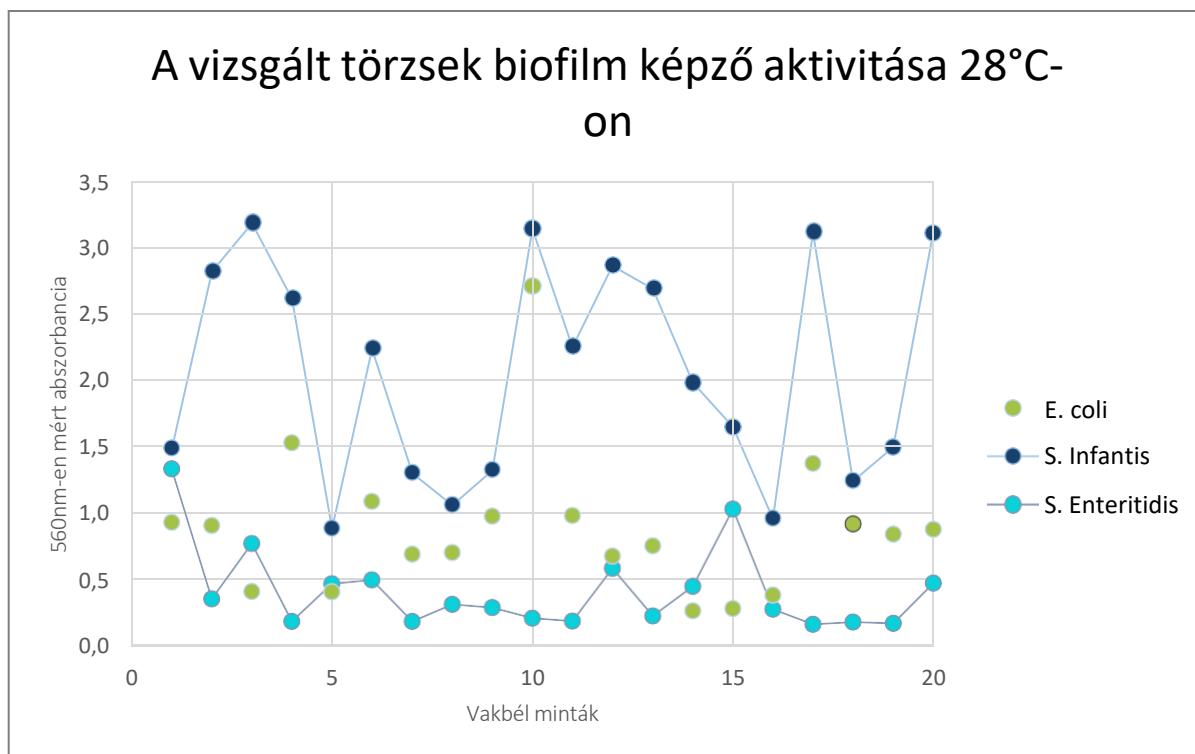
eredmények azt mutatják, hogy ez utóbbi két hőmérsékleten alacsonyabb átlagos biofilm képző aktivitással rendelkeztek a mért abszorbancia alapján ezek a törzsek ($p_{SI20-28}=0.0637$, $p_{SI20-37}=0.0052$ $p_{SI28-37}=0.638$). Az *E. coli* törzsek nagyon változatos értékekkel rendelkeztek a vizsgált hőmérsékleteken. Ezeknek a törzsek a legnagyobb biofilm aktivitása a 20°C volt, a vizsgált hőmérsékleteken mutatott átlagos biofilm aktivitások között szignifikáns eltéréseket a 20 és 37°C-os, illetve a 28 és 37°C-os összehasonlításban lehetett tapasztalni ($p_{Ec20-28}=0.2063$, $p_{Ec20-37}=0.00006$, $p_{Ec28-37}=0.00003$). A másik *Salmonella* szerovár, a *S. Enteritidis* a biofilm képző tulajdonságai mind a három vizsgált hőmérsékleten elmaradtak a másik két baktérium értékeitől. A *S. Enteritidis* törzsek optimális hőmérséklete a biofilm képzéshez a 20°C volt, hasonlóan az *E. coli* törzsekhez (13. ábra).



13. ábra Felhasznált törzsek biofilm képző aktivitásának átlagai az alkalmazott hőmérsékleteken

A három vizsgált faj, illetve szerovár között 28°C-on a legnagyobb átlagos biofilm képző aktivitással a *S. Infantis* izolátumok rendelkeztek ($p_{Ec-SI}=0.011$, illetve $p_{SI-SE}<0.01$), míg a legkisebbel a másik *Salmonella* szerovár, a *S. Enteritidis* rendelkezett. Általánosságban ezen a hőmérsékleten az *E. coli* törzsek a két másik baktérium értékei között helyezkedtek el, és csak egy-két kiugró értéket lehetett tapasztalni a biofilm képzéssel kapcsolatban (14. ábra). A biofilm

képzésről összességében el lehet mondani, hogy fajtól/szerovártól függetlenül, azok a törzsek mutattak nagyobb aktivitást, amelyek smooth felszínnel rendelkeztek.



14. ábra A három vizsgált faj/szerovár törzseinek biofilm képző aktivitása 28°C-on

A legalacsonyabb átlagos biofilm aktivitási értékeket, az *S. Infantis* kivételével, 37°C-on lehetett mérni. Az ezen a hőmérsékleten kapott értékek az *E. coli* és *S. Enteritidis* törzsek körében is elmaradtak a másik két hőmérsékleten mért értékektől. Az *E. coli* és *S. Enteritidis* törzsek hasonló aktivitással rendelkeztek 37°C-on. A vizsgált *S. Infantis* törzsek a másik két fajba tartozó törzsekhez képest ezen a hőmérsékleten is magasabb biofilm képző aktivitást mutattak.

20°C-on a három vizsgált baktérium közül a legalacsonyabb aktivitással a 28°C-on, 37°C-on mért adatokhoz hasonlóan szintén a *S. Enteritidis* törzsek rendelkeztek. A második legmagasabb aktivitás 20°C-on az *E. coli* törzsek esetén volt megfigyelhető. Az *E. coli* a törzsek ezen a hőmérsékleten mutatták a legmagasabb biofilm képző aktivitást. A legmagasabb abszorbancia értékeket 20°C-on is a *S. Infantis* izolátumoknál lehetett megfigyelni. Ezek a törzsek közel háromszor (2.75×) akkora biofilm aktivitást mutattak, mint a *S. Enteritidis* törzsek, míg az *E. coli* törzsek a *S. Infantis*hoz képest közel másfélszer (1.47×) alacsonyabb átlagos aktivitással rendelkeztek e vizsgálatok során.

Schonewille és munkatársai 2012-ben publikált tanulmányukban több jelentős *Salmonella* szerovár (köztük az Enteritidis és Infantis) biofilm képző tulajdonságait hasonlították össze. Vizsgálataik során a *S. Infantis* törzsek rendelkeztek a leggyengébb biofilm képző tulajdonságokkal, és nem *S. Enteritidis* izolátumok. Az általuk vizsgált törzsek között számos magyarországi *S. Infantis* is megtalálható, amik alig mutattak biofilm aktivitást, és 37°C-on alkották a leggyengébb biofilmeket (Schonewille et al., 2012). Schoenwille és munkatársai által közölt adatokkal ellentétben a vizsgált hőmérsékleteken nem 37°C-on alkották a leggyengébb biofilmeket a *S. Infantis* törzsek, ha nem 20°C-on. A kapott eltérések egyik oka lehet az eltérő inkubációs körülmények alkalmazása, 96 óra helyett 48 órán keresztül történt az inkubálás. A másik ok, amiért eltéréseket lehet tapasztalni, az az lehet, hogy környezeti mintákat (tojáshéj felszínéről), valamint vakcina törzseket hasonlítottak össze, brojler csirke eredetű mintákkal. Avila-Novoa és munkatársai vizsgálatai során azt mutatták ki, hogy a biofilm képző tulajdonság a szerovártól és a különböző inkubációs körülményektől függ (Avila-Novoa et al., 2021). Az általunk kapott adatok is arra mutatnak rá, hogy az inkubációs idő és hőmérséklet, valamint a vizsgált szerovár nagyban befolyásolja azt, hogy a törzsek, milyen típusú és mértékű biofilm-képző tulajdonságokkal rendelkeznek. Marin és munkatársai (2009) több *Salmonella* szerovár összehasonlítása során azt mutatták ki, hogy az általuk vizsgált összehasonlításban, a *S. Infantis* törzsek erősebb biofilmet tudtak képezni, mint a *S. Enteritidis* törzsek, az ő eredményeikhez hasonlóan, mi is azt tapasztaltuk, hogy utóbbi gyengébb biofilmeket tud létrehozni (Marin et al., 2009).

5.5 Az antibiotikum rezisztencia és biofilm kapcsolata

A kvantitatív adatok azt mutatták, hogy a *S. Infantis* törzsek attól függetlenül magasabb átlagos biofilm képző aktivitással rendelkeztek, hogy milyen morfortípusba tartoztak. Ezek az izolátumok 20°C-on főleg rough feleszint vettek fel, míg 28°C-on kivétel nélkül smooth felszínnel rendelkeztek. A velük társultan élő *E. coli* törzsek ezen a két hőmérsékleten változatos biofilm morfortípusokat alakítottak ki, ugyanúgy, mint a *S. Enteritidis* törzsek. A vizsgált törzsek 37°C-os hőmérsékleten kivétel nélkül bas típusú morfológiát mutattak, függetlenül attól, hogy milyen és mennyi szerzett AR gént hordoztak.

A kvantitatív biofilm képzéssel kapcsolatos adatok alapján a vizsgált törzsek között a legalacsonyabb átlagos abszorbancia értékek az *S. Enteritidis* izolátumok körében voltak megfigyelhetők. E baktériumok egyike sem volt multirezisztens. Az összes vizsgált hőmérsékleten a *S. Infantis* törzsek rendelkeztek a legmagasabb átlagos abszorbancia értékekkel. Annak ellenére, hogy a másik *Salmonella* szerovár, az *S. Enteritidis* izolátumok

körében nem azonosítottunk MDR fenotípust, de az *E. coli* törzsek nagy részénél igen, magasabb átlagos biofilm-képző potenciált az *E. coli* törzsek esetében csak 20°C és 28°C-os hőmérsékleten tapasztaltunk az *S. Enteritidis*-szel összevetve ($p_{Ec-SE20}=0.049$, illetve $p_{Ec-SE28}=0.008$). A legtöbb (46 db, 49.46%) MDR törzs az *E. coli* izolátumok között fordult elő, ezt követte az MDR *S. Infantis* törzsek aránya (7 db, 26.92%). A leggyakoribb MDR fenotípus a *S. Infantis* izolátumok körében a NAL-SUL-TET rezisztencia profil volt, de azon *S. Infantis* törzsek is magasabb átlagos biofilm aktivitást mutattak *E. coli*-nál és *S. Enteritidis*-nél a három vizsgált hőmérsékleten, amik nem mutattak multidrog-rezisztenciát.

6.0 Következtetések és javaslatok

A kapott AR fenotípusos mintázatok azt mutatják, hogy a hazai eredetű *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Enteritidis, valamint *E. coli* izolátumok jelentős aránya rendelkezik antibiotikum-rezisztenciával legalább egy (vagy több) antibiotikummal szemben. Ezt támasztják alá a WGS szekvenálási eredmények által azonosított szerzett AR gének is. Az állattartásban évtizedek óta alkalmaznak fertőző betegségek megelőzése vagy kezelése céljából szulfonamid vegyületeket, valamint tetraciklin és ampicillin hatóanyagot tartalmazó készítményeket, ami hozzájárulhatott az antibiotikum-rezisztens *S. Infantis* és *E. coli* törzsek megjelenéséhez a hazai brojler állományokban.

A vizsgált *E. coli* és *S. Infantis* és *S. Enteritidis* izolátumok eltérő biofilm képző tulajdonságokat mutattak az e munka során alkalmazott vizsgálati körülmények mellett, ahol a legalacsonyabb átlagos biofilm képző aktivitást az *S. Enteritidis* izolátumok körében tapasztaltuk. Az *S. Enteritidis* törzsek érzékenyek voltak a legtöbb *in vitro* tesztelt antibiotikummal szemben, azonban azok az *E. coli* törzsek is magasabb átlagos biofilm képző aktivitással rendelkeztek az *S. Enteritidis* törzseknél, amik semmilyen fenotípusos rezisztenciát nem mutattak. A *S. Infantis* törzsek körében tapasztaltuk a legmagasabb átlagos biofilm-képző potenciált. A biofilm képzés erőssége tehát eredményeink alapján elsősorban a vizsgált hőmérséklettől, valamint a baktérium fajtól vagy szerovártól függhet, és nem pedig attól, hogy az adott baktériumok milyen rezisztencia génekkel, vagy AR fenotípussal rendelkeznek.

Magyarországon a 2000-es évek elején a *Salmonella*-k körében szerovár váltás történt, az addig domináns *S. Enteritidis*-t felváltotta a *S. Infantis* a brojler csirke állományokban. Feltételezésünk szerint az elterjedés sikerének egyik oka lehet a megnövekedett biofilm aktivitással járó adaptációs előny, amivel a *S. Infantis* törzsek jellemezhetők a *S. Enteritidis* törzsekkel szemben. A kapott adatok alapján, a *S. Infantis* törzsek nagyobb biofilm képző aktivitással rendelkeznek, mind a három vizsgált hőmérsékleten (20°C, 28°C és 37°C), mint a *S. Enteritidis* törzsek. A biofilm képzés segítségével a *S. Infantis* törzsek könnyebben meg tudnak tapadni a felületeken és képesek perzisztálni, míg a *S. Enteritidis* törzsekre ez a képesség nem jellemző, így hátrányba kerülnek.

Az antibiotikum használat következtében napjainkban világszerte számos területen az AR terjedése tapasztalható. Nemzeti és nemzetközi monitorozási programok segíthetnek felmérni és megismerni a humán- és állategészségügyi jelentőséggel bíró baktériumok antibiotikum rezisztenciáját és az azokért felelős szerzett AR géneket. Az e dolgozatban vizsgált kohabitáns izolátumok körében a genom szekvenálási adatok további, egy későbbi fázisban tervezett

részletesebb elemzése arra is választ adhat, hogy ezek a baktériumok egymástól (is) vettek-e át szerzett AR géneket, ami által pontosabb képet kaphatunk a biofilmekben társultan élő baktériumok komplex kapcsolatairól.

További vizsgálatokkal pontosabb képet lehetne kapni arról is, hogy a kohabitáns baktériumok együttesen milyen biofilmeket alakíthatnak ki. A természetben, a laboratóriumi körülményekkel szemben, inkább az a jellemző, hogy a biofilmeket több különböző baktérium fajba vagy szerovárba tartozó törzsek alakítják ki. E komplexebb biofilmek tanulmányozása tehát rávilágíthat arra is, hogy e baktérium közösségekben milyen kapcsolatok jönnek létre az azokat alkotó baktériumok között, ami segíthet abban, hogy hatékonyabb módszereket fejleszthessenek ki a húsiparban perzisztáló baktériumok ellen. Ilyen jellegű kísérletek részeként a biofilmek cellulóz és curli fimbria komponenseinek behatóbb vizsgálata (amik a *Salmonella*, valamint az *E. coli* törzsek által alkotott biofilmek fontos összetevői, elősegítve a megtapadást és perzisztálást a felületeken) szintén hozzájárulhat hatékonyabb védekezési és fertőtlenítő eljárások kifejlesztéséhez. Azon baktériumok, amelyek biofilm képzésre képesek és MDR tulajdonságokkal is rendelkeznek közegészségügyi kockázatot jelenthetnek, így e baktériumok kutatása fokozott társadalmi jelentőséggel bír.

7.0 Összefoglalás

Az első antibiotikumok felfedezése és széleskörű alkalmazásuk megkezdése következményeként megjelentek a velük szemben rezisztens baktériumtörzsek is, amik jelentősen veszélyeztetik a terápiás kezelések hatékonyságát. A WHO 2015-ös közgyűlésén elfogadott globális cselekvési tervet követve 2017-ben az Európai Unió is meghirdetett egy az antibiotikum rezisztencia (AR) elleni európai cselekvési tervet, melynek része az antibiotikum-rezisztenciára irányuló tudományos kutatások támogatása. E dolgozat célkitűzése volt brojler csirke eredetű kohabitáns *S. Infantis* és *E. coli*, valamint humán *S. Enteritidis* törzsek AR fenotípusának és biofilm képző tulajdonságainak összehasonlítása, továbbá az általuk hordozott szerzett AR gének azonosítása, valamint a biofilm képzés és rezisztencia potenciális összefüggéseinek vizsgálata. Feltételezésünk szerint a *S. Infantis* törzseknek a hazai brojler állományokban való elterjedésében azok biofilm képzése és a velük társultan előforduló *E. coli* törzsek is szerepet játszhattak. A vizsgált izolátumok recens törzsgyűjtemény részét képezik. Az AR fenotípus meghatározása korong diffúzóval, az AR gének azonosítása a WGS adatok alapján a ResFinder program segítségével történt. A biofilm morfortípus meghatározáshoz Kongóvörös agart használtunk, míg a biofilm-képzéshez kapcsolódó kvantitatív adatokat Genevaux és munkatársainak módszere alapján Multiskan™ FC Microplate Photometeren 560 nm-en végzett abszorbancia méréssel határoztuk meg. A fenotípusos antibiotikum rezisztencia vizsgálatok során az *E. coli* törzsek rendelkeztek a legváltozatosabb AR fenotípussal és szerzett AR génekkel is. A vizsgált *E. coli* törzsek jellemzően ampicillinre, ciprofloxacinnra és tetraciklinre mutattak fenotípusos rezisztenciát, míg a társultan élő *S. Infantis* törzsekre a NAL-SUL-TET rezisztencia profil volt jellemző, hasonlóan a hazai brojler csirke állományokra vonatkozó irodalmi adatokhoz. A kohabitáns *S. Infantis* és *E. coli* izolátumok körében a multidrog-rezisztens (MDR) fenotípus is jelentős arányban (44.53%) kimutatható volt. A vizsgált szerzett AR gének viszonylatában szintén az *E. coli* izolátumok rendelkeztek a legváltozatosabb genotípussal. Elmondható, hogy a kohabitáns *E. coli* és *S. Infantis* törzsek között a legnagyobb arányban a *tet(A)* gént lehetett kimutatni, ezt követte a *sull* és a *bla_{TEM}* gének jelenléte. A biofilm képzési vizsgálatok során a három tesztelt hőmérsékleten (20°C, 28°C és 37°C) a legmagasabb biofilm képző aktivitással a *S. Infantis* törzsek rendelkeztek, ami hozzájárulhatott a szerovár elterjedéséhez a hazai brojler állományokban. A másik vizsgált *Salmonella* szerovár, a *S. Enteritidis* esetén tapasztaltuk a legalacsonyabb biofilm-képző potenciált. A vizsgálatainkban megfigyelt biofilm morfortípusokról elmondható, hogy az AR vizsgálatokhoz hasonlóan az *E. coli* törzsek rendelkeztek a legváltozatosabb biofilm-

morfológiával, míg 37°C-on az összes vizsgált törzs egyforma, bas típusú biofilm morfológiát vett fel. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a biofilm képző aktivitás elsősorban a hőmérséklettől és a vizsgált fajtól/szerovártól függött, és nem lehetett egyértelmű kapcsolatot kimutatni az antibiotikum rezisztencia és a biofilm képzés között. A kvantitatív adatok alapján a *S. Infantis* törzsek nagyobb biofilm képző aktivitással rendelkeztek, mint a *S. Enteritidis* törzsek. E jellemzőjük adaptációs előnyt jelent a *S. Infantis* törzsek számára, ami elősegíthette elterjedésüket is. A biofilm képzés segítségével ugyanis a *S. Infantis* törzsek könnyebben meg tudnak tapadni a különböző felületeken és képesek azokon perzisztálni, míg a *S. Enteritidis* törzsekre ez a tulajdonság kevésbé volt jellemző. Azon baktériumok, amelyek biofilm képzésre képesek és MDR tulajdonságokkal is rendelkeznek közegészségügyi kockázatot jelenthetnek, így e baktériumok kutatása fokozott társadalmi jelentőséggel is bír.

8.0 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Szmolka Amának, hogy segített a témaválasztásban, és minden eszközzel biztosította számomra a megfelelő munkát. Szeretném azt is megköszönni Amának, hogy rendelkezésemre bocsátotta a dolgozat során felhasznált törzseket, azok minden elérhető adatait, valamint szakmai segítséget nyújtott az elvégzett munka során. Köszönöm Dr. Libisch Baláznak, hogy elvállalta a belső konzulensi feladatokat. Mindig számíthattam tanácsaira és észrevételeire, támogatása nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el. Köszönöm Rapcsák Fanninak, aki nélkül ez a dolgozat szintén nem készülhetett volna el, szakmai támogatása mellett, meghallgatott és segített leküzdeni az akadályokat. Köszönöm családomnak, akik mindenben támogattak az iskolai évek során.

9.0 Felhasznált irodalom

- Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(3), 473–493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J. M. C., & Peixe, L. (2005). Dissemination of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1* , *sul2* , and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* Strains and Relation with Integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 836–839. <https://doi.org/10.1128/aac.49.2.836-839.2005>
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3(2), 113–126. [https://doi.org/10.1016/s1466-8564\(02\)00012-7](https://doi.org/10.1016/s1466-8564(02)00012-7)
- Avila-Novoa, M. G., Guerrero-Medina, P. J., Navarrete-Sahagún, V., Gómez-Olmos, I., Velázquez-Suárez, N., De La Cruz-Color, L., & Gutiérrez-Lomelí, M. (2021). Biofilm Formation by Multidrug-Resistant Serotypes of *Salmonella* Isolated from Fresh Products: Effects of Nutritional and Environmental Conditions. *Applied Sciences*, 11(8), 3581. <https://doi.org/10.3390/app11083581>
- Banin, E., Hughes, D., & Kuipers, O. P. (2017). Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *Fems Microbiology Reviews*, 41(3), 450–452. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux016>
- Bej, A. K., DiCesare, J., Haff, L., & Atlas, R. M. (1991). Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(4), 1013–1017. <https://doi.org/10.1128/aem.57.4.1013-1017.1991>
- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. (2008). *Escherichia coli* Biofilms. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (pp. 249–289). Springer Science+Business Media. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_12
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppé, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesøe, R. L., Rebelo, A. C. S., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J., Stingl, K., Nguyen, M. T., Coppens, J., Xavier, B. B., . . . Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- Brown, K., Uwiera, R. R. E., Kalmokoff, M., Brooks, S., & Inglis, G. D. (2017). Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(1), 12–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.006>
- CDC Antibiotic Resistance & Patient Safety Portal Outpatient Antibiotic Prescription Data - <https://arpsp.cdc.gov/resources/OAU-Antibiotic-Class-Definitions.pdf> (2023. február)
- Chen, S., Zhao, S., White, D., Schroeder, C., Lu, R., Yang, H., McDermott, P. F., Ayers, S., & Meng, J. (2004). Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 1–7. <https://doi.org/10.1128/aem.70.1.1-7.2004>
- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>

- Crump, J. A., Sjölund-Karlsson, M., Gordon, M. A., & Parry, C. M. (2015). Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive Salmonella Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(4), 901–937. <https://doi.org/10.1128/cmr.00002-15>
- Dashti, A. A., Jadaon, M. M., Abdulsamad, A. M., & Dashti, H. M. (2009). Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Medical Journal*, 41.
- Donato, J. J., Moe, L. A., Converse, B. J., Smart, K. D., Berklein, F. C., McManus, P. S., & Handelsman, J. (2010). Metagenomic Analysis of Apple Orchard Soil Reveals Antibiotic Resistance Genes Encoding Predicted Bifunctional Proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4396–4401. <https://doi.org/10.1128/aem.01763-09>
- Eberl, C., Weiss, A.S., Jochum, L.M., Durai Raj, A.C., Ring, D., Hussain, S., Herp, S., Meng, C., Kleigrewe, K., Gigl, M., Basic, M., & Stecher, B. (2021). E. coli enhance colonization resistance against Salmonella Typhimurium by competing for galactitol, a context-dependent limiting carbon source. *Cell host & microbe*.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority) and EMA (European Medicines Agency), (2021). Third joint inter-agency report on integrated analysis of consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals in the EU/EEA. *EFSA Journal* 2021;19(6):6712, 164 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6712>
- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2(022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2022; 20(12):7666, 273 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), (2023). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFSA Journal* 2023; 21(3):7867, 232 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7867>
- EUCAST coding for antibiotic abbreviation <https://www.eucast.org/eucastguidancedocuments> (2023. február)
- European Commission (2017) A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR) https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf (2022. január)
- European Parliament & the European Council (2019): Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on Veterinary Medicinal Products and repealing Directive 2001/82/EC. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32019R0006&from=EN> https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_05_1687 (2023. február)
- Fleming, A. (1930). Antibacterial Action in Cultures of Penicillium, With Special Reference to Their Use in Isolation of Bacillus Influenzas. *The American Journal of the Medical Sciences*, 180(3), 449. <https://doi.org/10.1097/00000441-193009000-00056>
- Fleming, A. (1945) Nobel Lecture, <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fleming-lecture.pdf> (2023. február)
- Flemming, H., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P. D., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>

- Fox J (2005). The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software*, 14(9), 1-42. <https://www.jstatsoft.org/article/view/v014i09>.
- Genevaux, P., Muller, S., & Bauda, P. (1996). A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *Fems Microbiology Letters*, 142(1), 27–30. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08402.x>
- Harms, R. H., Ruiz, N., & Miles, R. B. (1986). Influence of Virginiamycin on Broilers Fed Four Levels of Energy. *Poultry Science*. <https://doi.org/10.3382/ps.0651984>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Illumina MiSeq <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq.html>
- JPIAMR members, <https://www.jpiaamr.eu/about/jpiaamr-members/> (2023. február)
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300. https://doi.org/10.4103/joacp.joacp_349_15
- Kardos, G., Farkas, T., Antal, M., Nógrády, N., & Kiss, I. Z. (2007). Novel PCR assay for identification of *Salmonella enterica* serovar Infantis. *Letters in Applied Microbiology*, 45(4), 421–425. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2007.02220.x>
- Katz, L., & Baltz, R. H. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(2–3), 155–176. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1723-5>
- Kirchhelle, C. (2018). Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017). *Palgrave Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1057/s41599-018-0152-2>
- Levy, S. B., Fitzgerald, G., & Maccone, A. B. (1976). Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature*, 260(5546), 40–42. <https://doi.org/10.1038/260040a0>
- Lin, Z., Wang, G., Li, S., Zhou, L., & Yang, H. (2022). Dual-Species Biofilms Formed by *Escherichia coli* and *Salmonella* Enhance Chlorine Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(22). <https://doi.org/10.1128/aem.01482-22>
- Lloyd, N., Morgan, H. W., Nicholson, B. K., Ronimus, R. S., & Riethmiller, S. (2005). Salvarsan - the first chemotherapeutic compound. *Chemistry in New Zealand*, 69(1), 24–27.
- MacPherson, D. W., Gushulak, B. D., Baine, W. B., Bala, S., Gubbins, P. O., Holtom, P., & Segarra-Newnham, M. (2009). Population Mobility, Globalization, and Antimicrobial Drug Resistance. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid1511.090419>
- Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S. J., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. C. J., Stelling, J., Struelens, M., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

- Malcova, M., Hradecka, H., Karpíšková, R., & Rychlik, I. (2008). Biofilm formation in field strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: Identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. *Veterinary Microbiology*, 129(3–4), 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.006>
- Manyi-Loh, C. E., Mamphweli, S., Meyer, E. L., & Okoh, A. I. (2018). Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules*, 23(4), 795. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>
- Maron, D. F., Smith, T. C., & Nachman, K. E. (2013). Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Globalization and Health*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1744-8603-9-48>
- Marin, C., Hernandez, A., & Lainez, M. (2009). Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science*, 88(2), 424 – 431. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00241>
- Marshall, B., & Levy, S. B. (2011). Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 718–733. <https://doi.org/10.1128/cmr.00002-11>
- Martínez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>
- Merino, L. E., Procura, F., Trejo, F., Bueno, D. J., & Golowczyc, M. A. (2017). Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. *Food Research International*, 119, 530–540. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.024>
- Nesse, L. L., Osland, A. M., Mo, S. S., Sekse, C., Slettemeås, J. S., Bruvoll, A. E. E., Urdahl, A. M., & Vestby, L. K. (2020). Biofilm forming properties of quinolone resistant *Escherichia coli* from the broiler production chain and their dynamics in mixed biofilms. *BMC Microbiology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01730-w>
- Nógrády N, Kardos G, Bistyák A, Turcsányi I, Mészáros J, Galántai Z, Juhász A, Samu P, Kaszanyitzky JE, Pászti J, Kiss I. (2008). Prevalence and characterization of *Salmonella* Infantis isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. *International Journal of Food Microbiology*. 127(1-2):162-7.
- Nógrády, N., Király, M., Davies, R., & Nagy, B. (2012). Multidrug resistant clones of *Salmonella* Infantis of broiler origin in Europe. *International Journal of Food Microbiology*, 157(1), 108–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.007>
- Nógrády, N., Tóth, Á., Kostyák, Á., Pászti, J., & Nagy, B. (2007). Emergence of multidrug-resistant clones of *Salmonella* Infantis in broiler chickens and humans in Hungary. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(3), 645–648. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm249>
- Pande, V., McWhorter, A. R., & Chousalkar, K. (2016). *Salmonella enterica* isolates from layer farm environments are able to form biofilm on eggshell surfaces. *Biofouling*, 32(7), 699–710. <https://doi.org/10.1080/08927014.2016.1191068>
- PCRBIO Taq DNA Polymerase Product Description, <https://pcrbio.com/app/uploads/PB10.11-PCRBIO-Taq-DNA-Polymerase-v1.8.pdf> (2023. február)

- Poirel, L., Madec, J., Lupo, A., Schink, A., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Thi, T. T. L., Vidal, O., Lejeune, P., & Dorel, C. (2000). Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environmental Microbiology*, 2(4), 450–464. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00128.x>
- Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1701–1718. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x>
- Ryan, M. J., O'Dwyer, J., & Adley, C. C. (2017). Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. *BioMed Research International*, 2017, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2017/3782182>
- Schonewille, E., Nesse, L. L., Hauck, R., Windhorst, D., Hafez, H. M., & Vestby, L. K. (2012). Biofilm building capacity of *Salmonella enterica* strains from the poultry farm environment. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 65(2), 360–365. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.2012.00966.x>
- Siekkinen, K., Heikkilä, J., Tammiranta, N., & Rosengren, H. (2012). Measuring the costs of biosecurity on poultry farms: a case study in broiler production in Finland. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(1). <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-12>
- Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(8), 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>
- Stockwell, V. O., & Duffy, B. R. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue Scientifique Et Technique De L'Office International Des Epizooties*, 31(1), 199–210. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2104>
- Szmolka, A., & Nagy, B. (2013). Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00258>
- Szmolka, A., Szabó, M., Kiss, J., Pászti, J., Adrián, E., Olasz, F., Nagy, B. (2018). Molecular epidemiology of the endemic multiresistance plasmid pSI54/04 of *Salmonella* Infantis in broiler and human population in Hungary. *Food Microbiology*, 71:25-31.
- Szmolka, A., Wami, H., & Dobrindt, U. (2021). Comparative Genomics of Emerging Lineages and Mobile Resistomes of Contemporary Broiler Strains of *Salmonella* Infantis and *E. coli*. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642125>
- Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., & Hameed, S. (2014). Multidrug Resistance: An Emerging Crisis. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2014/541340>
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2023. <http://www.eucast.org>. (2022. február)
- Threlfall, E. J. (2002). Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *Fems Microbiology Reviews*, 26(2), 141–148. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00606.x>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/bcj20160510>

- Uddin, T. A., Chakraborty, A., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. B., Dhama, K., Ripon, K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of Infection and Public Health*, *14*(12), 1750–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., & Osek, J. (2022). Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. *Antibiotics*, *11*(8), 1079. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C. N., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Van Den Bogaard, A. E., Willems, R., London, N., Top, J., & Stobberingh, E. E. (2002). Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *49*(3), 497–505. <https://doi.org/10.1093/jac/49.3.497>
- Van Duijkeren, E., Schink, A., Roberts, M. C., Wang, Y., & Schwarz, S. (2018). Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Microbiology Spectrum*, *6*(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0019-2017>
- Waksman, S. A. (1947). What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? *Mycologia*, *39*(5), 565. <https://doi.org/10.2307/3755196>
- Waksman, S. A., Schatz, A., & Reynolds, D. L. (1946). Production of antibiotic substances by Actinomycetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1213*(1), 112–124. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05861.x>
- White, A., Gibson, D., Kim, W., Kay, W. W., & Surette, M. G. (2006). Thin Aggregative Fimbriae and Cellulose Enhance Long-Term Survival and Persistence of *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, *188*(9), 3219–3227. <https://doi.org/10.1128/jb.188.9.3219-3227.2006>
- World Health Organisation (WHO) (2015): Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, WHO, Geneva, Switzerland. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/193736> (2023. január)
- Wood, M., Mahon, J., & Lax, A. J. (1994). Development of a probe and PCR primers specific to the virulence plasmid of *Salmonella enteritidis*. *Molecular and Cellular Probes*, *8*(6), 473–479. <https://doi.org/10.1006/mcpr.1994.1068>
- Wu, S., Dalsgaard, A., Hammerum, A. M., Porsbo, L. J., & Jensen, L. J. (2010). Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *52*(1). <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-47>
- Xiong, W., Sun, Y., & Zeng, Z. (2018). Antimicrobial use and antimicrobial resistance in food animals. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(19), 18377–18384. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1852-2>
- Yan, J., & Bassler, B. L. (2019). Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host & Microbe*, *26*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002>
- Zhao, Y., Yang, Q., Zhou, X. S., Wang, F., Muurinen, J., Virta, M., Brandt, K. K., & Zhu, Y. (2021). Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions. *Critical Reviews in*

Environmental Science and Technology, 51(19), 2159–2196.
<https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1777815>

10.0 Nyilatkozat

NYILATKOZAT

a diplomadolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Fodor Zsófia Csenge
A Hallgató Neptun kódja: BCIDU3
A dolgozat címe: Brojler csirke eredetű *Salmonella* és *Escherichia coli* törzsek antibiotikum rezisztenciával kapcsolt tulajdonságainak összehasonlító vizsgálata
A megjelenés éve: 2023.
A konzulens tanszék neve: MATE Genetika és Biotechnológia Intézet (GBI)

Kijelentem, hogy az általam benyújtott diplomadolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

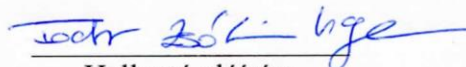
Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: Budapest, 2023. év 05. hó 02. nap


Hallgató aláírása

KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Fodor Zsófia Csenge (hallgató Neptun azonosítója: BCIDU3) belső konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a diplomadolgozatát áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A diplomadolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: Gödöllő, 2023. április 25.



Dr. Libisch Balázs Károly
tudományos főmunkatárs
MATE GBI
Belső konzulens

4. sz. függelék – Hallgatói és konzulensi nyilatkozat minta

NYILATKOZAT

Alulírott JODORA ZSÓFIA CSENGÉ, a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, SZENT ISTVÁN Campus, MEZŐGAZDASÁGI BIOTECHNOLÓGUS szak nappali/levelező* tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy Záródolgozatom/Szakdolgozatom/Diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön az Egyetem honlapjára és hogy a digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető Tanszéken/Intézetben, illetve az Egyetem központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*

Kelt: Budapest, 2023 év 04. hó 28 nap

Jodora Zsófia Csengé
Hallgató

NYILATKOZAT

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A Záródolgozatot/Szakdolgozatot/Diplomadolgozatot záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom*.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem*

Kelt: Gödöllő, 2023 év 04. hó 28 nap

L. Balogh

Belső konzulens

*Kérjük a megfelelőt aláhúzni!