

# **TDK DOLGOZAT**

**Ferró Kristóf**

**2024**

# ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



Hazai nagylétszámú pulyka állományokból  
izolált *Clostridium perfringens* törzsek toxintermelésért  
felelős génjei és antibiotikum-érzékenységük közötti  
összefüggés

Készítette:

**Ferró Kristóf**

IV. évf. ao. hallgató

Témavezető:

Dr. Kerek Ádám

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, egyetemi tanársegéd

**Budapest**

**2024**

## Tartalomjegyzék

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....                                    | 3  |
| 1. Bevezetés .....                                           | 4  |
| 2. Irodalmi áttekintés .....                                 | 5  |
| 2.1. Az antimikrobiális rezisztencia globális helyzete ..... | 5  |
| 2.2. <i>Clostridium</i> nemzetség jellemzői .....            | 7  |
| 2.3. A <i>Clostridium perfringens</i> érzékenysége .....     | 10 |
| 2.4. Virulenciafaktorok, toxintermelés .....                 | 12 |
| 3. Célkitűzések .....                                        | 16 |
| 4. Anyag és módszer.....                                     | 17 |
| 4.1. A minták eredete.....                                   | 17 |
| 4.2. A törzsek izolálása.....                                | 17 |
| 4.3. A hatóanyag törzsoldatok elkészítése.....               | 17 |
| 4.4. A minimális gátló koncentráció meghatározása.....       | 18 |
| 4.5. Az ECOFF érték meghatározása .....                      | 20 |
| 5. Eredmények.....                                           | 22 |
| 6. Következtetések.....                                      | 29 |
| 7. Összefoglalás .....                                       | 32 |
| 8. Summary.....                                              | 33 |
| 9. Irodalomjegyzék .....                                     | 34 |
| 10. Köszönetnyilvánítás .....                                | 41 |

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

|       |                                                                           |
|-------|---------------------------------------------------------------------------|
| AMR   | Antimikrobiális rezisztencia ( <i>Antimicrobial resistance</i> )          |
| ARG   | Antimikrobiális rezisztencia gén ( <i>Antimicrobial resistance gene</i> ) |
| ECOFF | <i>Epidemiological cut off value</i>                                      |
| GTA   | Géntranszfer ágens ( <i>Gene transfer agent</i> )                         |
| HGT   | Horizontális géntranszfer ( <i>Horizontal gene transfer</i> )             |
| MGE   | Mobilis genetikai elem ( <i>Mobile genetic element</i> )                  |
| MIC   | Minimális gátló koncentráció ( <i>Minimum inhibitory concentration</i> )  |
| NE    | Elhalásos bélgyulladás ( <i>Necrotic enteritis</i> )                      |

## 1. BEVEZETÉS

Az antimikrobiális rezisztencia kialakulásának hátterében álló folyamatok jobb megértése érdekében az állat- és közegészségügyet szoroson összekapcsoló, az Egy Egészség szemléletet kimerítő gondolkodásmódra van szükség. Mindannyiunk közös érdeke, hogy az antibiotikumok hatékonyságát fenntartsuk a jövő generációi számára. A virulencia faktorok, úgy, mint a toxintermelésért felelős gének jelenléte meghatározza egy adott törzs patogenitását. A kommenzalista törzsek a rezisztencia gének kiváló természetes rezervoárjai lehetnek, azonban a toxintermelésért felelős gének környezeti fenntartásában is szerepet játszhatnak. Vizsgálatainkkal nem csak a Magyarországi nagylétszámú pulyka állományokból izolált kommenzalista *Clostridium perfringens* törzsek antibiotikumokkal szembeni érzékenységét kívántuk felmérni, hanem a törzsek toxintermelésért felelős major és minor génjeinek feltérképezését, valamint az érzékenységi vizsgálati eredményekkel való párhuzamba állítását is célul tűztük ki. Eredményeink hozzájárulhatnak az antimikrobiális rezisztencia széleskörű terjedésének jobb megértéséhez és jobb, komplexebb gondolkodásmódra adnak lehetőséget.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Az antimikrobiális rezisztencia globális helyzete

A különböző mikroorganizmusok, mint a baktériumok, a vírusok, a paraziták és a gombák ellenállóvá válhatnak a korábban kezelésükben sikeresen alkalmazott gyógyszerekkel szemben. Ez a jelenség az antimikrobiális rezisztencia (AMR), aminek terjedése globális probléma [1]. A különféle mikroorganizmusok, mint például a gombák és a szaprofita baktériumok természetes védekezésük során számos antimikrobiális anyag termelésére képesek [2]. Az antibiotikus hatással rendelkező vegyületek termelése evolúciós előnyt jelent az azt előállító organizmusok számára, mivel gátolják a versenytársakat az erőforrásokért folytatott versenyben [3]. Ugyanakkor az antibiotikumok fontos jelzőmolekula szerepet tölthetnek be természetes körülmények között a sejtek közötti kommunikációban [4]. A természetes antimikrobiális szerek mellett számos hatóanyagot ezen természetes vegyületek módosításával állítottak elő, míg más hatóanyagok, mint a szulfonamidok és a fluorokinolonok, teljesen mértékben szintetikusak [2]. Az AMR terjedése napjaink egyik legjelentősebb egészségügyi problémája mind az állat- és közegészségügy területén [1]. 2019-ben a világ vezető halálozási oka a daganatos betegségek voltak, ami éves szinten több, mint 8 millió ember halálát okozta, míg az antimikrobiális rezisztenciával rendelkező kórokozók ugyanebben az évben már több, mint egy millió ember haláláért feleltek. A legóvatosabb becslések szerint is 2050-re várhatóan évente körülbelül tízmillió ember halálát okozhatja az AMR terjedése, ezáltal a globális vezető halálozási okká léphet elő [5].

Az antimikrobiális szerekkel szemben többféle védekező mechanizmus alakult ki és terjedt el a darwini szelekciós folyamatok eredményeként [2], ami nem csak a természetes, hanem a szintetikus kemoterapeutikumokkal szemben, például szulfonamidok és diaminopirimidinekkel szemben is kialakulhat [6]. Ilyen lehet a célpont megváltoztatása, a hatóanyagot lebontó, vagy átalakító enzimek termelése, az antimikrobiális szer kipumpálása, vagy bejutásának megakadályozása a baktérium belsejébe [2]. Az rezisztencia kialakulásának nem csak nagy egészségügyi, hanem gazdasági jelentősége is van [1], mivel a bakteriális fertőzések kezelése jelentős részben az antibiotikumokra épül [7]. Számos antibiotikum-rezisztencia gén jelen van a természetes mikrobapopulációkban [6]. Ezt jól példázza, hogy olyan helyeken is jelen vannak az antibiotikum-rezisztencia gének, mint az antarktiszi vizek, a földfelszín alatti mély rétegek, vagy a grönlandi jégtakaró mélyebb rétegei, ahol a baktériumok valószínűleg nem találkoztak az emberek által alkalmazott

antibiotikumokkal [8]. Néhány évvel azután, hogy Alexander Fleming 1928-ban felfedezte a penicillint, bakteriális eredetű penicillinázt azonosítottak, majd a penicillin széleskörű alkalmazása következtében elkezdtek terjedni a rezisztens törzsek. Később a gümőkór kezelésére használt sztreptomocinnal szemben ellenálló *Mycobacterium tuberculosis* törzsek is széleskörben jelentek meg, majd a többi antibiotikum alkalmazásának hatására is hasonló folyamatok voltak megfigyelhetők. Ezek a példák jól mutatják, hogy az antibiotikum-rezisztencia széleskörű elterjedésének elsődleges oka az antibiotikum-használat [6], ami nemcsak a rezisztens baktériumok szelekcióját okozza, de a rezisztenciagének horizontális terjedését is segítheti, mivel a bakteriális DNS károsodását okozhatják, ami az SOS válaszmechanizmus révén gyakran mobilis genetikai elemek (MGE) konjugációjához és fág lízishez, ritkábban plazmid konjugációhoz vezethet [9]. Bár a baktérium populációkban a gének - így az antimikrobiális rezisztencia gének (ARG) is MGE-ken keresztül horizontálisan is terjedhetnek, a rezisztens baktériumok gyakran klonálisak [7].

A horizontális géntranszfer (HGT) jelentősége a különböző baktériumfajokban nem azonos. *Mycobacterium tuberculosis* esetén például a rezisztencia spontán mutációval keletkezik, majd vertikálisan terjed, így nem jellemző a rezisztenciagének horizontális terjedése [6]. A HGT fajok között is végbe mehet, így adott fajon belül több rezisztenciagén megjelenésére, azok felhalmozódására van lehetőség. A HGT formái a konjugáció, a transzdukción és a transzformáció, de gén transzfer ágenseken (GTA) keresztül is végbe mehet. Konjugáció során plazmidon, valamint az integratív konjugációs elemeken, a kromoszómán elhelyezkedő gének közvetlen átadására van lehetőség [10]. A HGT felsorolt lehetőségei közül kizárólag a konjugációhoz szükséges a donor és a recipiens sejt közvetlen találkozása [11]. Transzdukción során bakteriofágok közvetítik az azokba véletlenszerűen (hibásan) beépülő bakteriális géneket a megfertőzött baktériumsejtek között. A bakteriofágok az ARG-k tekintetében nem csak vektor, hanem rezervoár szerepet is betöltenek [10]. Transzformáción során a baktérium a környezetből, általában aktív exkrécióval vagy sejtlízis során oda kerülő DNS szakaszokat vesz fel, majd DNS-javító rekombináz enzimjei segítségével a saját genomjába integrálja azokat [11]. A GTA-k termelését sejtszintű mechanizmusok szabályozzák, majd a baktériumsejt lízise következtében a külvilágra jutnak. Az azokat termelő sejt genomjának véletlenszerű részleteit hordozzák, amik így a környezeti hatásoktól viszonylag védetten juthatnak a recipiens baktériumba. Általában nem az önmagukat kódoló géneket hordozzák, így önszaporításra képtelenek [10]. A HGT lehetősége a baktériumpopulációkban azonban

nem korlátlan. Általában azok az MGE-k, amelyek horizontális átviteli rátája magas, például anyagcsere-költség vagy sejtlízis révén rontják a baktériumok fitneszt, ami közvetve csökkenti a HGT lehetőségét, valamint a vertikális átvitel lehetősége is csökken. Emellett a recipiens sejtek védekező mechanizmusai is a HGT ellen hatnak [9]. Jellemzően a széles spektrumú, orálisan alkalmazott antibiotikumok hatására a nem patogén baktériumokban a rezisztenciagének fennmaradnak és szelektálódnak, majd patogén baktériumokba juthatnak, így módon a környezeti baktériumok mellett az egészséges bélflórát alkotó baktériumok is rezervoárjai lehetnek az antibiotikum-rezisztencia géneknek [7]. A rezisztenciagének az azokat hordozó baktériumokkal a bélsáron keresztül a környezetbe kerülnek. A folyamat eredményeként a rezisztens baktériumok megtalálhatók a trágyában, szennyvízben, sőt a talajban és a természetes vizekben is, majd a takarmánnyal illetve élelmiszerrel az állatok és emberek tápcsatornájába juthatnak [12]. Azonban a rezisztóma eltérő ökológiai körülmények között nem azonos, csupán részleges átfedést mutat [13].

## **2.2. *Clostridium* nemzetség jellemzői**

A *Clostridium perfringens* a *Clostridium* nemzetségbe, a Clostridiaceae családba, a Clostridiales rendbe, a Clostridia osztályba és a Firmicutes törzsbe tartozik. Ebbe a törzsbe tartozik a Bacilli és az Erysipelothrici osztály is [14]. Feltehetően 2,5 milliárd éve váltak külön a bacillusok és a clostridiumok, amikor a légkör oxigénszintje megemelkedett. A clostridiumok anaerob spóráképzőkké, a bacillusok pedig aerob spóráképzőkké váltak [15]. A *Clostridium* nemzetségbe körülbelül 180 Gram-pozitív, anaerob, spóráképző baktériumfaj tartozik, amivel ez az egyik legnépesebb baktériumnemzetség [16]. A clostridiumok vegetatív baktériumsejt vagy spóra formában széleskörben előfordulnak a környezetben. Többek között megtalálhatók a talajban és az állatok tápcsatornájában [15]. A *Clostridium* nemzetség egy heterogén csoport, tagjai filogenetikai alapon 19 különböző klaszterbe sorolhatók [17].

A clostridiumok többsége nem okoz betegséget, csupán néhány faj patogén. Anyagcseréjük meglehetősen komplex, számos különböző anyagcsereúton keresztül sokféle szervesanyag lebontására képesek, bontják a fehérjéket, peptideket, aminosavakat, cukrokat, purinokat, pirimidineket, alkoholokat, szerves savakat [16], ami egy fontos ökológiai szerepet biztosít a biomassza megújításában [18], továbbá számos *Clostridium* faj biotechnológiai felhasználására ad lehetőséget. A *Clostridium acetobutylicum* fajt már az első világháború alatt acetont, majd butanol ipari előállítására is használták [19]. A *Clostridium thermocellum* képes a cellulóztartalmú hulladékok felhasználásával hidrogént

és etanolt termelni [20], a *Clostridium thermosaccharolyticum* acetolt és racémikus 1,2-propándiolt állít elő, amiből élelmiszer-adalékanyagok készíthetők. Az Egyesült Államokban például az utak jégmentesítésére használnak clostridiumok által előállított acetátot [19]. Egyes *Clostridium* fajok daganatterápiában való felhasználásának lehetőségét is vizsgálják [16]. A patogén clostridiumok fő virulenciafaktorai a toxinok. A bakteriális toxinok kb. 20%-át clostridiumok állítják elő, viszont mindössze 15 faj képes nagy klinikai jelentőséggel bíró fehérjetoxinok termelésére [18]. Ilyen patogén, toxintermelő fajok például a *Clostridium tetani*, a *Clostridium botulinum*, a *Clostridium difficile* és a *Clostridium perfringens* [21]. A *Clostridium tetani* és a *Clostridium botulinum* teanusz és botulinum neurotoxinokat termelnek (TeNT és BoNT), ezek a ma ismert legerősebb bakteriális toxinok. A TeNT a gátló interneuronoknál blokkolja a szinaptikus jelátvitelt, ezzel görcsös bénulást okoz, míg a BoNT a neuromuszkuláris junctionban gátolja a szinaptikus transzmissziót, így petyhüdt bénulást okoz [22]. A *Clostridium difficile* fertőző hasmenést és álhártyás colitist okozhat, a patogenitásáért két toxin, az A toxin és a B toxin (TcdA és TcdB) felelős. Az antibiotikumkezelés következtében a protektív bélmikrobiom kimerülése elősegíti a fertőzés kialakulását, ezért ez a faj gyakran áll az antibiotikum-kezeléssel összefüggő hasmenés hátterében [23].

A *Clostridium perfringens* a környezetben széleskörben előfordul, megtalálható a talajban, a vízben, a bélsárban [24]. Tág, 5-50 °C-os hőmérsékleti tartományban képes szaporodni [25]. Az optimális tenyésztési hőmérséklete 43 °C körüli, generációs ideje rövid, akár 6,3 perc is lehet, de ez függ a táptalajtól és attól, hogy mely törzsbe tartozik az adott baktérium [26]. Habár a *Clostridium perfringens* egy anaerob baktérium, képes túlélni oxigén, sőt szuperoxid- és hidroxilgyökök jelenlétében is [27]. Opportunista patogén, jelen van egészséges emberek és állatok tápcsatornájában, a mikrobióta része, ugyanakkor számos betegség kialakulásának hátterében állhat [28]. Gyakran okoz élelmiszer eredetű megbetegedést, jellemzően a kórokozót tartalmazó talajjal vagy vízzel szennyezett friss zöldségek és gyümölcsök, de akár húsok, főtt ételek fogyasztása révén is, ugyanis az ott jelenlévő hőtűrő spórák a lehűlt ételben kicsírázhatnak és rövid idő alatt elszaporodhatnak. A *Clostridium perfringenst* látszólag egészséges állatok is átadhatják az embernek, közvetlen vagy közvetett úton, ami az új gazdában betegséget okozhat [24]. A *Clostridium perfringens* törzseket toxintermelésük alapján hét típusba (A-G) sorolják [29]. Az egyes típusok különböző betegségekkel hozhatók összefüggésbe.

Az „A” típus emberek és több állatfaj esetében is okozhat gázgangrénát, kutyák és lovak esetében vérzéses gastroenteritist, és feltehetően sertések, lovak és kérődzők enterotoxémiájának hátterében is állhat. A „B” típus báránydizentériát, a „C” típus több állatfaj újszülött egyedeiben vérzéses és elhalásos bélgyulladást, a „D” típus juhok, szarvasmarhák és kecskék esetén enterotoxémiát okoz. Az „E” típus nyulak és szarvasmarhák emésztőszervi megbetegedéseivel áll kapcsolatban [30]. Az „F” típus emberi ételmérgezést, szórványos hasmenést és antibiotikumkezeléssel összefüggő hasmenést, állatoknál pedig takarmány eredetű mérgezést okoz. A „G” típus madarak elhalásos bélgyulladását (NE) okozza. Az elhalásos bélgyulladás többek között csirkék, pulykák, ludak, struccok, fürjek és varjak között előforduló betegség [28]. A baromfifélék bélrendszeri betegségeinek egyik legfontosabb előidézői a clostridiumok. Ezek közül a leggyakoribb a *Clostridium perfringens* által okozott elhalásos bélgyulladás, de nagy jelentősége van a *Clostridium colinum* által okozott fekélyes bélgyulladásnak is. A baromfifélék elhalásos bélgyulladása világszerte elterjedt, sporadikusan előforduló, komoly gazdasági károkat okozó betegség [31]. Az elhalásos bélgyulladás során a *Clostridium perfringens* NetB toxint termelő törzsei szaporodnak el a bélrendszerben. A bakteriális fertőzés azonban önmagában általában nem elegendő a betegség kialakulásához. Hajlamosító tényezők a búza alapú, valamint a magas halliszt tartalmú takarmányok etetése, és az *Eimeria* fertőzöttség [32]. Ezen kívül néhány további gabonaféle, mint a rozs, az árpa, a zab túlzott etetése, valamint a stressz, a nem megfelelő szemcseméretű takarmány, a hirtelen takarmányváltás, és a nagy állománysűrűség szintén hozzájárulnak az elhalásos bélgyulladás kialakulásához [33].

A NE pulykáknál jellemzően 3-8 hetes kor között fordul elő [34]. Brojlercsirkék esetén a 2-6 hetes korosztály a leginkább érintett, ennek feltehetően az anyai antitestek számának csökkenése és az immunrendszer éretlensége az oka [31]. A NE klinikai formáját az elhullási arány hirtelen, gyakran előjelek nélküli megugrása jellemzi, akár 50%-os mortalitással. Lefolyása gyakran perakut. A szubklinikai forma esetén emésztési és felszívódási problémák miatt romlik a takarmányértékesítés és csökken a súlygyarapodás. Mivel utóbbi forma nyilvánvaló tünetek nélkül is jelen lehet az állományban, gyakran nem kezelik, így jelentős gazdasági károkat okoz [33]. Az elhalásos bélgyulladás tünetei a különböző madárfajokban hasonlóak: hasmenés, kiszáradás, depresszió, csökkent étvágy, aluszékonyság, gubbasztás [31]. Az elhalásos bélgyulladásban elhullott pulykák boncolása során megnagyobbodott, gázzal telt belek, a belek nyálkahártyáján nekrotikus elváltozásai

találhatók, amely főként a villusokat érinti, a kripták általában épek maradnak. Habár makroszkópos elváltozások leggyakrabban a vékonybélben láthatók, néhány esetben cholecystitist és hepatitist is megfigyeltek [34]. NE-ben elhullott brojlercsirkék boncolása során is hasonló elváltozások találhatók [33].

### **2.3. A *Clostridium perfringens* antimikrobiális érzékenysége**

A *C. perfringens* visszaszorítása érdekében korábban profilaktikus céllal, például takarmány-adalékként használtak antibiotikumokat és antimikrobiális növekedésserkentőket. Az antimikrobiális anyagok ilyen formában történő alkalmazásának tilalma a *C. perfringens* által okozott megbetegedések számának növekedéséhez vezetett, és így jelentős gazdasági károkat okozott [35]. A korábbi túlzott antibiotikumhasználat viszont az AMR elterjedéséhez járult hozzá. Az élelmiszermintákból izolált *C. perfringens* törzsek érzékenysége csökkent tetraciklinnel, eritromicinnel és linkomicinnel szemben [36]. A baromfiból izolált törzsek az esetek többségében nem rezisztensek amoxicillinre [37]. Belgiumban, 2002-ben gyűjtött, brojlercsirkék tápcsatornájából származó 44 törzs vizsgálata során Martel és mtsai. nem találtak amoxicillinre rezisztens törzset, a minimális gátló koncentráció (MIC) értékük mindegyik esetben kevesebb volt, mint 1 µg/ml [38]. Egyiptomban elhalásos bélgyulladást okozó 125 begyűjtött izolátumból 9 (7 %) bizonyult rezisztensnek amoxicillinre [39]. 2016-ban Delaware, Maryland és Indiana államban gyűjtött, brojlercsirkéből származó bélsármintákban, melyekből 230 törzset izoláltak, nem találtak amoxicillin-klavulánsavra rezisztens törzset [40]. 2010 és 2012 között Koreában begyűjtött, házityúkból, pulykából és vadmadarakból származó, valószínűleg elhalásos bélgyulladást okozó 17 törzs mindegyike érzékeny volt amoxicillin-klavulánsavra [37], viszont szintén Koreában begyűjtött, lovakból származó 25 törzsből 3 (12%) rezisztens volt amoxicillin-klavulánsavra [41]. Kínában baromfiból származó két, G toxintípusba tartozó törzs közül az egyik érzékeny, a másik mérsékelten érzékeny volt ceftriaxonra, metronidazolra pedig mindkettő rezisztens volt [35]. Iránban gyűjtött, humán bélsármintákból izolált 79 törzs közül, melyek MIC értéke 0,016-128 µg/ml között változott, mindössze 2 (2,53%) volt rezisztens ceftriaxonra. Ugyanez a kutatás az imipenemet kevésbé találta hatékonynak, 89 törzsből 30 (37,97%) rezisztensnek bizonyult, a MIC értékek 0,5-32 µg/ml között változtak [42]. Egy kínai tanulmányban viszont 57 izolátumból mindössze négyet (7,02%) találtak imipenemre rezisztensnek, és a rezisztencia az ételmérgezéses eseteknél nagyobb arányban fordult elő, mint hasmenéses tünetek esetén (15,38% és 4,55%) [43]. Vietnámban, sertéshúsból izolált 15 törzs közül 2 (13,33%) bizonyult rezisztensnek

imipenemmel szemben, míg a csirkehúsból izolált 8 törzs mindegyike érzékeny volt [44]. Az előbbi belgiumi tanulmány során nem találtak tilozinra rezisztens *C. perfringens* törzset, 1 µg/ml, illetve az alatti MIC értékeket mértek [38]. Egy későbbi, 2007-es belgiumi tanulmány során Gholamiandehkordi és mtsai. szintén érzékenynek találták tilozinra a brojlercsirkékből izolált törzsek mindegyikét [37]. Egy németországi, pulyka állományokon végzett kutatás során is az összes vizsgált törzs érzékeny volt tilozinra, enrofloxacinra és tetraciklinre, de linkomicinre, valamint béta-laktám antibiotikumokra, többek között amoxicillinre és penicillinre rezisztens *C. perfringens* törzset sem találtak. Viszont brojlercsirkék esetében egy egyiptomi kutatás során vizsgált 125 törzs mindegyike rezisztens volt linkomicinnel szemben [39]. Két belgiumi tanulmány is a törzsek többségét (61,5% és 63,3%) linkomicinre rezisztensnek találta. Brazíliában viszont 55, egészséges brojlercsirkékből származó törzs 3,6%-a volt linkomicinre rezisztens [37]. 2010-2011-ben Koreában, házityúkokból származó 61 törzsből 32 (52,5%), a 2012-2016 közötti időszakban 101 törzsből 30 (29,7%) volt rezisztens klindamicinre [45]. 2005 tavaszán a kanadai Ontario tartományban gyűjtött 50, pulykákból származó törzs mindegyike érzékeny volt klindamicinre és metronidazolra, a házityúkokból származó 100 törzsből 98 érzékeny volt klindamicinre, 99 pedig metronidazolra [46]. Két Kínából származó, bizonyítottan G toxintípusba tartozó vizsgált törzsből mindkettő rezisztensnek bizonyult metronidazollal szemben [35]. Iráni humán bélsármintákból izolált törzsek esetében 79 törzsből 9 (11,39%) volt rezisztens metronidazolra [42]. Egy múlt századi belgiumi tanulmány során, melyben sertésből, szarvasmarhából és házityúkból származó *C. perfringens* törzseket vizsgáltak, egyetlen ronidazolra rezisztens törzset sem találtak. Enrofloxacinra 2008 márciusa és 2009 márciusa között németországi pulyka állományokból gyűjtött 100 törzs 98%-a volt érzékeny [47]. Egy 2007-es belgiumi tanulmány során, amelyben 71 egészséges brojlercsirkékből származó törzset vizsgáltak, nem találtak enrofloxacinnal szembeni rezisztenciát [37]. Viszont egyiptomi brojlercsirkékből származó 125 törzsből 102 (82%) rezisztens volt enrofloxacinra, míg oxitetraciklinre 89 törzs (71%) volt rezisztens [39]. 2002-ben Belgiumban brojlercsirkékből izolált *C. perfringens* törzsek esetén az oxitetraciklin már kis koncentrációban is hatásos volt, de a 44 vizsgált törzs 66%-a rendelkezett rezisztenciával [38]. 1986 és 2002 között a skandináv országokban egészséges, valamint elhalásos bélgyulladásban vagy *C. perfringens* okozta hepatitisben szenvedő brojlercsirkékből, tojótúkokból és pulykákból gyűjtött 102, az akkor használt osztályozási rendszer alapján A toxintípusba sorolt törzs antibiotikum-érzékenységi vizsgálata alapján az oxitetraciklinnel szembeni rezisztencia a Svédországból származó törzsek esetén volt a

leggyakoribb, 76%. A Dániából származó törzsek 90%-a, míg a Norvégiából származó törzsek 79%-a érzékeny volt oxitettraciklinre. Vankomicinre származási helytől függetlenül mindegyik törzs érzékeny volt. A 102 vizsgált törzs közül 58 Svédországból, 24 Norvégiából, 20 Dániából származott [48]. Romániában 2022 július és szeptember között gyűjtött 100 sertés és borjú bélsármintából 14 *C. perfringens* törzset izoláltak, melyből 12 sertés és 2 borjú eredetű volt. Mindegyik törzs érzékeny volt vankomicinre, penicillinre viszont 9 törzs (64,2%) rezisztens volt [49]. Brazíliai brojlercsirkék tápcsatornájából izolált 55 törzs mindegyike érzékeny volt penicillinre, a MIC értékek egy törzs esetében sem haladták meg a 0,25 µg/ml-t [38]. Korábban említett tanulmányokban, melyekben Kanadából, házityúkokból és pulykákból származó, illetve Koreából, házityúkokból, pulykákból és vadmadaraktól származó mintákat vizsgáltak, szintén nem találtak penicillinre rezisztens *C. perfringens* törzset [37]. Az Amerikai Egyesült Államokban vizsgált 26, brojlercsirkékből származó törzs mindegyikének MIC értéke 1 és 4 µg/ml között alakult tilmikozin esetében, míg pulykákból származó 22 törzsből négynek 256 µg/ml volt a MIC értéke, a maradék 18 törzsnek pedig 2-4 µg/ml [50]. Kínában 67 brojlercsirke eredetű *C. perfringens* törzs többsége nem volt érzékeny tilmikozinra, 39 törzs esetében legalább 256 µg/ml -es MIC értéket mértek [51].

#### **2.4. Virulenciafaktorok, toxintermelés**

A *C. perfringens* fő virulencia faktorai a toxinok. A különböző törzsek több, mint 20 azonosított toxint termelhetnek [52]. Az egyes törzsek különböző toxinokat termelnek, így toxintermelésük alapján különböző típusokba sorolhatók. Azonos típusba tartozó törzsek általában azonos, a többi típustól eltérő betegségeket okoznak. Hagyományosan a négy major toxin termelése alapján öt típusba (A-E) sorolták a *C. perfringens* törzseket korábban. Ezek a major toxinok az alpha (CPA), a beta (CPB), az epsilon (ETX) és a iota (ITX) toxin [53]. Ezt az osztályozási rendszert azonban a közelmúltban felülvizsgálták, és további két típus (F és G) bevezetését javasolták, így hat tipizáló toxin termelése alapján hét típusba oszthatók ezek a baktériumok. Alpha toxint minden típus termel. Az „A” típusba tartozó baktériumok csak alpha-t, az alpha toxin mellett a „B” típus bétát és epsilon, a „C” típus bétát, a „D” típus epsilon, az „E” típus iota toxint, az „F” típus enterotoxint (CPE), a „G” típus NetB toxint termel a hat tipizáló toxin közül, illetve a „C”, „D” és „E” típusok képviselői is termelhetnek enterotoxint [29]. Az enterotoxint kódoló gén a kromoszómán, egy stabil régióban, a replikációs origó közelében található. Az alpha toxin egy 370 aminosavból álló, 43kDa méretű, hőstabil, letális, nekrozist, hemolízist és simaizom

összehúzódást okozó fehérje, melyet az „A” toxintípusba tartozó törzsek termelnek legnagyobb mennyiségben [54]. Ez a toxin nagymértékben felelős a gázgangréna kialakításáért [52]. Hatására csökken a neutrofil granulociták száma a perifériás keringésben, valamint gátolja azok felhalmozódását a fertőzött szövetben, így segítve a baktériumok túlélését [55]. Vasoconstrictor hatása révén csökkenti a szövetek vérellátottságát, ezzel a *C. perfringens* szaporodásának kedvező, oxigénben szegény környezetet hoz létre. Emellett a gazdaszervezet sejtjeiben gyulladásos kaszkádméchanizmusokat idéz elő, és így immunmediált szövetkárosodást okozhat [52]. A *C. perfringens* gazdaszervezetben való túlélése szempontjából fontos tulajdonsága, hogy CPA és perfringolysin-O (PFO) toxinok jelenlétében képes kijutni a makrofágok fagoszómáiból [56]. A CPA toxin egy  $\alpha$ -helikális szerkezetű, katalitikus N-terminális doménből és egy  $\beta$ -redő szerkezetű, membránkötő C-terminális doménből áll. Közöttük egy központi hurokdomén található [57]. A CPA a gazdaszervezet sejtjeinek membránjában levő Gi-típusú GTP-kötő fehérjék aktiválása, a szfingomielin és foszfatidil-kolin molekulák hidrolízise és a tropomiozin receptor kináz A-val történő interakció révén, különböző biokémiai reakciókon keresztül éri el az azt termelő baktérium számára kedvező környezet kialakító változásokat a gazdaszervezetben, mint az érösszehúzódás, vérlemezke-aggregáció, lizoszóma károsodás, apoptózis, reaktív oxigéngyökök képződése és interleukin-8 termelődés. Fontos megjegyezni, hogy a CPA a különböző sejttípusokban eltérő reakcióutakon keresztül eltérő hatásokat vált ki [58]. A CPB egy dermonekrotikus, enterotoxikus, citotoxikus, ödémát okozó toxin, mely 60 °C-os hőmérsékleten, valamint tripszin jelenlétében is inaktiválódik. A CPA-val ellentétben a beta toxin plazmidon kódolt [54]. Ez a 35 kDa méretű fehérjetoxin az endotélsejtekre, a trombocitákra és feltehetően a bélnyálkahártyát benépesítő limfocitákra is képes hatni. Amennyiben a nagy méretű CPB - feltehetően a bélnyálkahártya sérülése, alultápláltság, vagy mikrobiális aktivitás miatt, illetve valószínűleg egészséges újszülött állatokban is - átjut a hámsejtekből álló intestinalis barrieren, a lamina propriában az endotélsejtek membránjában található CD31 fehérjéhez kötődik, és pórusokat képez a sejtmembránon. Az endotélkárosodáshoz és a pórusképzéshez valószínűleg más membránalkotók is hozzájárulnak, például a P2X7 receptor [59]. CPB-vel összefüggő betegségek során a bélhámsejtek nekrozisa, a bélnyálkahártya kapillárisainak tágulata, majd trombózis és kiterjedt érhalálás következik be [60]. A szintén plazmidon kódolt beta-2 toxin (CPB2) egy 28 kDa méretű, citotoxikus fehérje, mely nem mutat jelentős hasonlóságot a major beta toxinnal [61]. Ezt a pórusképző toxint minden toxintípus termelheti, de legtöbbször az A típusban detektálták a *cpb2* gént. Szerepe a betegségek kialakításában nem teljesen tisztázott,

feltehetően a többi toxinnal szinergista hatása van a vérzéses és elhalásos bélgyulladás kialakításában [62]. Az epsilon toxin letális, dermonekrotikus, ödémát és simaizom összehúzódnást okoz [54]. A CPB-hez hasonlóan egy membránfehérjéhez (MAL) kötődik és pórusokat képez a célsejtek membránján [58]. A baktérium által termelt, azok plazmidján kódolt 33 kDa méretű protoxint intestinalis proteázok, például tripszin, kimotripszin, vagy a *C. perfringens* által termelt  $\lambda$ -toxin aktiválja [63]. Az aktivált epsilon toxin a *C. perfringens* által termelt legerősebb, a clostridiumok által termelt harmadik legerősebb toxin [58]. Az ETX az intestinalis barrier permeabilitását megnövelve könnyedén bejut a véráramba. Így eljuthat a célszervekhez, például az agyhoz, a tüdőhöz és a vesékhez. A legtöbb sejttípusra nézve nem toxikus. Magas letalitása valószínűleg az idegsejtek károsításának köszönhető, bár egyes szervekre gyakorolt hatása gyakran okoz hirtelen elhullást [63]. Az ETX hatása lehet emelkedett vérnyomás, nehézlégzés az alveoláris ödéma következtében, időszakos görcsök, eszméletvesztés, agyi ödéma, depresszió, ataxia, körözés és végül az állat elhullása. Epsilon toxin hatására a különböző állatfajokban eltérő tünetek jelentkezhetnek [64]. A letális, dermonekrotikus aktivitással bíró iota toxin 100 kDa méretű kötő (Ib) komponense tripszin vagy kimotripszin hatására aktiválódik. Az aktív forma 80 kDa méretű. A katalitikus (Ia) komponens szintén proteolitikus hasítás során aktiválódik [65]. Az Ia hőstabil, míg az Ib hőlabilis fehérje, melyeket két különböző gén kódol. Mindkét gén plazmidon található [54]. Az aktivált Ib a célsejtek membránján jelen levő LSR receptorhoz (Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor) kötődik, majd heptamerekbe rendeződve pórusokat képez a membránon. Az Ia az Ib hatására endocitózissal a sejtbe kerül, majd az endoszómából a citoplazmába jut, ahol az aktin filamentumokat depolimerizálja [65]. Ennek hatására a sejtek morfológiai változáson esnek át, lekerekednek. A fehérvérsejtek migrációja és aktiválódása akadályozottá válik [54], az egyrétegű bélsejtenyészetek permeabilitása megnövekszik ITX hatására [66], ugyanakkor a iota toxin szerepe a betegségek kialakításában nem teljesen tisztázott [58]. A CPE-nek fontos szerepe van a *C. perfringens* által okozott ételmérgezés és antibiotikumkezelés utáni hasmenés kialakításában [67]. A CPE által okozott hasmenés és hasi görcsök általában gyorsan, 1-2 nap alatt spontán elmúlnak, de bizonyos hajlamosító tényezők, például obstipatio fennállása esetén a mérgezés halálos kimenetelű is lehet [58]. A CPE egy 35 kDa méretű fehérje, melyet főként az F toxintípusba tartozó törzsek, a tápcsatornában történő sporuláció során termelnek [68]. A *cpe* gén a kromoszómán vagy plazmidon is elhelyezkedhet. A CPE tripszin, illetve kimotripszin általi proteolitikus hasítás során aktiválódik, majd az epithelialis és endothelialis sejtek membránján levő claudinokhoz kötődik, azokkal komplexet képez, majd oligomerizálódik és pórusokat képez a membránon,

így nagy számban juthatnak kalcium ionok a sejtbe. Ez koncentrációtól függően apoptózist, vagy nekrotikus sejthalált okozhat. Ez a toxin ember és több emlősfaj tápcsatornájában, elsősorban a vékonybélben okoz szövetkárosodást, például epithelialis necrosist, desquamatiot és villus rövidülést [67]. A plazmidon kódolt NetB toxin a madarak elhalásos bélgyulladásának kialakításában részt vevő legfontosabb virulenciafaktor [69]. A toxin *in vivo* hatása hasonló a G toxintípus által okozott betegség hatásaihoz, beleértve a szöveti nekrózist a duodenumban, jejunumban és a caecumban, valamint intestinalis vérzést is okozhat. Mivel ez a 33 kDa méretű, hemolízist okozó fehérje madarak sejtjeire nézve citotoxikus, emlős sejtekre nézve pedig nem, feltehetően egy, kizárólag a madarak sejtjeinek membránján jelen lévő fehérjéhez kötődik [70]. Ezt követően heptamerizálódik és pórusokat képez a sejtmembránon. Ez a sejt líziséhez vezethet azáltal, hogy lehetővé teszi nagy mennyiségű nátrium-ion, klorid-ion és kalcium-ion sejtbe áramlását [58].

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás célja, hogy Magyarország nagylétszámú pulyka állományából izolált kommenzalista *Clostridium perfringens* törzseinek antibiotikum érzékenységi profilját, az állat- és közegészségügy számára fontos hatóanyagokra nézve felmérjük. A minimális gátló koncentráció értékek meghatározását követően elkészítettük az így kapott eredmények gyakorisági táblázatát, célul tűztük ki, hogy hatóanyagokként kiszámoljuk a MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékeket, továbbá, hogy összehasonlítsuk eredményeinket a klinikai töréspontokkal, továbbá *epidemiological cut off value* (ECOFF) értékekkel. Ezzel párhuzamosan PCR vizsgálat segítségével az egyes törzsek major és minor toxintermelésért felelős génjeinek a jelenlétét is vizsgáltuk, az eredmények tükrében pedig vizsgáltuk az esetleges összefüggéseket a toxintermelésért felelős gének jelenléte és a törzsek rezisztencia profilja között.

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. A minták eredete

A mintagyűjtés 2022. február és 2023. június között magyarországi nagylétszámú baromfitelepeken zajlott. Az egészséges állatokból származó minták egyedi azonosítószámmal lettek ellátva és nyilvántartásba vettük velük kapcsolatban, hogy melyik településről, megyéből, régióból és milyen szervből (légső vagy kloáka) származtak, valamint az állomány hasznosítási típusát (hús, tojás, tenyész), életkorát (növendék, felnőtt), illetve az állomány nagyságát (1-1000, 1001-5000, 5001-50000, 50001-100000, >100001). Ezen kívül kérdőív kitöltésével felmértük a telepek antibiotikum használati szokásait (mit, hogyan, milyen kórokozó esetén), az előforduló betegségeket, valamint az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat.

### 4.2. A törzsek izolálása

Telepenként a 15 db légső és 15 db kloáka mintát Amies-típusú (Biolab Zrt., Budapest, Magyarország), szén nélküli, normál alumínium pálcás mintavevő pálca segítségével gyűjtöttük. *Clostridium perfringens* esetén CHROMagar™ C. perfringens (Chebio Fejlesztő Kft., Budapest, Magyarország) szelektív agart használtunk, az anaerob tenyésztéshez és vizsgálatokhoz pedig BD GasPak™ rendszert (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország) használtunk. Végül az izolált telepeket Trypton-szója agarra (Biolab Zrt., Budapest, Magyarország) oltottuk át és újabb 18-24 órás 41 °C-on inkubálás után felhasználásig -80 °C-on fagyasztottuk le a színtenyészeteket Microbank™ rendszerben (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada).

### 4.3. A hatóanyag törzsoldatok elkészítése

A vizsgálathoz szükséges hatóanyagokból a (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) törzsoldatokat a CLSI ajánlása szerint készítettük. [71]. Az amoxicillin és amoxicillin-klavulánsavat 2:1 arány (pH 7,2, 0,01 mol/l), a penicillint és az imipenemet (pH 6, 0,1 mol/l) foszfát pufferoldatban oldottuk fel, a ronidazolt és a metronidazolt DMSO-ban. A ceftriaxon, tilozin, tilmikozin, linkomicin, klindamicin, oxitetracliklin és vankomicin esetén desztillált vizet használtunk. Az enrofloxacinat pár csepp 1 mol/l NaOH-oldattal desztillált vízben készítettük el. A vizsgálatokhoz 1024 µg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, az egyes hatóanyagok gyártó által meghatározott tisztaságára korrigálva.

#### 4.4. A minimális gátló koncentráció meghatározása

Az AMR fenotípusos kifejeződésének vizsgálatát az egyes baktériumtörzsek MIC értékének meghatározásával, a CLSI módszertanával végeztük az ECOFF vizsgálat fejezetben leírt ajánlásokat figyelembe véve [71], a breakpointokat a CLSI és az EUCAST irányelvei alapján határoztuk meg. Az ECOFF vizsgálatához ún. teljes range vizsgálatot végeztünk, ehhez 512-0,001 µg/ml közötti kettes alapú hígítási sort készítettünk.

A vizsgálat előtti napon az addig -80 °C-on tárolt baktériumtörzseket 3 ml Müller-Hinton levesbe (MHB) oltottuk. Ezt 18-24 órán át tartó inkubálás követte 37 °C-on. 96 lyukú mikrotiter lemez (VWR International, LLC., Debrecen, Magyarország) segítségével végeztük a vizsgálatokat. A munkalemezek első oszlopát kivéve a lyukakat 90 µl MHB-vel (1. lépés) töltöttük fel (**1. ábra**). Majd elkészítettük a hatóanyag törzsoldatok kettes alapú hígítását MHB-vel, így minden esetben 512 µg/ml koncentrációval indítottuk a hígítási sort, a teljes range vizsgálatot a hígítási sor második munkalemezen történő folytatásával fedtük le. A feles hígításból 180 µl-t mértünk a munkalemez első oszlopába (2. lépés), majd 2-es alapú hígítási sort készítettünk belőle (3. lépés). A második munkalemez 10. oszlopa után a felesleget pipettaheggyel eldobtuk, ezzel minden oszlopban 90 µl térfogatot alakítottunk ki. Minden baktériumtörzs vizsgálatához egy sort használtunk a munkalemezen (**2. ábra**).

##### 1. lépés: feltöltés

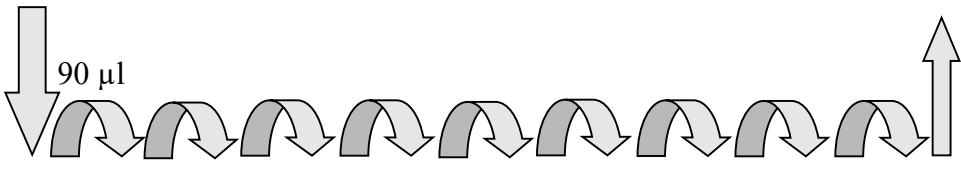
↓ 90 µl

|   | 2x | 4x | 8x | 16x | 32x | 64x | 128x | 256x | 512x | 1024x |    |    |
|---|----|----|----|-----|-----|-----|------|------|------|-------|----|----|
|   | 1  | 2  | 3  | 4   | 5   | 6   | 7    | 8    | 9    | 10    | 11 | 12 |
| A |    | 90 | 90 | 90  | 90  | 90  | 90   | 90   | 90   | 90    | +  | -  |
| B |    | 90 | 90 | 90  | 90  | 90  | 90   | 90   | 90   | 90    | +  | -  |
| C |    | 90 | 90 | 90  | 90  | 90  | 90   | 90   | 90   | 90    | +  | -  |
| D |    | 90 | 90 | 90  | 90  | 90  | 90   | 90   | 90   | 90    | +  | -  |
| E |    | 90 | 90 | 90  | 90  | 90  | 90   | 90   | 90   | 90    | +  | -  |
| F |    | 90 | 90 | 90  | 90  | 90  | 90   | 90   | 90   | 90    | +  | -  |
| G |    | 90 | 90 | 90  | 90  | 90  | 90   | 90   | 90   | 90    | +  | -  |
| H |    | 90 | 90 | 90  | 90  | 90  | 90   | 90   | 90   | 90    | +  | -  |

1. ábra A lemezek feltöltése 90 µl MHB-vel

**2. lépés: bemérés**    **3. lépés: hígítási sor készítése**

90 µl feleslegben kidob



|          | 1   | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 |
|----------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| <b>A</b> | 180 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | +  | -  |
| <b>B</b> | 180 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | +  | -  |
| <b>C</b> | 180 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | +  | -  |
| <b>D</b> | 180 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | +  | -  |
| <b>E</b> | 180 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | +  | -  |
| <b>F</b> | 180 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | +  | -  |
| <b>G</b> | 180 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | +  | -  |
| <b>H</b> | 180 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | 90 | +  | -  |

**2. ábra** Kettes alapú hígítási sor készítése, az első oszlop feltöltése 180 µl kiindulási koncentrációval, majd 90 µl tovább mérése és szuszpendálása a 10. oszlopig

A baktériumok ráoltásához szükséges baktériumszuspenziót 0,5 McFarland értékre beállítva egy segédlemezen készítettük elő. Ehhez minden segédlemezt 240 µl MHB-vel töltöttünk fel (**3. ábra**), majd minden lyukba 10 µl alaposan vortexelt baktériumszuspenziót mértünk (4. lépés). Ezt követően a baktériumtörzseket az elkészített munkalemezre oltottuk, a kettes alapú hígítási sort tartalmazó lemezek 11. oszlopától kezdve haladtunk visszafelé 10 µl baktériumszuspenziót pipetázva a segédlemezről (5. lépés). A baktériumszót és levest tartalmazó 11. oszlop pozitív kontrollként, a levest tartalmazó 12. oszlop negatív kontrollként szolgált (**4. ábra**).

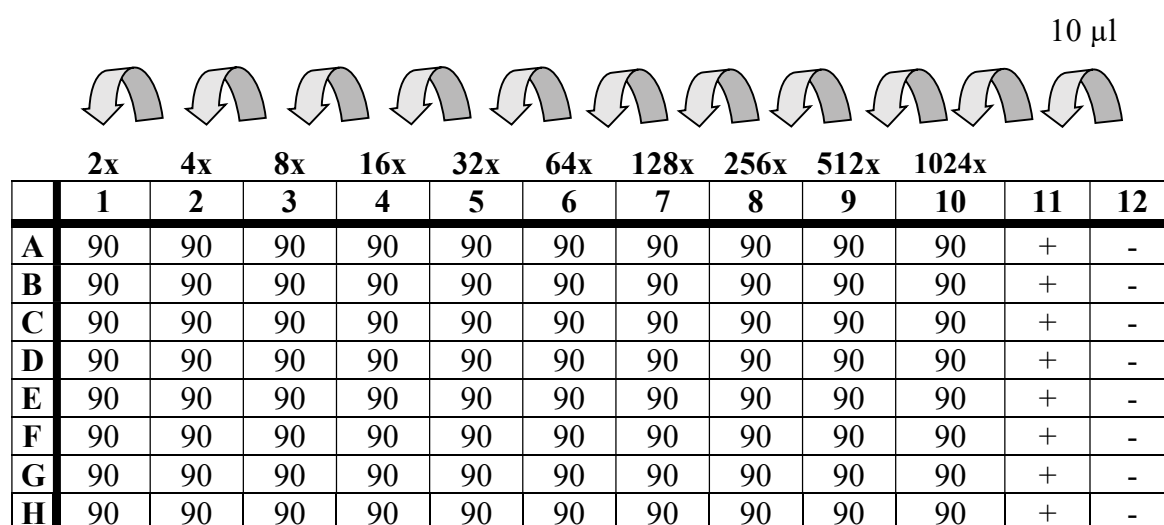
**4. lépés: a baktériumszuspenzió 0,5 McFarland értékkel**



|          | 1   | 2 | 3   | 4 | 5   | 6 | 7   | 8 | 9   | 10 | 11  | 12 |
|----------|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|----|-----|----|
| <b>A</b> | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |    | 240 |    |
| <b>B</b> | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |    | 240 |    |
| <b>C</b> | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |    | 240 |    |
| <b>D</b> | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |    | 240 |    |
| <b>E</b> | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |    | 240 |    |
| <b>F</b> | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |    | 240 |    |
| <b>G</b> | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |    | 240 |    |
| <b>H</b> | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |   | 240 |    | 240 |    |

**3. ábra** A baktériumszuspenzió 25x hígításának elkészítése segédlemezen

## 5. lépés: a baktériumszuszpenzió bemérése



4. ábra A baktériumszuszpenzió rámerése a munkalemezre a pozitív kontrolltól kezdve

Végül a munkalemezeket 18-24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd a MIC értékeket a pozitív (11. oszlop) kontrollhoz viszonyítva vizuálisan bíráltuk el. Az értékelés során a – (nincs zavarosodás) és ± (nehezen megítélhető) jelöléssel ellátott lyukak negatív eredménynek minősültek, míg pozitív eredménynek a + (enyhe zavarosodás), ++ (mérsékelt zavarosodás), +++ (jelentős zavarosodás) jelöléssel ellátott lyukakat tekintettük.

### 4.5. Az ECOFF érték meghatározása

Az ECOFF értékeket az ECOFFinder [72] segítségével határoztuk meg. A vad típusú populációra vonatkozó specificitás növelése érdekében a 99%-os küszöbértéket választottuk, ami az a MIC-érték, amely a modellezett vad típusú populáció 99%-át lefedi.

Ennek során a kapott MIC értékekből gyakorisági táblázatot készítettünk a vizsgált hatóanyag koncentráció tartományban (1024-0,001 µg/ml). Az adatbevitel során meg kellett adni a vizsgált antibiotikum hatóanyag nevét, baktérium faj nevét. Ezen kívül jelölni szükséges, ha a vizsgált adatok egynél több MIC eloszlásból származtak, valamint a megfigyelések teljes számát is jelölni kell. Az elemzés során meg kell adni egy ún. Nest kiindulási értéket, melynek közel kell lennie az izolátumok számához, azonban nem egyezhet meg azzal. Ezt követően a template Solver makróját futtatva megkapjuk a megfigyelt értékekhez tartozó legjobb illeszkedést leválogató részhalmazt, majd a program a megfigyelt számok és az illesztett görbe alapján becsült számok különbségeként megadja a reziduumokat. Abban az esetben, ha a reziduumok a középen található nullát jelölő vonal mindkét oldalán szóródnak, lehet hinni a kiválasztott részhalmaznak. Végül a becsült értékek illeszkedését az adatokhoz a program grafikusan ábrázolja.

#### 4.6. A PCR vizsgálatok

A polimeráz láncreakció segítségével az egyes törzsek major és minor toxintermelésért felelős génkészletének feltérképezést végeztük el. A DNS kivonását a baktérium-szuszpenzióból a Zymo Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, Murphy Ave., Irvine, CA, USA) segítségével, a gyártó utasítása szerint végeztük. A bakteriális örökítőanyag kiszabadításához szükséges gyöngyös rázathoz Qiagen TissueLyzer LT (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) készüléket használtunk, 50 Hz-en, 5 percig. A PCR vizsgálatához Kylv Clostridium perfringens, DNS real-time PCR vizsgálatához alkalmas Kit-et használtunk (Kylv, Höltinghausen, Németország). A rendszer major (alfa, béta, epsilon, iota) és minor (b2, entero, netB) toxin gének kimutatására szolgál, madaraktól származó minták esetén. A felhasználás során a gyártó utasításait követtük. A kivont nukleinsav tárolása felhasználásig -20°C-on történt.

A PCR vizsgálatokat CFX Opus Dx Real-Time PCR (Bio-Rad Hungary Ltd., Budapest, Magyarország) segítségével végeztük el. Az eredményeket a Bio-Rad CFX Maestro szoftver 5.3.022.1030 verziójának (Bio-Rad Hungary Ltd., Budapest, Magyarország) segítségével értékeltük ki.

## 5. EREDMÉNYEK

Összesen 146 pulyka eredetű *Clostridium perfringens* törzs vizsgálatát végeztük el. Meghatároztuk 14-féle állat- és közegészségügyi jelentőséggel bíró antibiotikum hatóanyagra a MIC-értékeket, amelyek közül 6 esetén rendelkezésre állt a szakirodalomban leírt klinikai töréspont (**1. táblázat**), 8 esetén viszont nem (**2. táblázat**). A gyakorisági táblázatokban feltüntettük a MIC-értékek előfordulásának gyakoriságát, valamint azok százalékos arányát, továbbá kiszámoltuk a vizsgált populáció MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékét a vizsgált hatóanyagok esetében. A klinikai törésponttal rendelkező hatóanyagok közül a kiszámolt MIC<sub>50</sub> és a MIC<sub>90</sub> érték is a klinikai töréspont alatt volt imipenem hatóanyag esetében, azonban csak a MIC<sub>50</sub> érték volt a klinikai töréspont alatt amoxicillin és klindamicin hatóanyagok esetében. Hivatalos ECOFF-érték kizárólag klindamicin hatóanyagra állt rendelkezésünkre (0,125 µg/ml), azonban a MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékek jóval ez felett voltak. Azoknál a hatóanyagoknál, ahol a MIC-értékek bimodális eloszlást mutattak, lehetőségünk volt ún. próbaképpen ECOFF-értéket számolnunk, amoxicillin esetén az így kapott érték egybevágott a klinikai törésponttal (16 µg/ml), penicillin esetén viszont jóval nagyobb értéket kaptunk a klinikai törésponthoz képest, ami magyarázható az alacsony mintaelemszámmal.

Azoknál a hatóanyagoknál, amelyek esetén nem állt rendelkezésre klinikai töréspont és bimodális eloszlást mutattak, szintén meghatároztuk próbaképpen az ECOFF-értéket. Amoxicillin-klavulánsav esetén az így kapott érték (32 µg/ml) alatt volt mind a kiszámolt MIC<sub>50</sub> és a MIC<sub>90</sub> érték is. Tilozin esetén viszont (16 µg/ml) már csak a MIC<sub>50</sub> érték volt a kapott érték alatt.

**1. táblázat** A pulyka eredetű *Clostridium perfringens* törzsek (n=146) törésponttal rendelkező hatóanyagok vizsgálata során kapott minimális gátló koncentráció (MIC) értékeinek gyakorisági táblázata. Minden egyes hatóanyag felső sorában a darabszám, alsó sorában pedig annak százalékos aránya látható. A piros függőleges vonalak a klinikai töréspontokat jelölik.

| Antibiotikum | <sup>1</sup> BP* | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,008 | 0,016 | 0,03  | 0,06 | 0,125 | 0,25  | 0,5   | 1     | 2     | 4    | 8     | 16    | 32    | 64    | 128  | 256  | 512  | 1024 | MIC <sub>50</sub> | MIC <sub>90</sub> | <sup>2</sup> ECOFF | <sup>3</sup> S |
|--------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|
|              |                  | µg/ml |       |       |       |       |       |      |       |       |       |       |       |      |       |       |       |       |      |      |      |      |                   |                   |                    |                |
| Amoxicillin  | 16               | 1     | 0     | 5     | 6     | 9     | 6     | 8    | 19    | 18    | 26    | 15    | 12    | 3    | 0     | 0     | 18    |       |      |      |      |      | 0,5               | 32                | -                  | 16             |
|              |                  | 0,7%  | 0,0%  | 3,4%  | 4,1%  | 6,2%  | 4,1%  | 5,5% | 13,0% | 12,3% | 17,8% | 10,3% | 8,2%  | 2,1% | 0,0%  | 0,0%  | 12,3% |       |      |      |      |      |                   |                   |                    |                |
| Imipenem     | 16               | 4     | 0     | 0     | 3     | 5     | 21    | 10   | 14    | 13    | 16    | 10    | 18    | 3    | 21    | 8     |       |       |      |      |      | 0,5  | 8                 | -                 | -                  |                |
|              |                  | 2,7%  | 0,0%  | 0,0%  | 2,1%  | 3,4%  | 14,4% | 6,8% | 9,6%  | 8,9%  | 11,0% | 6,8%  | 12,3% | 2,1% | 14,5% | 5,5%  |       |       |      |      |      |      |                   |                   |                    |                |
| Linkomicin   | 1                |       |       |       | 3     | 0     | 0     | 0    | 2     | 1     | 11    | 5     | 32    | 11   | 6     | 8     | 10    | 46    | 2    | 0    | 4    | 5    | 16                | 64                | -                  | -              |
|              |                  |       |       |       | 2,1%  | 0,0%  | 0,0%  | 0,0% | 1,4%  | 0,7%  | 7,5%  | 3,4%  | 21,9% | 7,5% | 4,1%  | 5,5%  | 6,8%  | 31,5% | 1,4% | 0,0% | 2,7% | 3,4% |                   |                   |                    |                |
| Enrofloxacin | 2                |       |       |       |       | 1     | 0     | 0    | 6     | 14    | 15    | 28    | 23    | 9    | 12    | 38    |       |       |      |      |      | 2    | 16                | -                 | -                  |                |
|              |                  |       |       |       |       | 0,7%  | 0,0%  | 0,0% | 4,1%  | 9,6%  | 10,3% | 19,2% | 15,8% | 6,2% | 8,2%  | 26,0% |       |       |      |      |      |      |                   |                   |                    |                |
| Penicillin   | 1                |       |       |       | 1     | 3     | 5     | 4    | 6     | 20    | 26    | 28    | 18    | 8    | 5     | 2     | 13    | 0     | 1    | 3    | 3    |      | 1                 | 32                | -                  | 16             |
|              |                  |       |       |       | 0,7%  | 2,1%  | 3,4%  | 2,7% | 4,1%  | 13,7% | 17,8% | 19,2% | 12,3% | 5,5% | 3,4%  | 1,4%  | 8,9%  | 0,0%  | 0,7% | 2,1% | 2,1% |      |                   |                   |                    |                |
| Klindamicin  | 8                |       |       | 1     | 16    | 1     | 3     | 12   | 8     | 12    | 8     | 5     | 15    | 4    | 5     | 6     | 39    | 1     | 2    | 1    | 6    | 1    | 2                 | 32                | 0,125              | -              |
|              |                  |       |       | 0,7%  | 11,0% | 0,7%  | 2,1%  | 8,2% | 5,5%  | 8,2%  | 5,5%  | 3,4%  | 10,3% | 2,7% | 3,4%  | 4,1%  | 26,7% | 0,7%  | 1,4% | 0,7% | 4,1% | 0,7% |                   |                   |                    |                |

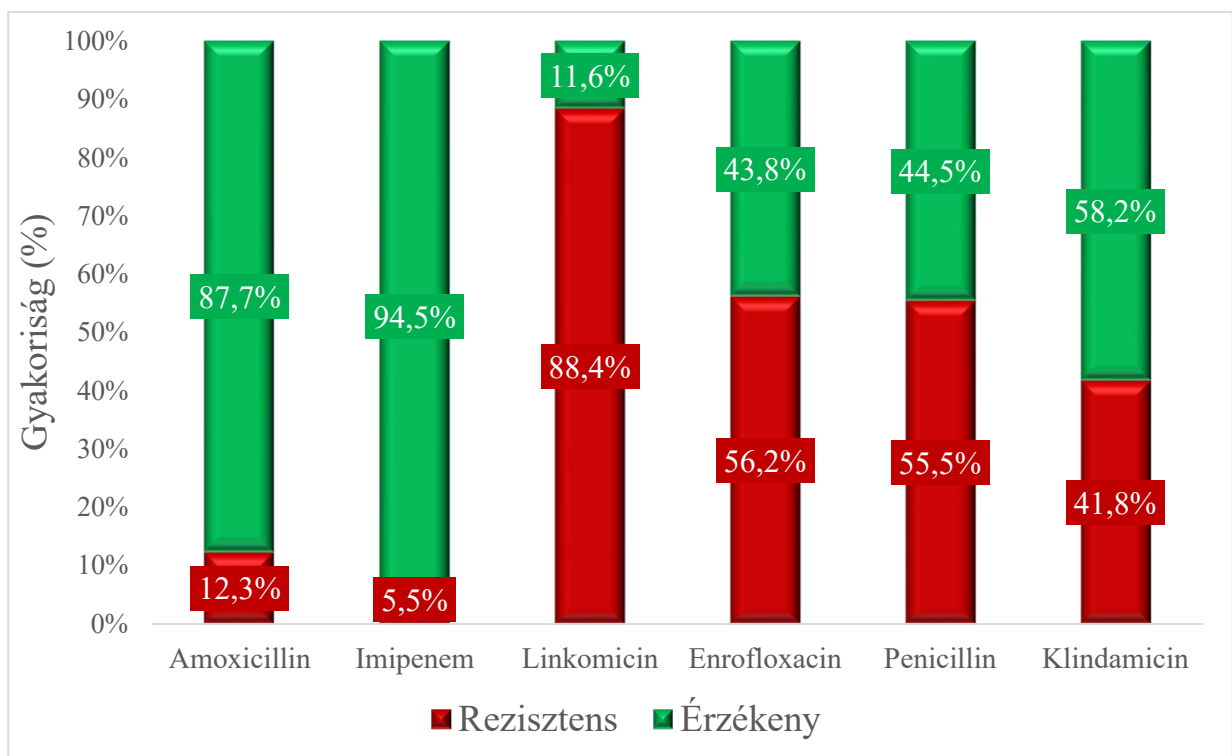
\*BP – töréspont; <sup>1</sup>CLSI; <sup>2</sup>EUCAST; <sup>3</sup>saját kísérletes ECOFF-érték

**2. táblázat** A pulyka eredetű *Clostridium perfringens* törzsek (n=146) törésponttal nem rendelkező hatóanyagok vizsgálata során kapott minimális gátló koncentráció (MIC) értékeinek gyakorisági táblázata. Minden egyes hatóanyag felső sorában a darabszám, alsó sorában pedig annak százalékos aránya látható.

| Antibiotikum                | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,008 | 0,016 | 0,03 | 0,06 | 0,125 | 0,25 | 0,5   | 1     | 2     | 4     | 8     | 16    | 32    | 64    | 128  | 256  | 512   | 1024 | MIC <sub>50</sub> | MIC <sub>90</sub> | <sup>2</sup> ECOFF | <sup>3</sup> S |   |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|-------|------|-------------------|-------------------|--------------------|----------------|---|
|                             | µg/ml |       |       |       |       |      |      |       |      |       |       |       |       |       |       |       |       |      |      |       |      |                   |                   |                    |                |   |
| Amoxicillin-<br>klavulánsav | 1     | 1     | 1     | 9     | 9     | 6    | 13   | 17    | 13   | 30    | 13    | 12    | 5     | 2     | 3     | 11    |       |      |      |       |      | 0,5               | 8                 | -                  | 32             |   |
|                             | 0,7%  | 0,7%  | 0,7%  | 6,2%  | 6,2%  | 4,1% | 8,9% | 11,6% | 8,9% | 20,5% | 8,9%  | 8,2%  | 3,4%  | 1,4%  | 2,1%  | 7,5%  |       |      |      |       |      |                   |                   |                    |                |   |
| Ceftriaxon                  | 1     | 4     | 2     | 5     | 2     | 10   | 8    | 6     | 11   | 17    | 24    | 11    | 9     | 6     | 18    | 4     | 2     | 2    | 4    |       |      | 1                 | 16                | -                  | -              |   |
|                             | 0,7%  | 2,7%  | 1,4%  | 3,4%  | 1,4%  | 6,8% | 5,5% | 4,1%  | 7,5% | 11,6% | 16,4% | 7,5%  | 6,2%  | 4,1%  | 12,3% | 2,7%  | 1,4%  | 1,4% | 2,7% |       |      |                   |                   |                    |                |   |
| Tilozin                     |       |       |       | 3     | 3     | 9    | 9    | 31    | 8    | 5     | 21    | 15    | 4     | 2     | 2     | 2     | 26    | 0    | 0    | 1     | 5    | 1                 | 64                | -                  | 16             |   |
|                             |       |       |       | 2,1%  | 2,1%  | 6,2% | 6,2% | 21,2% | 5,5% | 3,4%  | 14,4% | 10,3% | 2,7%  | 1,4%  | 1,4%  | 1,4%  | 17,8% | 0,0% | 0,0% | 0,7%  | 3,4% |                   |                   |                    |                |   |
| Vankomicin                  |       |       |       | 1     | 1     | 0    | 1    | 20    | 6    | 13    | 33    | 7     | 4     | 5     | 3     | 39    | 0     | 0    | 3    | 10    |      |                   | 1                 | 32                 | -              | - |
|                             |       |       |       | 0,7%  | 0,7%  | 0,0% | 0,7% | 13,7% | 4,1% | 8,9%  | 22,6% | 4,8%  | 2,7%  | 3,4%  | 2,1%  | 26,7% | 0,0%  | 0,0% | 2,1% | 6,8%  |      |                   |                   |                    |                |   |
| Oxitetraciklin              |       |       |       |       |       | 3    | 4    | 6     | 0    | 3     | 10    | 6     | 21    | 15    | 12    | 52    | 0     | 2    | 6    | 5     | 1    | 16                | 32                | -                  | -              |   |
|                             |       |       |       |       |       | 2,1% | 2,7% | 4,1%  | 0,0% | 2,1%  | 6,8%  | 4,1%  | 14,4% | 10,3% | 8,2%  | 35,6% | 0,0%  | 1,4% | 4,1% | 3,4%  | 0,7% |                   |                   |                    |                |   |
| Tilmikozin                  | 2     | 0     | 1     | 0     | 1     | 2    | 2    | 7     | 5    | 7     | 13    | 11    | 4     | 14    | 16    | 18    | 34    | 0    | 2    | 2     | 5    | 16                | 64                | -                  | -              |   |
|                             | 1,4%  | 0,0%  | 0,7%  | 0,0%  | 0,7%  | 1,4% | 1,4% | 4,8%  | 3,4% | 4,8%  | 8,9%  | 7,5%  | 2,7%  | 9,6%  | 11,0% | 12,3% | 23,3% | 0,0% | 1,4% | 1,4%  | 3,4% |                   |                   |                    |                |   |
| Ronidazol                   |       |       |       |       | 1     | 1    | 1    | 4     | 7    | 16    | 11    | 19    | 0     | 0     | 1     | 58    | 3     | 4    | 7    | 12    | 1    | 32                | 256               | -                  | -              |   |
|                             |       |       |       |       | 0,7%  | 0,7% | 0,7% | 2,7%  | 4,8% | 11,0% | 7,5%  | 13,0% | 0,0%  | 0,0%  | 0,7%  | 39,7% | 2,1%  | 2,7% | 4,8% | 8,2%  | 0,7% |                   |                   |                    |                |   |
| Metronidazol                |       |       |       | 1     | 0     | 0    | 3    | 5     | 2    | 9     | 12    | 5     | 0     | 5     | 6     | 61    | 0     | 2    | 12   | 20    | 3    | 32                | 512               | -                  | -              |   |
|                             |       |       |       | 0,7%  | 0,0%  | 0,0% | 2,1% | 3,4%  | 1,4% | 6,2%  | 8,2%  | 3,4%  | 0,0%  | 3,4%  | 4,1%  | 41,8% | 0,0%  | 1,4% | 8,2% | 13,7% | 2,1% |                   |                   |                    |                |   |

\*BP – töréspont; <sup>1</sup>CLSI; <sup>2</sup>EUCAST; <sup>3</sup>saját kísérletes ECOFF-érték

Azoknál a hatóanyagoknál, amelyek esetén rendelkezésre állt klinikai töréspont, meghatároztuk a vizsgált populáció fenotípusos klinikai érzékenységét (5. ábra). A törzsek jelentős része megőrizte érzékenységét a *Clostridium perfringens* törzsek okozta fertőzések kezelésében egyik elsődlegesen választandó hatóanyaggal, az amoxicillinnel szemben (87,7%), azonban penicillinnel szemben jelentős mértékben csökkent az érzékenységük (44,5%). A humán multirezisztens fertőzések kezelésében kiemelten fontos hatóanyag, az imipenem 94,5%-os hatékonyságot mutatott. A legnagyobb mértékű rezisztenciát linkomicin hatóanyaggal szemben mutattuk ki, itt mindössze a törzsek 11,6%-a mutatott érzékenységet.



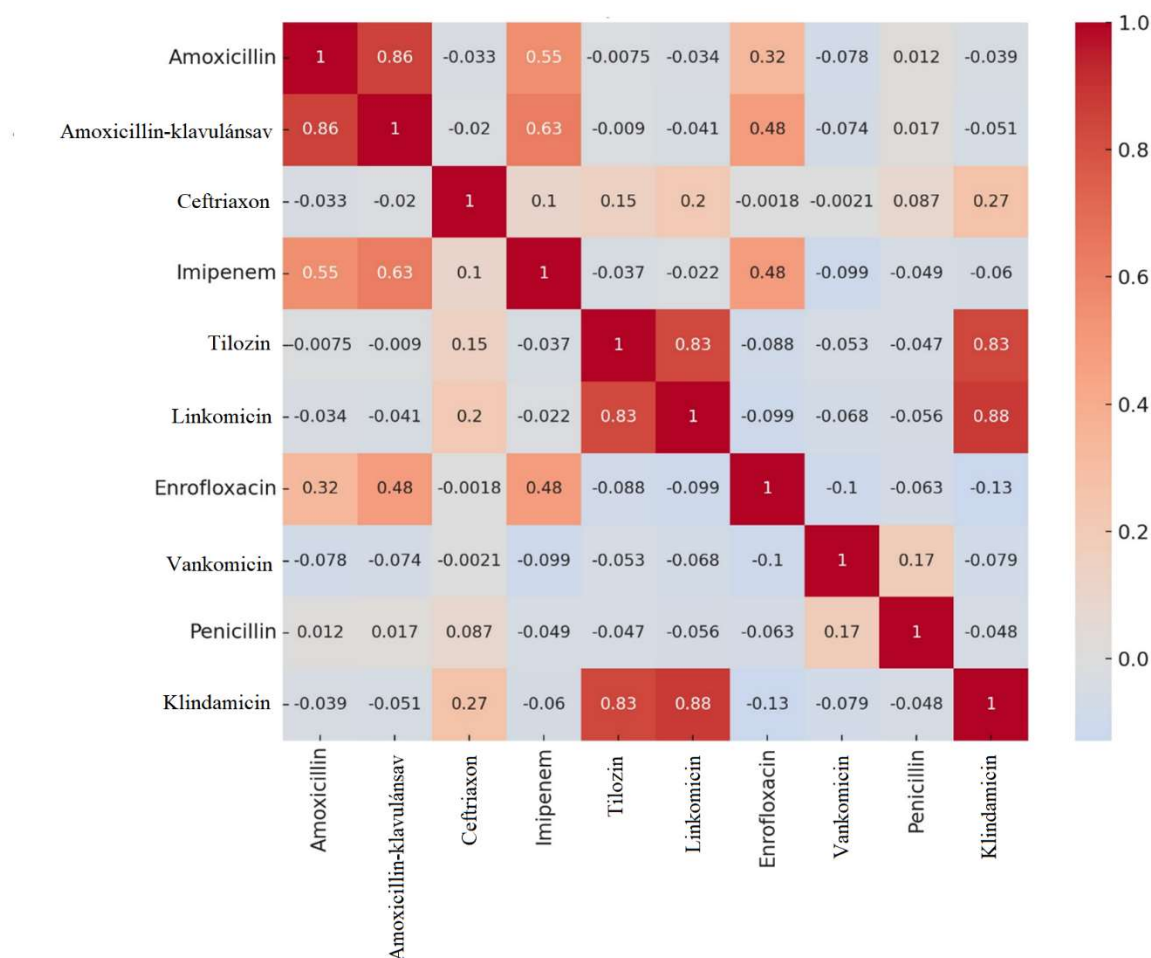
5. ábra A pulyka eredetű *Clostridium perfringens* törzsek (n=146) klinikai törésponttal rendelkező hatóanyagokkal szembeni érzékenységi profilja.

Elvégeztük a törzsek PCR vizsgálatát major és minor toxintermelésért felelős gének azonosítása céljából. Az összes vizsgált törzs pozitív lett major alpha toxintermelésért felelős génre, amit alaptól minden *Clostridium perfringens* törzs hordoz, ez egyben egy önellenőrzésként is szolgált, hogy a vizsgált törzsek mindegyike *Clostridium perfringens* volt. A törzsek 23,9%-a lett pozitív major béta toxintermelésért felelős génre, 2,7%-a major epszilon toxintermelésért felelős génre, 15,8%-a minor beta2 toxintermelésért felelős génre és 3,4%-a minor netB toxintermelésért felelős génre. Major iota és minor entero toxintermelésért felelős gént nem azonosítottunk. Amennyiben azt vizsgáltuk, hogy

egyszerre hány esetben fordul elő több gén egy-egy törzsben, akkor azt tapasztaltuk, hogy a legtöbb gén (major béta, epszilon, minor beta2, minor netB) egy esetben fordult elő. A major beta, minor beta2 és minor netB gének egyidejűleg 4 törzs esetében; a major beta, major epszilon és minor beta2 gének 3 esetben; a major beta és minor beta2 gének egyidejűleg 10 esetben; a major beta és major epszilon gének egyidejűleg 1 esetben fordultak elő.

Vizsgáltuk annak a lehetőségét is, hogy az egyes toxintermelésért felelős gének jelenléte és a hatóanyagokként alakuló MIC-értékek között van-e bármiféle összefüggés. Szignifikáns különbséget azonban nem találtunk egy hatóanyag esetében sem a MIC-értékek és a toxintermelésért felelős gének jelenléte között ahhoz képest, amikor ezek a gének nincsenek jelen.

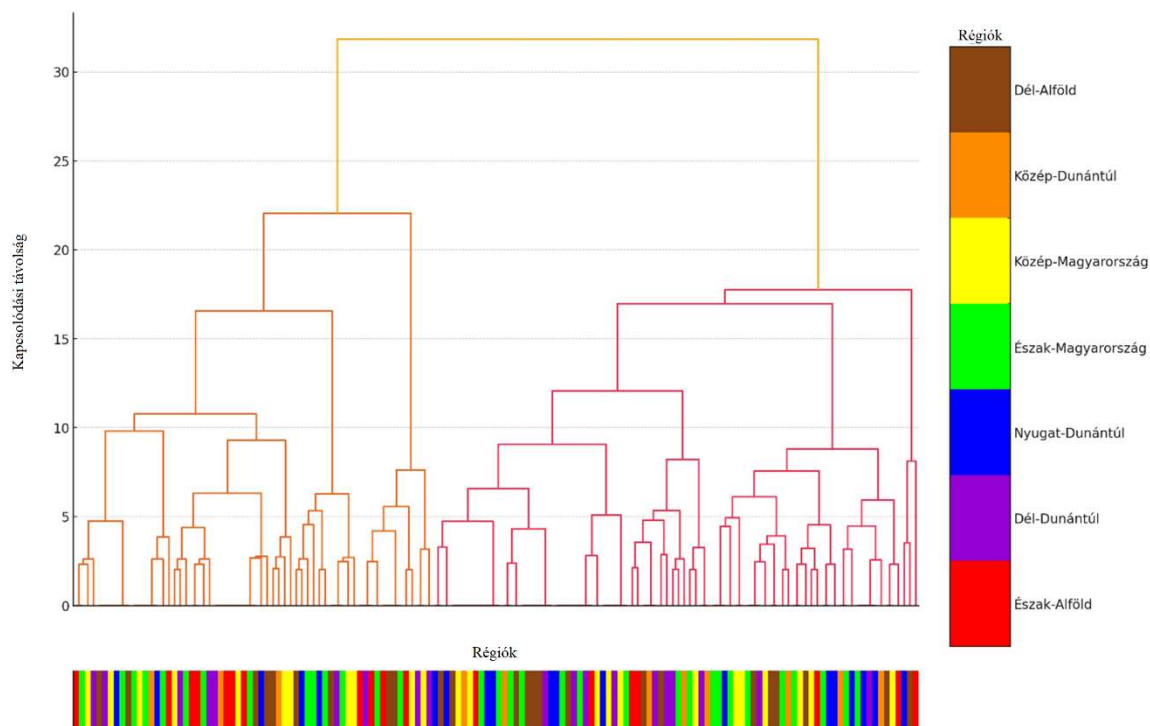
Korrelációs vizsgálatot végeztük az egyes hatóanyagok esetén kapott, a MIC-értékek alapján rezisztensnek bizonyult törzsek arányai között, aminek eredményeit hő térképen ábrázoltuk (6. ábra).



**6. ábra** A pulykából izolált kommenzalista *Clostridium perfringens* (n=146) törzsek hatóanyagokénti rezisztencia arányának korrelációs vizsgálta és hő térkép segítségével történő ábrázolása.

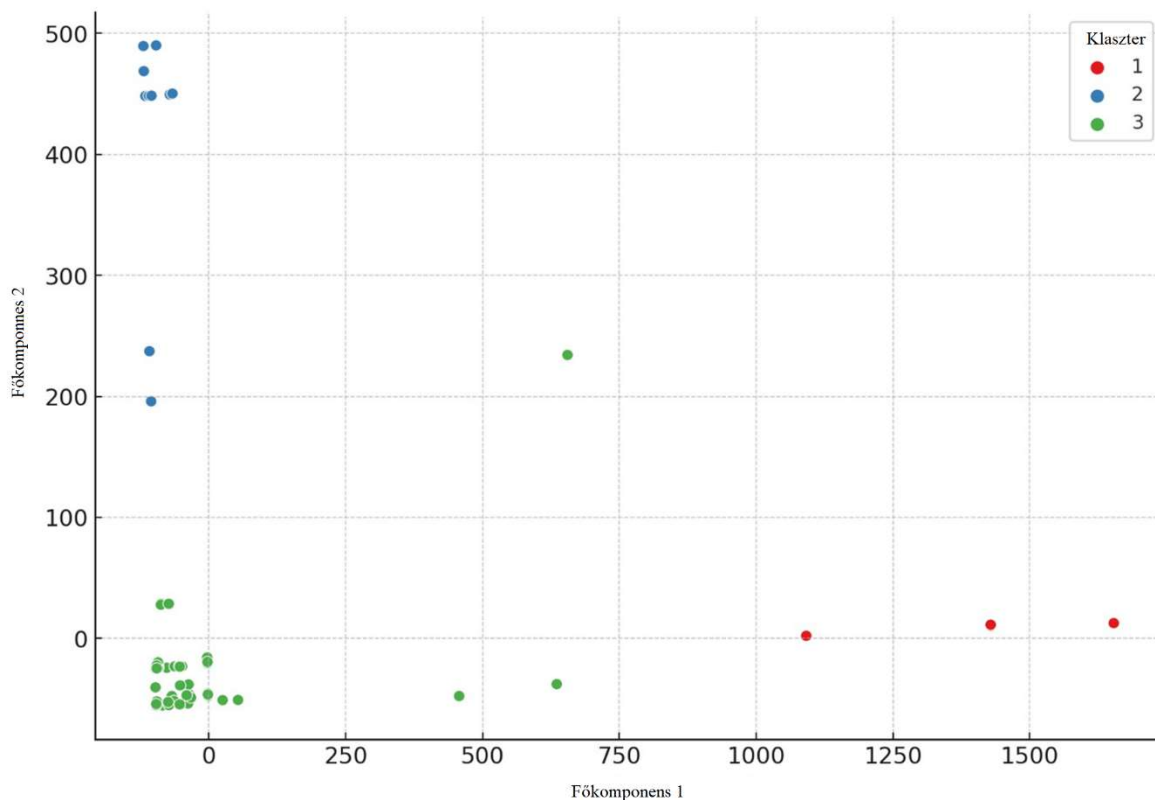
A korrelációs vizsgálat során erősen pozitív korrelációs kaptunk linkomicin és klindamicin hatóanyagok között (0,88), amoxicillin és amoxicillin-klavulánsav hatóanyagok között (0,86), tilozin és linkomicin hatóanyagok között (0,83), továbbá tilozin és klindamicin hatóanyagok között (0,83).

Elvégeztük a hierarchikus klaszter elemzést, amely során a vizsgált törzseket a MIC-értékek alapján meghatározott rezisztencia profil szerint dendogramon ábrázoltuk (**7. ábra**).



**7. ábra** A pulykákból izolált kommenzalista *Clostridium perfringens* törzsek (n=146) klaszter elemzése. Az áttekinthetőség miatt az egyes mintákat regionális eredetük szerint színekkel ábrázoltuk a vízszintes tengely alatt.

A klaszter elemzés alapján elvégeztük a főkomponens analízist és vizualizáltuk a klaszterekbe sorolt törzsek megoszlását (**8. ábra**). a három fő klaszter közül az első és második klaszterbe volt sorolható a minták többsége, a harmadik klaszterbe néhány törzs tartozott.



**8. ábra** A pulyka eredetű kommenzalista *Clostridium perfringens* törzsek (n=146) főklaszter elemzését követő vizuális ábrázolása, a három fő klaszterbe sorolt törzsek elkülönülése jól látható.

A mintákat csoportosítottuk hasznosítási irány (tenyész, hús), életkor (növendék, felnőtt), valamint telepméret (kicsi, közepes) alapján és statisztikailag összehasonlítottuk, hogy van-e szignifikáns különbség a rezisztencia mértékében (**3. táblázat**).

Szignifikáns tulajdonságot a hasznosítási irányok között amoxicillin ( $p=0,0093$ ) és klindamicin ( $p=0,0043$ ) esetén mutattunk ki, a korcsoport a hasznosítási irányhoz igazodott, így ugyanazon hatóanyagok esetében mutatott szignifikáns különbséget. A telepméret esetén pedig az enrofloxacin ( $p=0,0499$ ) és klindamicin ( $p=0,0084$ ) esetén figyeltünk meg szignifikáns különbséget.

**3. táblázat** A minták hasznosítási irány, korcsoport és telepméret szerinti rezisztencia profiljának statisztikai összehasonlítása.

| Hatóanyag    | tenyész-hús | növendék-felnőtt | kicsi-közepes |
|--------------|-------------|------------------|---------------|
| Amoxicillin  | 0,0093*     | 0,0093*          | 0,0915        |
| Imipenem     | 0,0973      | 0,0973           | 0,5595        |
| Linkomicin   | 0,6313      | 0,6313           | 0,7438        |
| Enrofloxacin | 0,4941      | 0,4941           | 0,0499*       |
| Penicillin   | 0,6939      | 0,6939           | 0,8216        |
| Klindamicin  | 0,0043*     | 0,0043*          | 0,0084*       |

kicsi (5001-50 000), közepes (50 001-100 000)

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásunk során kommenzalista *Clostridium perfringens* törzsek (n=146) esetén penicillinre 55,5%-os rezisztenciát mutattunk ki, 1 µg/ml-es MIC<sub>50</sub> és 32 µg/ml-es MIC<sub>90</sub> értéket kaptunk, ezzel ellentétben Slavic és mtsai. nem találtak rezisztens törzset, 0,06 µg/ml-es MIC<sub>50</sub> és 0,12 µg/ml-es MIC<sub>90</sub> értéket írtak le [46]. Silva és mtsai. 55 brojlersirkéből származó izolátum vizsgálata során szintén nem találtak penicillinre rezisztens törzset, nem írtak le 0,25 µg/ml-nél nagyobb MIC értéket [73]. Klindamicin vizsgálata során 41,8%-os rezisztenciát tapasztaltunk, 2 µg/ml-es MIC<sub>50</sub> és 32 µg/ml-es MIC<sub>90</sub> értékkel, Slavic és mtsai. viszont csak 2%-os rezisztenciát mutattak ki 1 µg/ml-es MIC<sub>50</sub> és 4 µg/ml-es MIC<sub>90</sub> érték mellett [46]. Metronidazol esetében az általunk vizsgált törzsek MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értéke 32 és 512 µg/ml volt, míg Slavic és mtsai. 1 µg/ml-es MIC<sub>50</sub>, és 4 µg/ml-es MIC<sub>90</sub> értéket számoltak [46]. Amoxicillinre 12,3%-os rezisztenciát tapasztaltunk, viszont brojlersirkéből származó törzsek esetén Martel és mtsai. nem találtak rezisztens törzset, Osman és Elhariri pedig 7%-os rezisztenciát írtak le [38, 39]. Linkomicinre az általunk vizsgált törzsek mindössze 11,6%-a volt érzékeny, Silva és mtsai. a vizsgált törzsek 89,1%-át érzékenynek találták linkomicinre. Míg Silva és mtsai. nem találtak 64 µg/ml-nél nagyobb MIC értékkel rendelkező törzset, mi 1024 µg/ml-es MIC értékeket is mértünk [73]. Gholamiandehkordi és mtsai. 61,5%-os, Martel és mtsai. 63,3%-os rezisztenciát írtak le linkomicin esetében [37]. Osman és Elhariri nem találtak linkomicinre érzékeny törzset [39]. Imipenem vizsgálata során 5,5%-os rezisztenciát tapasztaltunk, Akhi és mtsai. viszont humán bélsármintákból izolált törzsek esetében 38%-os rezisztenciát írtak le. Akhi és mtsai. 32 µg/ml-es MIC értéket is leírtak, míg az általunk mért legmagasabb MIC érték imipenem esetében 16 µg/ml volt [42]. Az általunk vizsgált törzsek 56,2%-a volt rezisztens enrofloxacinra, Gad és mtsai. a törzsek 98%-át enrofloxacinra érzékenynek találták [47]. Osman és Elhariri viszont brojlersirkéből származó törzsek esetén 82%-os rezisztenciát írtak le [39]. Pulyka eredetű törzsek esetén Watkins és mtsai. tilozin és tilmikozin esetében is 2 µg/ml-es MIC<sub>50</sub> és 256 µg/ml-es MIC<sub>90</sub> értéket írtak le, míg az általunk vizsgált törzsek MIC<sub>90</sub> értéke ezen hatóanyagok esetén 64 µg/ml volt, a MIC<sub>50</sub> érték tilozin esetén 1 µg/ml, míg tilmikozin esetén 16 µg/ml volt [50]. Oxitetraciklin esetében 16 µg/ml-es MIC<sub>50</sub> és 32 µg/ml-es MIC<sub>90</sub> értéket kaptunk, míg Gharaibeh és mtsai. 0,5 µg/ml-es MIC<sub>50</sub>, és legalább 256 µg/ml-es MIC<sub>90</sub> értéket írtak le [51]. Vankomicin vizsgálata során 1 µg/ml-es MIC<sub>50</sub>, és 32 µg/ml-es MIC<sub>90</sub> értéket kaptunk, ezzel szemben Johansson és mtsai. nem írtak le 4 µg/ml-nél nagyobb MIC értéket

vankomicin esetében [48]. Akhi és mtsai. 0,016 és 128 µg/ml közötti MIC értékeket írtak le ceftriaxon esetében, míg mi 256 µg/ml-es MIC értékkel rendelkező törzseket is találtunk [42]. Ronidazol vizsgálata során 32 µg/ml -es MIC<sub>50</sub>, és 256 µg/ml-es MIC<sub>90</sub> értéket kaptunk, ezzel szemben Dutta és mtsai. madár eredetű törzsek esetében nem találtak 0,5 µg/ml-nél nagyobb MIC értékkel rendelkező törzset [74]. Amoxicillin-klavulánsav esetében 0,5 µg/ml -es MIC<sub>50</sub>, és 8 µg/ml-es MIC<sub>90</sub> értéket kaptunk. Park és mtsai. a lovakból származó 25 törzs 84 %-át érzékenynek találták amoxicillin-klavulánsavra [41]. Az általunk vizsgált 146 kommenzalista *Clostridium perfringens* törzs mindegyikénél vizsgáltuk a major alpha, major béta, major epszilon, major iota, minor beta2, minor entero és minor netB toxin termeléséért felelős gének meglétét. Alpha toxin mellett, amelyet minden *Clostridium perfringens* törzs termel, a törzsek 3,4%-ánál találtunk minor netB toxin termelésért felelős gént. Lyhs és mtsai. 212 *Clostridium perfringens* izolátum esetén vizsgálták a toxintermelésért felelős gének jelenlétét, mely izolátumok közül 174 beteg, 38 egészséges pulykából származott. Az alpha toxin gén jelenlétét Lyhs és mtsai. is minden törzs esetében leírták, viszont a mi eredményeinkkel ellentétben kizárólag elhalásos bélgyulladásban szenvedő, elhullott vagy leölt állatokból származó törzsek esetén, a 174 törzsből összesen 14-nél (8%) találtak netB toxin termelésért felelős gént, a kommenzalista törzseknél nem [34]. A törzsek 15,8%-ánál találtunk beta2 toxin termelésért felelős gént, míg Lyhs és mtsai. csak egy törzs esetében [34]. Lyhs és mtsai. vizsgálták még a major beta, major epszilon és major iota toxinok termelését is, azonban az ezek termeléséért felelős géneket egy törzs esetében sem írtak le [34]. Kutatásunk során vizsgált törzsek 23,9%-ánál találtunk major beta, 2,7%-ánál major epszilon toxin termelésért felelős gént. Major iota toxin gént mi sem találtunk. Ezeken kívül vizsgáltuk még a minor entero toxin termeléséért felelős gén jelenlétét is, azonban nem találtuk egy törzs esetében sem. Mohiuddin és mtsai. 44 baromfiból származó törzsből kettő esetében írtak le netB toxin gént, viszont major béta, major epszilon, major iota és minor entero toxinokat kódoló géneket nem találtak [35]. Slavic és mtsai. csak egy pulyka eredetű törzsnél találtak epsilon toxint kódoló gént, és ugyanennél a törzsnél cpe gént is találtak, valamint a pulyka eredetű törzsek 90%-ánál találtak minor beta2 gént. Sertés eredetű törzsek esetében Slavic és mtsai. leírták, hogy klindamicinnel és eritromicinnel szemben rezisztens törzsek szignifikánsan kisebb valószínűséggel hordozzák a b2-toxin gént. A többi vizsgált állatfajból, szarvasmarhából, házi tyúkból és pulykából származó törzsek esetén nem találtak szignifikáns összefüggést az antibiotikum-érzékenység és a toxintermelésért felelős gének jelenléte között [46]. Az egyes antibiotikumokkal szembeni érzékenység és a toxintermelésért felelős gének megléte között

nem találtunk szignifikáns különbséget, viszont Wei és mtsai. egészséges (n=97) és a NE klinikai tüneteit mutató (n=65) csirkékből izolált *Clostridium perfringens* törzsek között szignifikáns különbséget írtak le az általunk vizsgált hatóanyagok közül klindamicin, ezen kívül gentamicin és virginiamicin tekintetében, ezekre a hatóanyagokra ugyanis a beteg állatokból származó törzsek kevésbé voltak érzékenyek [45].

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Korunk egyik legnagyobb kihívása az antimikrobiális rezisztencia globális terjedése, amely közös gondolkodásra sarkallja az állat- és közegészségügy területén dolgozó szakembereket. A *Clostridium perfringens* a baromfiipar számára még ma is jelentős gazdasági károkat okozhat, kommenzalista törzsei pedig nemcsak rezisztenciagének, hanem toxintermelésért felelős gének természetes hordozói és fenntartói is lehetnek.

Célul tűztük ki, hogy felmérjük a magyarországi nagylétszámú pulykaállományokból izolált kommenzalista *Clostridium perfringens* törzsek antimikrobiális érzékenységi profilját minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározásával, különös tekintettel állat- és közegészségügyi szempontból kiemelten fontos hatóanyagokra. Kutatásunkat PCR vizsgálattal egészítettük ki, amellyel a fajra jellemző major és minor toxingének jelenlétét vizsgáltuk, majd összefüggéseket kerestünk a gének jelenléte és az antimikrobiális rezisztencia profil között.

Összesen 146 pulykából izolált kommenzalista törzset vizsgáltunk 14 különböző hatóanyagra, amelyek közül hat rendelkezett klinikai törésponttal. Kiszámítottuk a vizsgált populáció MIC<sub>50</sub> és MIC<sub>90</sub> értékeit, mindkét érték az imipenem klinikai töréspontja alatt volt, azonban amoxicillin és klindamicin esetében csak a MIC<sub>50</sub> érték volt ezen határérték alatt. A *Clostridium perfringens* törzsek által okozott fertőzések kezelésében régóta használt penicillin iránti érzékenység csökkent, a törzsek mindössze 44,5%-a volt érzékeny rá, míg amoxicillinnel szemben 87,7%-uk mutatott érzékenységet. A legalacsonyabb érzékenységet a linkomicin esetében tapasztaltuk, ahol a törzsek csupán 11,6%-a volt érzékeny.

A PCR vizsgálatok során a vizsgált törzsek mindegyike hordozott alpha major toxingént, 23,9%-uk béta major, 15,8%-uk béta2 minor, 3,4%-uk netB minor és 2,7%-uk epszilon major toxingént hordozott. A toxintermelésért felelős gének jelenléte és a törzsek antimikrobiális érzékenységi profilja között azonban nem mutattunk ki összefüggést, statisztikai elemzéssel nem találtunk szignifikáns különbséget a MIC-értékek és a toxintermelésért felelős gének megléte vagy hiánya között.

Összességében elmondhatjuk, hogy a *Clostridium perfringens* törzsek megőrizték érzékenységüket a kezelésükben elsődlegesen választandó béta-laktám antibiotikumokkal szemben, a rendszeres felmérések segíthetnek az időbeni trendek meghatározásában. A jövőben érdemes nagyobb mintaszámmal megismételni a vizsgálatokat, és a multirezisztens törzsek további vizsgálatát újgenerációs szekvenálás segítségével folytatni.

## 8. SUMMARY

One of the greatest challenges of our time is the global spread of antimicrobial resistance, which prompts professionals in both veterinary and public health to collaborate and think collectively. *Clostridium perfringens* continues to cause significant economic losses in the poultry industry, and its commensal strains can naturally harbor and maintain not only resistance genes but also genes responsible for toxin production.

Our goal was to assess the antimicrobial susceptibility profiles of commensal *Clostridium perfringens* strains isolated from large-scale turkey farms in Hungary, using minimal inhibitory concentration (MIC) determination against key substances of veterinary and public health importance. We complemented our study with PCR analysis to detect the presence of major and minor toxin genes specific to the species, and we explored potential correlations between the presence of these genes and the antimicrobial resistance profiles.

A total of 146 commensal strains isolated from turkeys were tested against 14 antimicrobial agents, six of which had clinical breakpoints. We calculated the MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values for the tested population: both values were below the clinical breakpoint for imipenem, but only the MIC<sub>50</sub> value was below the breakpoint for amoxicillin and clindamycin. Sensitivity to penicillin, which has long been used to treat infections caused by *Clostridium perfringens*, decreased, with only 44.5% of strains showing sensitivity, whereas 87.7% of the strains were sensitive to amoxicillin. The lowest sensitivity was observed against lincomycin, with only 11.6% of the strains being susceptible.

All of the tested strains were positive for the major alpha toxin gene, with 23.9% carrying the major beta gene, 15.8% carrying the minor beta2 gene, 3.4% carrying the minor netB gene, and 2.7% carrying the major epsilon gene. However, no correlation was found between the presence of toxin genes and the antimicrobial susceptibility profiles, as statistical analysis did not reveal significant differences between MIC values and the presence or absence of toxin genes.

In conclusion, *Clostridium perfringens* strains have retained their sensitivity to the beta-lactam antibiotics, which are the primary treatment option, and regular monitoring can help establish long-term trends. In the future, it would be beneficial to repeat the study with a larger sample size and to further investigate the multi-resistant strains using next-generation sequencing.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A (2015) Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health* 109:309–318. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>
2. Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, Steinbakk M, Regmi S, Karkey A, Guerin PJ, Piddock LJV (2016) Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* 387:176–187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
3. Martínez JL (2008) Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science* 321:365–367. <https://doi.org/10.1126/science.1159483>
4. Davies J (2006) Are antibiotics naturally antibiotics? *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33:496–499. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0112-5>
5. Rosini R, Nicchi S, Pizza M, Rappuoli R (2020) Vaccines Against Antimicrobial Resistance. *Front Immunol* 11:1048. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01048>
6. Davies J, Davies D (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
7. Prescott JF (2014) The resistance *tsunami*, antimicrobial stewardship, and the golden age of microbiology. *Veterinary Microbiology* 171:273–278. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.035>
8. Martinez JL (2009) Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution* 157:2893–2902. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.051>
9. Dimitriu T (2022) Evolution of horizontal transmission in antimicrobial resistance plasmids. *Microbiology* 168:001214. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001214>
10. von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, Savelkoul PHM, Wolffs PFG (2016) Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol* 7:173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
11. Norman A, Hansen LH, Sørensen SJ (2009) Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:2275–2289. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0037>
12. Samreen, Ahmad I, Malak HA, Abulreesh HH (2021) Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 27:101–111. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.08.001>
13. Gibson MK, Forsberg KJ, Dantas G (2015) Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *The ISME Journal* 9:207. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.106>

14. Pantaléon V, Bouttier S, Soavelomandroso AP, Janoir C, Candela T (2014) Biofilms of *Clostridium* species. *Anaerobe* 30:193–198. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.09.010>
15. Talukdar PK, Olguín-Araneda V, Alnoman M, Paredes-Sabja D, Sarker MR (2015) Updates on the sporulation process in *Clostridium* species. *Research in Microbiology* 166:225–235. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.12.001>
16. Dürre P (2014) Physiology and Sporulation in *Clostridium*. *Microbiology Spectrum* 2:10.1128/microbiolspec.tbs-0010–2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbs-0010-2012>
17. COLLINS MD, LAWSON PA, WILLEMS A, CORDOBA JJ, FERNANDEZ-GARAYZABAL J, GARCIA P, CAI J, HIPPE H, FARROW JAE (1994) The Phylogeny of the Genus *Clostridium*: Proposal of Five New Genera and Eleven New Species Combinations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44:812–826. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-812>
18. Popoff MR, Bouvet P (2013) Genetic characteristics of toxigenic *Clostridia* and toxin gene evolution. *Toxicon* 75:63–89. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.003>
19. Kök MS (2015) An integrated approach: advances in the use of *Clostridium* for biofuel. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 31:69–81. <https://doi.org/10.1080/02648725.2016.1168075>
20. Tian Q-Q, Liang L, Zhu M-J (2015) Enhanced biohydrogen production from sugarcane bagasse by *Clostridium thermocellum* supplemented with CaCO<sub>3</sub>. *Bioresource Technology* 197:422–428. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.111>
21. Revitt-Mills SA, Vidor CJ, Watts TD, Lyras D, Rood JI, Adams V (2019) Virulence Plasmids of the Pathogenic *Clostridia*. *Microbiology Spectrum* 7:10.1128/microbiolspec.gpp3-0034–2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0034-2018>
22. Surana S, Tosolini AP, Meyer IFG, Fellows AD, Novoselov SS, Schiavo G (2018) The travel diaries of tetanus and botulinum neurotoxins. *Toxicon* 147:58–67. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.008>
23. Burke KE, Lamont JT (2014) *Clostridium difficile* Infection: A Worldwide Disease. *Gut Liver* 8:1–6. <https://doi.org/10.5009/gnl.2014.8.1.1>
24. Hamza D, Dorgham SM, Elhariri M, Elhelw R, Ismael E (2018) New Insight of Apparently Healthy Animals as a Potential Reservoir for *Clostridium Perfringens*: A Public Health Implication. *J Vet Res* 62:457–462. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0073>
25. Wang W, Mai X, Wang D, Zheng Y, Liu F, Sun Z (2023) Mathematical modeling of temperature and natural antimicrobial effects on germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* in chilled chicken. *LWT* 177:114555. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114555>

26. Labbe RG, Huang TH (1995) Generation Times and Modeling of Enterotoxin-Positive and Enterotoxin-Negative Strains of *Clostridium perfringens* in Laboratory Media and Ground Beef. *Journal of Food Protection* 58:1303–1306. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.12.1303>
27. Briolat V, Reysset G (2002) Identification of the *Clostridium perfringens* Genes Involved in the Adaptive Response to Oxidative Stress. *J Bacteriol* 184:2333–2343. <https://doi.org/10.1128/JB.184.9.2333-2343.2002>
28. Grenda T, Jarosz A, Sapała M, Grenda A, Patyra E, Kwiatak K (2023) *Clostridium perfringens*—Opportunistic Foodborne Pathogen, Its Diversity and Epidemiological Significance. *Pathogens* 12:768. <https://doi.org/10.3390/pathogens12060768>
29. Rood JI, Adams V, Lacey J, Lyras D, McClane BA, Melville SB, Moore RJ, Popoff MR, Sarker MR, Songer JG, Uzal FA, Van Immerseel F (2018) Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe* 53:5–10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>
30. Mehdizadeh Gohari I, A. Navarro M, Li J, Shrestha A, Uzal F, A. McClane B Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. *Virulence* 12:723–753. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1886777>
31. Cooper KK, Songer JG, Uzal FA (2013) Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *J VET Diagn Invest* 25:314–327. <https://doi.org/10.1177/1040638713483468>
32. Yang W-Y, Lee Y-J, Lu H-Y, Branton SL, Chou C-H, Wang C (2019) The netB-positive *Clostridium perfringens* in the experimental induction of necrotic enteritis with or without predisposing factors. *Poultry Science* 98:5297–5306. <https://doi.org/10.3382/ps/pez311>
33. Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F (2011) Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathology* 40:341–347. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.590967>
34. Lyhs U, Perko-Mäkelä P, Kallio H, Brockmann A, Heinikainen S, Tuuri H, Pedersen K (2013) Characterization of *Clostridium perfringens* isolates from healthy turkeys and from turkeys with necrotic enteritis. *Poultry Science* 92:1750–1757. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02903>
35. Mohiuddin M, Song Z, Liao S, Qi N, Li J, Lv M, Lin X, Cai H, Hu J, Liu S, Zhang J, Gu Y, Sun M (2023) Animal Model Studies, Antibiotic Resistance and Toxin Gene Profile of NE Reproducing *Clostridium perfringens* Type A and Type G Strains Isolated from Commercial Poultry Farms in China. *Microorganisms* 11:622. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030622>
36. Hassani S, Pakbin B, Brück WM, Mahmoudi R, Mousavi S (2022) Prevalence, Antibiotic Resistance, Toxin-Typing and Genotyping of *Clostridium perfringens* in Raw Beef Meats Obtained from Qazvin City, Iran. *Antibiotics (Basel)* 11:340. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030340>

37. Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ (2017) Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Front Vet Sci* 4:126. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126>
38. Martel A, Devriese L, Cauwerts K, De Gussem K, Decostere A, Haesebrouck F (2004) Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathology* 33:3–7. <https://doi.org/10.1080/0307945031000163291>
39. K.m O, M E (2013) Antibiotic resistance of *Clostridium perfringens* isolates from broiler chickens in Egypt. 32:841. <https://doi.org/10.20506/rst.32.2.2212>
40. Mwangi S, Timmons J, Fitz-coy S, Parveen S (2019) Characterization of *Clostridium perfringens* recovered from broiler chicken affected by necrotic enteritis. *Poultry Science* 98:128–135. <https://doi.org/10.3382/ps/pey332>
41. Park CS, Hwang JY, Cho GJ (2019) The First Identification and Antibigram of *Clostridium perfringens* Type C Isolated from Soil and The Feces of Dead Foals in South Korea. *Animals (Basel)* 9:579. <https://doi.org/10.3390/ani9080579>
42. Akhi MT, Asl SB, Pirzadeh T, Naghili B, Yeganeh F, Memar Y, Mohammadzadeh Y (2015) Antibiotic Sensitivity of *Clostridium perfringens* Isolated From Faeces in Tabriz, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 8:. <https://doi.org/10.5812/jjm.20863v2>
43. Ren Y, Lv X, Xu W, Li Y, Liu L, Kong X, Wang H (2024) Characterization and multilocus sequence typing of *Clostridium perfringens* isolated from patients with diarrhoea and food poisoning in Tai'an region, China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 36:160–166. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.12.017>
44. Duc HM, Hoa TTK, Ha CTT, Van Hung L, Van Thang N, Minh Son H, Flory GA (2024) Prevalence and Antibiotic Resistance Profile of *Clostridium perfringens* Isolated from Pork and Chicken Meat in Vietnam. *Pathogens* 13:400. <https://doi.org/10.3390/pathogens13050400>
45. Wei B, Cha S-Y, Zhang J-F, Shang K, Park H-C, Kang J, Lee K-J, Kang M, Jang H-K (2020) Antimicrobial Susceptibility and Association with Toxin Determinants in *Clostridium perfringens* Isolates from Chickens. *Microorganisms* 8:1825. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111825>
46. Slavić Đ, Boerlin P, Fabri M, Klotins KC, Zoethout JK, Weir PE, Bateman D (2011) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario. *Can J Vet Res* 75:89–97
47. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Elbestawy AR, El-Shall NA, Saad AM, Salem HM, El-Tahan AM, Khafaga AF, Taha AE, AbuQamar SF, El-Tarabily KA (2022) Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives – a comprehensive review. *Poultry Science* 101:101590. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101590>
48. Johansson A, Greko C, Engström BE, Karlsson M (2004) Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry,

- and distribution of tetracycline resistance genes. *Veterinary Microbiology* 99:251–257. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.01.009>
49. Beres C, Colobatiu L, Tabaran A, Mihaiu R, Mihaiu M (2023) Prevalence and Characterisation of *Clostridium perfringens* Isolates in Food-Producing Animals in Romania. *Microorganisms* 11:1373. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061373>
  50. Watkins KL, Shryock TR, Dearth RN, Saif YM (1997) In-vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. *Veterinary Microbiology* 54:195–200. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(96\)01276-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(96)01276-X)
  51. Gharaibeh S, Al Rifai R, Al-Majali A (2010) Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from broiler chickens. *Anaerobe* 16:586–589. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.10.004>
  52. Kiu R, Hall LJ (2018) An update on the human and animal enteric pathogen *Clostridium perfringens*. *Emerg Microbes Infect* 7:141. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0144-8>
  53. Uzal FA, Freedman JC, Shrestha A, Theoret JR, Garcia J, Awad MM, Adams V, Moore RJ, Rood JJ, McClane BA (2014) Towards an understanding of the role of *Clostridium perfringens* toxins in human and animal disease. *Future Microbiol* 9:361–377. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.168>
  54. Uzal FA, Vidal JE, McClane BA, Gurjar AA (2010) *Clostridium Perfringens* Toxins Involved in Mammalian Veterinary Diseases. *Open Toxinology J* 2:24–42
  55. Takehara M, Takagishi T, Seike S, Ohtani K, Kobayashi K, Miyamoto K, Shimizu T, Nagahama M (2016) *Clostridium perfringens*  $\alpha$ -Toxin Impairs Innate Immunity via Inhibition of Neutrophil Differentiation. *Sci Rep* 6:28192. <https://doi.org/10.1038/srep28192>
  56. O'Brien DK, Melville SB (2004) Effects of *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin (PLC) and Perfringolysin O (PFO) on Cytotoxicity to Macrophages, on Escape from the Phagosomes of Macrophages, and on Persistence of *C. perfringens* in Host Tissues. *Infect Immun* 72:5204–5215. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5204-5215.2004>
  57. Oda M, Terao Y, Sakurai J, Nagahama M (2015) Membrane-Binding Mechanism of *Clostridium perfringens* Alpha-Toxin. *Toxins (Basel)* 7:5268–5275. <https://doi.org/10.3390/toxins7124880>
  58. Navarro MA, McClane BA, Uzal FA (2018) Mechanisms of Action and Cell Death Associated with *Clostridium perfringens* Toxins. *Toxins (Basel)* 10:212. <https://doi.org/10.3390/toxins10050212>
  59. Lencer WI (2020) Everything Illuminated—*Clostridium perfringens*  $\beta$ -toxin. *Cell Host & Microbe* 28:5–6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.006>
  60. Schumacher VL, Martel A, Pasmans F, Van Immerseel F, Posthaus H (2013) Endothelial Binding of Beta Toxin to Small Intestinal Mucosal Endothelial Cells in

Early Stages of Experimentally Induced *Clostridium Perfringens* Type C Enteritis in Pigs. *Vet Pathol* 50:626–629. <https://doi.org/10.1177/0300985812461362>

61. Gibert M, Jolivet-Renaud C, Popoff MR (1997) Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* 203:65–73. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00493-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00493-9)
62. Forti K, Ferroni L, Pellegrini M, Cruciani D, De Giuseppe A, Crotti S, Papa P, Maresca C, Severi G, Marenzoni ML, Cagiola M (2020) Molecular Characterization of *Clostridium perfringens* Strains Isolated in Italy. *Toxins (Basel)* 12:650. <https://doi.org/10.3390/toxins12100650>
63. Bokori-Brown M, Savva CG, Fernandes da Costa SP, Naylor CE, Basak AK, Titball RW (2011) Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *The FEBS Journal* 278:4589–4601. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08140.x>
64. Stiles BG, Barth G, Barth H, Popoff MR (2013) *Clostridium perfringens* Epsilon Toxin: A Malevolent Molecule for Animals and Man? *Toxins* 5:2138. <https://doi.org/10.3390/toxins5112138>
65. Nagahama M, Takehara M, Seike S, Sakaguchi Y (2023) Cellular Uptake and Cytotoxicity of *Clostridium perfringens* Iota-Toxin. *Toxins (Basel)* 15:695. <https://doi.org/10.3390/toxins15120695>
66. Richard JF, Mainguy G, Gibert M, Marvaud JC, Stiles BG, Popoff MR (2002) Transcytosis of iota-toxin across polarized CaCo-2 cells. *Molecular Microbiology* 43:907–917. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02806.x>
67. Freedman JC, Shrestha A, McClane BA (2016) *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. *Toxins (Basel)* 8:73. <https://doi.org/10.3390/toxins8030073>
68. Ogbu CP, Roy S, Vecchio AJ (2022) Disruption of Claudin-Made Tight Junction Barriers by *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Insights from Structural Biology. *Cells* 11:903. <https://doi.org/10.3390/cells11050903>
69. Keyburn AL, Boyce JD, Vaz P, Bannam TL, Ford ME, Parker D, Rubbo AD, Rood JI, Moore RJ (2008) NetB, a New Toxin That Is Associated with Avian Necrotic Enteritis Caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens* 4:. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040026>
70. ISLAM AA, NAKATANI M, NAKAJIMA T, KOHDA T, MUKAMOTO M (2021) The cytotoxicity and molecular mechanisms of the *Clostridium perfringens* NetB toxin. *J Vet Med Sci* 83:187–194. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0623>
71. Clinical and Laboratory Standards Institute (2018) CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 11. th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
72. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G (2006) Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off

- values. Clin Microbiol Infect 12:418–425. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01377.x>
73. Silva ROS, Salvarani FM, Assis RA, Martins NRS, Pires PS, Lobato FCF (2009) Antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* strains isolated from broiler chickens. Braz J Microbiol 40:262–264. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220090002000010>
74. Dutta GN, Devriese LA (1980) Susceptibility of *Clostridium perfringens* of animal origin to fifteen antimicrobial agents. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 3:227–236. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1980.tb00487.x>

## **10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Szeretnék köszönetet mondani a témavezetőmnek, Dr. Kerek Ádám egyetemi tanársegédnek a témában nyújtott szakmai segítségért, valamint szeretném megköszönni a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék munkatársainak támogatását.

Az RRF-2.3.1-21-2022-00001 számú projekt a Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszköz és Nemzeti Helyreállítási Alapból nyújtott támogatásával, az RRF-2.3.1-21 pályázati program finanszírozásában valósult meg.

## Témavezetői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Kerek Ádám**, mint témavezető nyilatkozom, hogy **Ferró Kristóf**, **negyedik** évfolyamos hallgató „*Hazai nagylétszámú pulyka állományokból izolált Clostridium perfringens törzsek toxintermelésért felelős génjei és antibiotikum-érzékenységük közötti összefüggés*” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2024. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött TDK dolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2024. október hó 11. nap.

.....

Dr. Kerek Ádám  
témavezető

## Hallgatói nyilatkozat

Alulírott, **Ferró Kristóf** nyilatkozom arról, hogy a tudományos munkám során az alábbi feladatokat végeztem el, mint saját munka: szakirodalmi áttekintés, aktív részvétel a Mikrobiológiai Laboratóriumban végzett minimális gátló koncentrációk (MIC) értékek meghatározásában, az eredmények leolvasásában. Az izolált színtenyészetekből történő DNS kivonásban, azok PCR vizsgálatra történő előkészítésében és a PCR vizsgálat lefuttatásában. Ezt követően az eredmények kiértékelésében, azok értelmezésében, kimutatások készítésében.

Kelt: Budapest, 2024. október 17.

---

Ferró Kristóf  
hallgató