

TDK DOLGOZAT

Horváth Ákos

2023

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



Baromfi eredetű multirezisztens *Enterococcus* baktériumtörzsek antibiotikum érzékenységi és metagenomikai vizsgálata

Készítette:

Horváth Ákos

5. évf. ao. hallgató

Témavezetők:

Dr. Kerek Ádám

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, egyetemi tanársegéd

Dr. Mag Patrik

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, egyetemi tanársegéd

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. Bevezetés.....	4
2. Irodalmi áttekintés.....	5
2.1. Antimikrobiális rezisztencia jelentősége.....	5
2.2. A multi-, a kiterjedt gyógyszer- és a pánrezisztencia.....	7
2.3. <i>Enterococcus</i> fajok állat- és közegészségügyi jelentősége.....	7
2.4. A vizsgált hatóanyagok.....	11
2.5. Új generációs szekvenálás.....	13
3. Céltűzések.....	14
4. Anyag és módszer.....	15
4.1. A minták eredete.....	15
4.2. A vizsgált hatóanyagok, törzsoldatuk elkészítése.....	15
4.3. A minimális gátló koncentráció meghatározás.....	15
4.4. Az <i>Enterococcus</i> spp. izolátumok érzékenysége a meghatározása.....	16
4.5. Új generációs szekvenálás és bioinformatikai adatfeldolgozás.....	17
5. Eredmények.....	18
5.1. A vizsgált antibakteriális hatóanyagok és <i>Enterococcus</i> spp. izolátumok.....	18
5.2. Az <i>Enterococcus</i> spp. izolátumok érzékenysége baromfifélékre engedélyezett hatóanyagokkal szemben.....	18
5.3. Az <i>Enterococcus</i> spp. izolátumok érzékenysége a humán egészségügyben engedélyezett hatóanyagokkal szemben.....	19
5.4. A vizsgált <i>Enterococcus</i> spp. izolátumok megoszlása az EUCAST epidemiológiai határértékei alapján.....	25
5.5. MDR, XDR és PDR izolátumok.....	26
5.6. Az MDR <i>Enterococcus</i> spp. izolátumok megoszlása régiók szerint.....	27
5.7. Rezisztencia gének.....	27
6. Következtetések.....	30
7. Összefoglalás.....	33
8. Summary.....	34
9. Irodalomjegyzék.....	35
10. Köszönetnyilvánítás.....	40

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMR	Antimikrobiális rezisztencia (<i>Antimicrobial resistance</i>)
ARG	Antimikrobiális rezisztencia gén (<i>Antimicrobial resistance gene</i>)
EASSA	Állatok antimikrobiális szerekre való érzékenységének európai felügyelete (<i>European Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Animals</i>)
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<i>E. cecorum</i>	<i>Enterococcus cecorum</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
MDR	Multirezisztens (<i>Multidrug-resistant</i>)
MHB	Müller-Hinton leves (<i>Müller-Hinton Broth</i>)
MIC	Minimális gátló koncentráció (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
PDR	Pánrezisztens (<i>Pandrug-resistant</i>)
VRE	Vankomicin rezisztens <i>Enterococcus</i> (<i>Vancomycin-resistant Enterococcus</i>)
XDR	Kiterjedt gyógyszerrezisztens (<i>Extensively drug-resistant</i>)

1. BEVEZETÉS

A 21. század egyik nagy jelentőségű problémája az antimikrobiális rezisztencia széles körű, globális szinten történő terjedése. A trendek mind az állat- és humán-egészségügyben a helyzet folyamatos súlyosbodását vetítik előre. Ezért kiemelten fontos, hogy különösen gazdasági haszonállataink esetén rendszeres felméréseket végezzünk a rezisztencia aktuális helyzetével kapcsolatban, valamint, hogy a közegészségügyi szempontból is fontos, feltörekvő zoonotikus ágensek multirezisztenciáját nem csak fenotípusosan, hanem szekvenálás segítségével a genom szintjén is vizsgáljuk. Az *Enterococcus* fajok olyan kommenzalista baktériumok, amelyek több antibiotikummal szemben rezisztens törzsei egyre nagyobb gondot okoznak a kórházi betegellátásban. Fokozott aggodalomra ad okot, hogy az ezen törzsek kezelésére használt vankomicin hatóanyaggal szemben is egyre szélesebb körben tapasztalható rezisztencia, amely esetén a kezelésben utolsó lehetőségként a linezolid hatóanyag jöhet még szóba.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Antimikrobiális rezisztencia jelentősége

Az antimikrobiális rezisztencia (AMR) a 21. század egyik legjelentősebb állat- és közegészségügyi kihívása [1], amely a baktériumok antibiotikumokkal szembeni fokozott ellenállóképességét vonja maga után, amely egy természetes szelekciós folyamat eredménye. A helytelenül kivitelezett antimikrobiális terápia szelekciós nyomást fejt ki a fertőzést okozó baktériumpopulációra, így azon baktériumok, amelyek ellenállóbbnak bizonyulnak az adott hatóanyaggal szemben, túlélnek a kezelést és rezisztencia génjeiket aktiválva új, rezisztens törzseket hoznak létre. Az állatgyógyászatban felhasznált antimikrobiális szerek mennyisége jelentős, az Állategészségügyi Világszervezet (OIE) felmérése szerint 2015-ben 104 799 tonna antimikrobiális szert használtak fel az állatgyógyászatban [2]. Ennek eredményeként egyre ellenállóbb baktériumtörzsek alakulnak ki, ami elősegíti az AMR terjedését. Az AMR kialakulását és terjedését négy kulcsfontosságú tényező befolyásolja: az antibiotikum-használat az állattartó telepeken, a mezőgazdaságban, a humán kórházakban, valamint az ezekre ható környezeti tényezők [1].

Az élelmiszertermelő haszonállattartó telepeken és akvakultúrákban alkalmazott antibiotikumok használata, különösen a hozamfokozásra és a betegségmegelőzésre történő felhasználása, számos országban hozzájárult, és némely harmadik világbeli országban a mai napig hozzájárul az AMR terjedéséhez [3]. Ezért számos országban korlátozásokat vezettek be az antibiotikumok hozamfokozóként történő alkalmazására, így Európában 2006-ban betiltották az ilyen célú felhasználásukat [4], míg az Amerikai Egyesült Államokban 2017-ig csak korlátozták, majd végül ott is betiltották a hozamfokozóként történő antibiotikum-használatot [5].

Az *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), a *Staphylococcus aureus*, az *Escherichia coli*, a *Streptococcus pneumoniae* és a *Pseudomonas aeruginosa* a leggyakoribb és legveszélyesebb multirezisztens (*multidrug-resistant*, MDR) baktériumok közé tartoznak. Európában 2007-ben az MDR baktériumok okozta halálesetek száma becslések szerint 25 000 és 400 000 között mozgott, és ez a szám folyamatosan növekszik [6]. Egy 2018-ban, az *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) által készített tanulmány szerint az MDR baktériumok miatti halálozás száma Európában, Észak-Amerikában és Ausztráliában összesen elérheti a 2,4 millió esetet. Az AMR következtében azonban nemcsak emberi életek kerülnek veszélybe, hanem jelentős gazdasági károk is keletkeznek, amelyeket évente 3,5 milliárd dollárra becsülnék [7].

Az AMR terjedése miatt számos országban korlátozzák az antibiotikumok használatát gazdasági haszonállatok körében, különösen a baromfiágazatban, és alternatív kezelési módszereket dolgoznak ki. Ennek ellenére továbbra is beszámolnak rezisztens kórokozók terjedéséről az ágazatban, amelyek kiemelkedő jelentőséggel bírnak [8–10].

Az AMR terjedésében az emésztőcsatorna kulcsfontosságú szerepet játszik, mivel ez az elsődleges védelmi vonal baromfifélék számára a külső patogén kórokozókkal szemben, valamint hozzájárul az optimális tápanyagok felszívódásához, és így a homeosztázis fenntartásához. A normál bélmikrobiom részei különböző *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Campylobacter* és *Salmonella* fajok, valamint az *Escherichia coli*. Ezek a felsorolt baktériumok a horizontális géntranszfer során, elsődlegesen plazmidok révén, rezervoárt képeznek az antimikrobiális rezisztenciagéneknek. A felelőtlen antibiotikumhasználat a normál bélmikrobiomban változásokat eredményez. Csökkenti ugyan a patogén baktériumok számát, de egyben elősegíti a rezisztens kórokozók elszaporodását is, így hozzájárul az AMR további terjedéséhez [11].

Az MDR *Enterococcus* törzsek gyakorisága napjainkra folyamatosan növekszik a kórházi körülmények között kialakuló (nozokomiális) fertőzésekben [12]. Ezek a törzsek antibiotikumkezelést követően gyorsan kolonizálják a gyomor-bél traktust, ezáltal hátrányt teremtve az egészséges bélmikrobiom tagjait alkotó kommenzalista baktériumoknak [13, 14]. A széles körben használt antibiotikumok hozzájárultak a rezisztens *Enterococcus* törzsek nozokomiális terjedéséhez oly mértékben, hogy mára ezek a baktériumok az egyik leggyakoribb fertőző ágensekké váltak kórházi körülmények között [12]. Az *Enterococcus* fajok további terjedését elősegíti az a tulajdonságuk is, hogy képesek életben maradni a gyomor-bélrendszeren kívül, különböző felületeken és kórházi eszközökön, valamint a kórházi dolgozók közvetve és közvetlenül is átvihetik a kórokozót egyik betegről a másikra [12].

A közös gondolkodás, együttműködés és felelősségteljes lépések nélkülözhetetlenek az AMR hatékony csökkentéséhez és az MDR kórokozók okozta fertőzések számának visszaszorításához. Az állategészségügyi és közegészségügyi szektorok közös erőfeszítései, valamint az antibiotikum-használatra vonatkozó szigorúbb szabályozás és iránymutatások és a tudatosság fokozása mind hozzájárulhatnak az AMR problémakör kezeléséhez és csökkentéséhez a jövőben. Az AMR globális kihívás, amely komplex megközelítést igényel a hatékony antibiotikumok fenntarthatóságának biztosítása érdekében.

2.2. A multi-, a kiterjedt gyógyszer- és a pánrezisztencia

Az MDR törzsek három vagy több antibiotikum csoportba tartozó, ezeken belül legalább egy hatóanyaggal szemben rezisztens törzsek; a kiterjedt gyógyszerrezisztens törzsek (*extensively drug-resistant*, XDR) a maximum egy vagy két antibiotikum csoportra érzékeny törzsek, amelyek ezeken a csoporton belül egy vagy több hatóanyagra rezisztensek; a pánrezisztens törzsek (*pandrug-resistant*, PDR) pedig az összes antibiotikum csoporttal szemben rezisztens törzsek [15].

Az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (ECDC) és az Amerikai Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ (CDC) közös szakértői csoportja 2008 óta dolgozik egy nemzetközi, egységes megközelítésen alapuló rendszer kialakításán az egyes, egészségügyi környezetben gyakran előforduló patogén baktériumok MDR, XDR és PDR törzseinek meghatározása tekintetében. Ennek keretén belül *Enterococcus* spp. esetén felállítottak egy olyan antimikrobiális kategóriákat tartalmazó rendszert, ami a terápiás szempontból releváns módon javasolja a törzsek bizonyos hatóanyagokkal szembeni érzékenységi vizsgálatát, ami alapjául szolgálhat a fentebb említett kategóriákba történő besorolásnak. Ez alapján az aminoglikozidok közül a gentamicin; a sztreptomicinek közül a sztreptomicin; a karbapenemek közül az imipenem, meropenem és doripenem; a fluorokinolonok közül a ciprofloxacin, a levofloxacin, a moxifloxacin; a glikopeptidek közül a vankomicin és teikoplanin; a gliciklinek közül a tigeciklin; a lipopeptidek közül a daptomicin; az oxazolidinonok közül a linezolid; a penicillinek közül az ampicillin; a sztreptogaminok közül a kvinopristin-dalfopristin; a tetraciklinek közül pedig a doxiciklin és minociklin hatóanyagokkal szembeni érzékenységi vizsgálatot javasolják elvégezni. Ezek közül a karbapenemekkel szemben az *Enterococcus faecium*, és a sztreptogaminokkal szemben az *Enterococcus faecalis* ún. belső rezisztenciával rendelkezhet, ebben az esetben ezeket a hatóanyag csoportokat nem kell figyelembe venni a kategóriába soroláskor [15].

2.3. *Enterococcus* fajok állat- és közegészségügyi jelentősége

Az *Enterococcus* fajok a Streptococcaceae családba tartozó Gram-pozitív baktériumok, amelyek előfordulása széleskörű, így az emberek és állatok normál bélmikrobiomjában is megtalálhatóak [12]. A család első tagját 1899-ben izolálták, egy halálos kimenetelű szívbélhártyagyulladás okozó fertőzésből [16]. Képviselőiket egészen 1984-ig a *Streptococcus* nemzetségbe sorolták, majd önálló genussá léptek elő [12]. Képviselőik között akadnak fakultatív patogének és egyes esetben probiotikumként alkalmazott törzsek is, optimális körülmények között 35 °C-on növekednek [12], legfontosabb képviselőik az *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) és az *E. faecium* fajok [17].

A baromfitartás világszerte az egyik vezető állati eredetű élelmiszertermelő ágazat, ami a relatív alacsony előállítási költségnek köszönhető, valamint annak, hogy a baromfihús fogyasztását egyik vallás sem szabályozza, vagy tiltja [18]. Csak az Európai Unióban évente hozzávetőlegesen tizenötmillió tonna baromfihúst állítanak elő, valamint több, mint hétmillió tonna tojást [19].

A nozokomiális fertőzésekben szerepet játszó antibiotikum rezisztens *Enterococcus* törzsek járultak hozzá az Európai Bizottság 1997-es döntéséhez, amelyben betiltották az avoparcin, mint hozamfokozó használatát. Később, 2006-ban a vankomicin rezisztencia megjelenése kapcsán pedig az összes antimikrobiális szer hozamfokozás céljából történő felhasználását betiltották az Európai Unióban [20]. Vélhetően ezen korlátozások következményeként és az egyre intenzívebb baromfitartás következtében növekszik a bakteriális fertőzések száma az ágazatban, amelynek egyre nagyobb részét *Enterococcus* törzsek okozzák [21]. A túlzott és felelőtlen antibiotikumhasználat, valamint ezen szerek harmadik országban hozamfokozóként történő alkalmazása a haszonállattartásban, beleértve a baromfitartást is, nagyban hozzájárul az antimikrobiális rezisztencia egyre fokozódó terjedéséhez [19]. Ezek jelentősége többek között a normál bélmikrobiomban található rezisztenssé váló mikroorganizmusok okozta gazdasági károkból, valamint azok emberekre való áttérjedésében is látható [22]. Baromfifélékben a leggyakoribb fakultatív patogénként számon tartott *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus hirae* és *Enterococcus cecorum* (*E. cecorum*) fajok a normál bélmikrobiom alkotói, azonban hajlamosító tényezők hatására egyre gyakrabban izolálják őket csigolyagyulladásban, ízületi gyulladásokban, csontvelőgyulladásban és szívbelhártyagyulladásban szenvedő brojlercsirkékből [23]. Az *E. faecalis* fertőzés különböző fajú és korú baromfiféléket érinthet, azonban kiemelkedő jelentősége az embrió korú és fiatal madarakban van. A naposcsibék bélmikrobiomjában meghatározó szerepet tölt be. Kikelést követően a csibék az első hét során különösen fogékonyak a fertőződésre, ami köldökgyulladás és szepszis formájában jelentkezik, magas mortalitás mellett. Gyakori továbbá a szívbelhártyagyulladás vagy a *salpingitis* [24, 25]. Később pedig kialakulhat ízületgyulladás, valamint amiloidózis is [26]. Az állatok antimikrobiális szerekre való érzékenységének európai felülete (EASSA) által összegyűjtött *Enterococcus* fajok időszakos rezisztenciáját az **1. táblázat** foglalja össze [27].

1. táblázat Az EASSA által leírt *Enterococcus* spp. antibiotikum rezisztencia profilja kronológiai sorrendben [27]

EASSA panel	2004-2005		2008-2009		2013-2014				2004-2014		
	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. casseliflavus</i>
Ampicillin	2,8%	0,0%	6,6%	0,0%	7,6%	2,0%					
nem vad típusú	3,2%	0,0%	7,9%	0,0%	12,4%	2,0%	8,1%	10,0%	7,3%	1,8%	0,0%
Eritromicin			56,3%	50,9%	57,0%	56,6%					
nem vad típusú							37,8%	59,8%	34,1%	60,2%	62,5%
Gentamicin	7,0%	9,1%	8,0%	9,0%	16,0%	8,0%					
nem vad típusú	7,0%	9,1%	37,0%	2,6%	24,0%	10,0%	5,4%	10,0%	4,9%	0,9%	12,5%
Linezolid	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%					
nem vad típusú							0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Kvinoprisztin-daltopristin	29,2%		24,3%		12,0%						
nem vad típusú	54,6%		41,8%		71,7%		86,5%	74,5%	82,9%	75,2%	87,5%
Tetraciklin			79,1%	80,3%	77,9%	78,3%					
nem vad típusú			80,2%	80,6%	80,3%	78,5%	64,9%	85,3%	68,3%	85,8%	100,0%
Tigeciklin			0,0%	0,0%	0,0%	0,0%					
nem vad típusú			16,0%	7,2%	14,0%	11,5%	0,0%	0,0%	0,0%	0,5%	37,5%
Vankomicin	0,0%	0,0%	3,0%	0,0%	0,0%	0,0%					
nem vad típusú	0,0%	9,1%	5,0%	0,0%	4,0%	0,0%	0,0%	10,0%	0,0%	1,8%	0,0%

EASSA – European Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Animals

Az *Enterococcus* nemzetség több genusában, így az *E. cecorum*-nál is kimutattak számos antibiotikum hatóanyagcsoporttal szembeni rezisztenciát, egyre gyakoribb az aminoglikozidokkal, a β -laktámokkal, a makrolidokkal, a tetraciklinekkel, valamint a sztreptograminokkal szemben kialakuló rezisztencia [28]. Ezeknél a törzseknél a fenotípusosan megjelenő rezisztencia részben magyarázhatja az antimikrobiális kezelések eredménytelenségét, és a mortalitás emelkedését *E. cecorum* okozta fertőzések esetén [28]. Az elmúlt években *E. cecorum* törzseket hoztak összefüggésbe brojlercsirkék különböző csontrendszeret érintő elváltozásaival, mint a combcsont fejének gyulladása, vagy ezen a területen bekövetkező porcelhalás, valamint a csigolyaelcsúszás, amit „*Kinky Back Disease*”-ként is említ a szakirodalom [25].

A patogén *E. cecorum* törzsek globálisan egyre nagyobb jelentőséggel bírnak, azonban vertikális terjedésük pontos mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, jelenleg is több kutatás témáját képezik [29]. Miután egy állományban megjelennek, a horizontális terjedésük gyors, jellemzően inhaláció és oro-fekális fertőződés révén [30, 31]. Az *Enterococcus* törzsek kifejezetten alacsony vízáktivitást tűrő fajoknak számítanak, aminek eredményeként a fertőzött por belélegzése általi terjedés is bekövetkezhet [29]. Mivel az *E. cecorum* a baromfifélék normál bélmikrobiomjának alkotója, a patogén törzsek legvalószínűbb fertőzési útvonalaként a gyomor-bélrendszeren keresztüli terjedés tekintendő [29]. Egy vizsgálat során patogén *E. cecorum*-mal fertőzött egyhetes brojlerállományban a madarak 60%-ában kolonizálódott a baktérium, ami a harmadik élethét végére 90%-ra emelkedett. A fertőzésben nem érintett madarakban nem tapasztalták a kommenzalista *E. cecorum* törzsek megjelenését a kikelést követő harmadik és negyedik hét végére [31]. A kolonizációs mintázatokban megjelenő eltérés a patogén és nem patogén *E. cecorum* törzsek között azok kolonizációs képességének eltéréseivel magyarázhatók [29]. A mai napig ismeretlen, hogy a patogén *E. cecorum* törzsek milyen mechanizmus segítségével képesek átjutni a bélcsatorna epitélisejtjeinek rétegén a keringési rendszerbe. Feltételezhető, hogy egy másik patogénnel történő egyidejű fertőződés állhat a háttérben, ugyanakkor ez idáig társfertőzést nem tudtak kimutatni *E. cecorum* okozta fertőzések kitörése esetén [30–32].

Az ESSA által kezdeményezett, az Európai Unió (EU) egészére kiterjedő vizsgálatsorozat célja, hogy folyamatosan információt gyűjtsenek az EU területén lévő haszonállattartó telepekről, így a baromfiágazatból is beérkező mintákban található baktériumtörzsek antibiotikum érzékenységéről [33]. A rezisztencia megállapításához a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) és a *European Committee on*

Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) által megállapított klinikai és epidemiológiai határértékeket veszik alapul. Egy tanulmányban 2013-2014 között beérkezett mintákból izolált *Enterococcus* törzsek érzékenységét vizsgálták többek között ampicillin, eritromicin, gentamicin, linezolid, tetraciklin, valamint vankomicin hatóanyagokra. A baromfitartó telepekről beérkező 1024 db mintából izolált törzsek között legnagyobb arányban *E. faecium* (498 db) és *E. faecalis* (488 db) voltak megtalálhatóak, ezen kívül előfordult még *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus mundtii*, *Enterococcus avium*, és *Enterococcus saccharolyticus* törzs is. Az izolált *E. faecium* törzsek között kis mértékű ampicillin (7,6%) és gentamicin (1,6%) rezisztencia volt megfigyelhető, ezzel ellentétben eritromicin (57%) és tetraciklin (77,9%) esetében sokkal nagyobb rezisztencia értékeket találtak. MDR-nek az *E. faecium* minták 16,1%-a bizonyult. Az *E. faecalis* törzsek között általánosan nagy rezisztencia értékeket tapasztaltak eritromicin (56,6%) és tetraciklin (78,3%) esetében, míg MDR-nek a minták 0,6%-a számított [34].

A klinikumban történő helyes hatóanyag és annak dózisének megválasztásában segít az EUCAST által meghatározott *Epidemiological cut-off values* (ECOFF), ami azt a legmagasabb dokumentált minimális gátló koncentráció (MIC) értéket jelöli, ahol *in vitro* körülmények között még nem tapasztalható rezisztenciára utaló jel az adott esetben alkalmazott szerrel szemben [35]. A MIC-érték alatt az adott antimikrobiális szer azon legkisebb koncentrációját értjük, ami még hatékonyan gátolja a vizsgált baktériumtörzs szaporodását. A két leggyakoribb patogén az *E. faecalis* és az *E. faecium*. *E. faecalis* esetében ezt az értéket 4 µg/ml-ben határozták meg imipenem, vankomicin, tetraciklin, és eritromicin hatóanyagokra. *E. faecium*-nál imipenem, linezolid, vankomicin, tetraciklin és eritromicin hatóanyagokra szintén 4 µg/ml a meghatározott ECOFF érték.

2.4. A vizsgált hatóanyagok

Az amoxicillin-klavulánsav egy félszintetikus penicillin és egy β-laktamáz gátló kombinációja, a legszélesebb körben használt antibiotikum Európában [36]. A kombináció növeli a hatékonyságot Gram-negatív, amoxicillin rezisztens és β-laktamáz termelő Gram-pozitív baktériumok ellen [37].

A ceftriaxon egy harmadik generációs cefalosporin, a többi β-laktám antibiotikumhoz hasonlóan a bakteriális sejtfalszintézis gátlásával fejt ki hatását [38]. Széles Gram-pozitív és Gram-negatív spektrummal rendelkezik, valamint néhány anaerob baktérium ellen is hatásos [38]. A ceftriaxon hatásosnak bizonyul az olyan kórokozók kezelésében, mint az Enterobacteriaceae családba tartozó MDR baktériumok [38].

A karbapenemek közé sorolt imipenem széles spektrumú antimikrobiális szer, Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumokkal szemben egyaránt kiváló hatékonysággal bír [39]. Ennek eredményeképp gyakran használják utolsó vonalbeli szerként, úgynevezett páncélszereként antibiotikumként [40]. Az antimikrobiális rezisztencia terjedésével azonban megjelentek az imipenemmel szemben is rezisztens kórokozók, például egyes *E. faecium* törzsek [39]. Az imipenem az állatorvoslásban kizárólag társállatok esetén, a súlyos, életet veszélyeztető fertőzések kezelésében alkalmazható hatóanyag [41]. A proximális vesetubulusokban gyorsan metabolizálódik, ezért gyógyszerkészítményekben cilastatinnal kombinálják, amely megakadályozza az imipenem bomlását és 10-25%-ról 60-70%-ra növeli a hatékonyságát [42].

A spektinomycin egy aminociklitol antibiotikum, a legtöbb kórokozóra nézve bakteriosztatikus hatásmódú, ám néhány baktériummal szemben baktericid hatással rendelkezik [43]. Számos Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium ellen is hatásos, ám mivel az enterális coliformok *ab ovo* rezisztensek spektinomicinnel szemben, ezért szélesspektrumú antibiotikumként való felhasználása korlátozott [43].

Az azitromicin a makrolid antibiotikumokon belül az azalidok csoportjába tartozó hatóanyag [44], saválló, tizenöt tagú gyűrűvel rendelkező vegyület [45], amely főként Gram-pozitív, anaerob baktériumok ellen hatásos antibakteriális szer. Ezen kívül rendelkezik némi Gram-negatív ellenes hatással is [46]. Szájon át történő beadás esetén az eritromicinnél jobb felszívódással, valamint hosszabb felezési idővel számolhatunk [44]. Bizonyos szövetekben elért koncentrációja akár százszorosa is lehet a vérplazma koncentrációjának, makrofágokban és leukocitákban ennél is magasabb, akár háromszázszoros koncentrációt is elérhet [47].

A vankomicin egy nagy molekulású glikopeptid, melyet a *Streptomyces orientalis* termel [48]. Antimikrobiális spektrumát tekintve a Gram-pozitív aerob coccusok, elsősorban *Enterococcus* fajok és meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) ellen hatásos, a legtöbb Gram-negatív baktérium rezisztens vele szemben. Hatását a baktériumok sejtfalát alkotó peptidoglikán váz szintézisének gátlásával fejt ki. Vankomicin esetén érzékenységről 4 µg/ml MIC-érték alatt beszélhetünk, 32 µg/ml-nél magasabb MIC-érték esetén rezisztensnek tekintjük az adott kórokozót [49, 50]. Állatorvosi alkalmazása kizárólag társállatok életet veszélyeztető MDR *Enterococcus* és *Streptococcus* fajok okozta fertőzésekben volt lehetséges [51], amit 2023-ban az EU betiltott [52]. A visszafogott állatorvosi alkalmazás oka, a kialakuló rezisztens törzsek emberekben való megjelenésének megakadályozása [51].

A linezolid az oxazolidinonok közé tartozó hatóanyag, hatását az 50S riboszómális alegységen, a fehérjeszintézis gátlása révén fejti ki [53]. Reverzibilisen kapcsolódik az 50S riboszómális alegység 23S RNS-éhez [54]. Antimikrobiális spektrumát tekintve számos Gram-pozitív baktérium ellen hatásos. *Enterococcus* fajokkal szemben bakteriosztatikus hatással bír, 2 µg/ml-es MIC-érték alatt érzékenynek tekintjük a baktériumokat. Rezisztens baktériumokról 8 µg/ml-nél magasabb MIC-érték esetén beszélhetünk [55]. Szájon át és parenterálisan is alkalmazható szer, szájon át történő beadásnál a biológiai hasznosulás közel 95%-os és a beadást követően két órával már maximális vérplazmakoncentrációt ér el [56].

2.5. Új generációs szekvenálás

A különböző új generációs szekvenálási módszerek nagy fejlődésen mentek keresztül az elmúlt két évtizedben [57]. A DNS szekvenálás alapjának (első generációs szekvenálás) a Sanger-féle szekvenálás és a Maxam-Gilbert féle kémiai hasításon alapuló módszer tekinthető [57]. Az új generációs szekvenálási módszereket csoportosíthatjuk a leolvasott DNS-szakasz hossza alapján, így beszélhetünk második generációs (rövid szakaszok leolvasása) és harmadik generációs (hosszú szakaszok leolvasása) szekvenálási módszerekről. A második generációs szekvenálás pontosabbnak bizonyul a harmadik generációs szekvenálással szemben, azonban a technológia fejlődésével előbb vagy utóbb a hosszú szakaszok leolvasása is pontos és megbízható módszerré fog válni [58].

A Sanger-féle szekvenálás alapját a DNS templát szálához radioaktivitással, vagy fluoreszcensen megjelölt komplementer lánczáró dideoxinukleotidok hozzákapcsolása adja. Az így megjelölt fragmentumokat ezután méretük alapján szétválasztják, majd kapilláris elektroforézissel meghatározzák azok bázissorrendjét [58].

A második generációs (rövid DNS szakaszok leolvasásán alapuló) szekvenálás jelentette a következő lépcsőfokot a Sanger-féle szekvenálást követően. A módszer általánosan a DNS fragmentálásával kezdődik, ami párhuzamosan nagy mennyiségű rövid DNS szakasz pontos leolvasását teszi lehetővé, lényegesen felgyorsítva a folyamatot az elődjéhez képest [59], a vizsgált DNS szakaszok nagyjából 250-800 bázispár hosszúságúak [60]. A munkafolyamat részét képezi egy DNS templát-könyvtár előkészítése, valamint a szekvenálási folyamat és a kapott eredmények kiértékelése [61].

A harmadik generációs szekvenálásnál a leolvasott DNS szakaszok hossza átlagosan 10 kilobázis, ez jóval magasabb érték, mint az első és második generációs szekvenálásnál használt méret. Ennél a módszernél nem fragmentált DNS szakaszokat vizsgálnak [58]. A módszer hátránya sokáig annak pontatlanságában rejlett, ám a szekvenálások végeredményét ellenőrző szoftverek fejlődésével ez a probléma megoldódni látszik [62].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás célja, hogy magyarországi nagylétszámú házityúk és pulyka állományok egészséges egyedeinek bélsarából izolált *Enterococcus* spp. izolátumok antibiotikum érzékenységét vizsgáljuk. Az izolált törzseknek a baromfifélékre engedélyezett hatóanyagokat figyelembe véve történt az előszűrése.

Az ún. MDR törzsek leválogatásával szűkített mintákat a humán egészségügy szempontjából fontos hatóanyagokra történő érzékenységi vizsgálattal szűrtük tovább.

Végül az így kapott fenotípusosan rezisztens törzsek közül, a humán egészségügyben kiemelt jelentőséggel bíró vankomicin és linezolid hatóanyagokkal szemben nagyfokú rezisztenciát mutató izolátumok pontos rezisztenciagén profilját új generációs szekvenálás segítségével térképeztük fel.

A háromlépcsős folyamat révén fenotípusosan képet kaptunk a törzsek rezisztencia profiljáról, majd ezt vankomicin és linezolid vonatkozásában párhuzamba állítottuk a mögöttük álló genetikai háttérrel. Hosszútávú céljaink között szerepel egy országos szintű, a vankomicin rezisztenciát kódoló génkészlet regionális gyakoriságát ábrázoló géntérkép elkészítése.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A minták eredete

Az egészséges, nagylétszámú házityúk és pulyka telepekről történő mintagyűjtés korábban történt, Magyarország hét régiójából, reprezentatív módon, régióként 3-3 telepről, telepenként 15 kloáka és 15 légcső tamponminta segítségével. Az izolált *Enterococcus* spp. baktériumok szintenyészet formájában felhasználásig Microbank™ rendszerben (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada) voltak lefagyaszttva. Vizsgálatunk kezdetéig összesen 969 mintát gyűjtöttünk.

4.2. A vizsgált hatóanyagok, a törzsoldatok elkészítése

Az izolátumok érzékenységét először a baromfi ágazatban engedélyezett amoxicillin, neomicin, oxitettraciklin, doxiciklin, florfenikol, tilozin, tilmikozin, linkomicin, tiamulin, kolisztin, enrofloxacin és potenciált-szulfonamid hatóanyagokkal szemben vizsgáltuk, így szűrtük le a rezisztens izolátumokat, amelyből összesen 218-at találtunk.

Az előszűrt törzsek érzékenységét további hét, a humán egészségügy szempontjából fontos antibiotikum hatóanyagra vizsgáltuk meg, második szűrőként. Ezek az amoxicillin-klavulánsav, a ceftriaxon, az imipenem a spektinomicin, az azitromicin, a vankomicin és a linezolid hatóanyagok voltak.

A hatóanyagokból történő (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) törzsoldatok elkészítéséhez a CLSI ajánlását követtük [63]. Az amoxicillin-klavulánsav és az imipenem hatóanyagokat foszfát pufferoldatban (pH 6, 0,1 mol/L) oldottuk fel, míg az azitromicin és a tilmikozin törzsoldatok elkészítése során etanolos kiegészítést alkalmaztunk a feloldódásig, majd pedig diluensként desztillált vizet alkalmaztunk. A többi hatóanyagot desztillált vízben oldottuk fel. A vizsgálatokhoz minden esetben 1024 µg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, korrigálva az egyes hatóanyagok gyártó által meghatározott tisztaságával.

4.3. A minimális gátló koncentráció meghatározás

A MIC-érték meghatározásának segítségével az AMR fenotípusos kifejeződését határoztuk meg. A vizsgálatot a CLSI módszertana szerint végeztük [63], a határértékeket a CLSI és az EUCAST irányelvei alapján határoztuk meg.

A Microbank rendszerben tárolt baktériumtörzseket a vizsgálatot megelőző napon 3 ml Müller-Hinton levesbe (MHB) oltottuk, majd 18-24 órán át 37 °C-on inkubáltuk. A vizsgálatokat 96 lyukú mikrotiter lemezek (VWR International, LLC., Debrecen, Magyarország) segítségével végeztük. A munkalemezek első oszlopának kivételével az

összes lyukat 90 µl MHB-vel töltöttük fel. Ezt követően elkészítettük az egyes hatóanyag törzsoldatok kettes alapú hígítását MHB-vel, ezzel minden esetben az első lyukban 512 µg/ml koncentrációval kezdtük a kettes alapú hígítást, amit egy második lemezen tovább folytatva a teljes mérési tartományt lefedtük (512-0,001 µg/ml). Az 512 µg/ml-re hígított hatóanyagokból 180 µl-t mértünk a munkalemezek első oszlopába, majd 2-es alapú hígítási sort készítettünk belőle, végül a második munkalemez 10. oszlopa után a felesleges oldatot eldobtuk, ezáltal minden oszlopban 90 µl oldat maradt. Minden baktériumtörzs vizsgálatához egy sort használtunk a munkalemezen.

Egy segédlemezen 25-szörös hígításban 0,5 McFarland értékre beállítva előkészítettük a baktériumok ráoltásához szükséges baktériumszuspenziót. A segédlemezeket 240 µl MHB-vel töltöttük fel, majd minden lyukba 10 µl, 30 másodpercig vortexelt baktériumszuspenziót pipettáztunk. Ezt követően a baktériumszuspenziót az elkészített munkalemezekre oltottuk úgy, hogy a kettes alapú hígítási sort tartalmazó lemezek 11. oszlopától kezdve visszafelé haladva minden lyukba 10 µl baktériumszuspenziót pipettáztunk a segédlemezről. A 11. oszlop pozitív kontrollként (baktériumszuspenziót és levest tartalmazott), míg a 12. oszlop negatív kontrollként (csak levest tartalmazott) szolgált.

A munkalemezeket 18-24 órán keresztül 41 °C-on inkubáltuk, majd vizuálisan elbíraltuk a MIC-értékeket a pozitív (11. oszlop) kontrollhoz képest. Az értékelés az alábbi szempontok szerint történt:

- +++ a baktériumtörzs szaporodása jelentős zavarosodást okozott
- ++ a baktériumtörzs szaporodása mérsékelt zavarosodást okozott
- + a baktériumtörzs szaporodása enyhe zavarosodást okozott
- ± a zavarosság nehezen ítéltető meg, nem biztos a baktérium szaporodása
- nincs zavarosodás

Az eredmények értékelése során a - és ± jelöléssel ellátott eredményeket tekintettük negatívnak, míg a +, ++, +++ jelölésű eredmények pozitív eredménynek minősültek.

4.4. Az *Enterococcus* spp. izolátumok érzékenységeinek a meghatározása

Az izolátumok érzékenységeinek kiértékelése során a CLSI által meghatározott klinikai határértékeket vettük figyelembe [34, 64–69]. Ezek a paraméterek ugyanis a kórokozó érzékenységeinek vizsgálata során a hatóanyag farmakokinetikai és farmakodinámiai jellemzőit is figyelembe veszik, ezáltal pontosan meg tudjuk ítélni a terápiás hatékonyságot. Ezzel szemben az EUCAST által meghatározott epidemiológiai határértékek (ECOFF) alapján [70] csupán annyit tudunk meghatározni, hogy a vizsgált baktérium a vad típusba tartozik, vagy pedig rendelkezik valamilyen szerzett és kifejeződő rezisztencia

mechanizmussal. Így elmondható, hogy önmagában az ECOFF érték alapján, nem tudnánk olyan pontosan megbecsülni a klinikai hatékonyságot, mint a CLSI által meghatározott klinikai határértékek segítségével. A CLSI azonban mindeközéig nem határozott meg klinikai határértékeket baromfi eredetű patogénekkel szemben, így vizsgálatunk során – a szakirodalomhoz hasonlóan – humán *Enterococcus* spp. vonatkozásában meghatározott klinikai határértékeket vettünk alapul. Néhány hatóanyag esetén azonban humán eredetű klinikai határértékek sem érhetőek el a szakirodalomban, így ezen antibiotikumok kiértékelését nem végeztük el.

4.5. Új generációs szekvenálás és bioinformatikai adatfeldolgozás

A baktériumokból származó DNS-t a QIAmp DNS-kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk gyártói protokoll szerint. A DNS-ből létrehozott párosított leolvasási szekvenciák (paired-end readok) vizsgálata Illumina NextSeq szekvenátorral történt [71].

A nyers szekvenciák minőségellenőrzését a FastQC v0.11.9 [72] szoftver segítségével, valamint TrimGalore v0.6.6 [73] segítségével a nem kielégítő minőségű szakaszok szűrését hajtottuk végre. A leolvasási szekvenciákat (read-eket) hosszabb szekvenciákká (kontigokká) a MEGAHIT v1.2.9 [74] szoftver segítségével illesztettük össze. Az így kapott kontigokból meghatároztuk az összes lehetséges leolvasási keretet (ORF, *Open Reading Frame*) a Prodigal v2.6.3 segítségével [75], ezek bázissorrendje szerint származtattuk a fehérjeszekvenciákat, majd a Resistance Gene Identifier (RGI) v5.1.0 szoftver segítségével összehasonlítottuk a CARD adatbázisban [76] található antimikrobiális rezisztencia gén (ARG) szekvenciákkal (letöltve: 2023.05.08). Az eredmények közül a legalább strict minősítésűeket hagytuk meg, tehát eléri a CARD adatbázis meghatározott küszöbértékét.

Vizsgáltuk a rezisztencia gének mobilitását, ehhez a MobileElementFinder v1.0.3 szoftvert [77] használtuk, amely a kontigokon prediktálja a mobilis genetikai elemeket (MGE, *Mobile Genetic Element*). Azokat az ARG-eket tekintettük potenciálisan mobilisnak, amelyek az MGE-khez az adatbázisban *Enterococcus* spp.-re jellemző leghosszabb kompozit transzpozon távolságán belül voltak a kontigon. Vizsgáltuk a plazmidon való kódolást a PlasFlow v1.1 szoftver segítségével, a fág genomok kontigokon való jelenlétét pedig a VirSorter v2.2.2 [79] szoftver segítségével néztük.

Az azonosított rezisztencia géneket a *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) adatbázis információival hasonlítottuk össze. Az adatok közül a 95% feletti lefedettséggel és szekvencia azonossággal rendelkezőket vettük figyelembe. Az adatbázisból meghatároztuk az egyes rezisztencia gének okozta rezisztencia mechanizmust, és hogy mely antibiotikum csoportok esetén vezet a gén jelenléte rezisztenciához.

5. EREDMÉNYEK

5.1. A vizsgált antibakteriális hatóanyagok és *Enterococcus* spp. izolátumok

Vizsgálatunk során magyarországi baromfiállományokból származó 969 *Enterococcus* spp. baktérium érzékenységét vizsgáltuk. Az izolátumok érzékenységét először amoxicillin, neomicin, oxitettraciklin, doxiciklin, florfenikol, tilozin, tilmikozin, linkomicin, tiamulin, kolisztin, enrofloxacin és szulfametoxazol-trimetoprim hatóanyagokkal szemben határoztuk meg. A vizsgálatot követően, 218 olyan baktérium izolátumot válogattunk ki, amelyek MIC-értéke a hatóanyagokkal szemben nagy volt és ezen előszűrt izolátumok további érzékenységét határoztuk meg amoxicillin-klavulánsavval, imipenemmel, ceftriaxonnal, spektinomicinnel, azitromicinnel, linezoliddal és vankomicinnel szemben. A vizsgált baktériumok közül 126 izolátum házityúkból, 92 izolátum pedig pulykából származott. A vizsgált izolátumok közül 47 törzset faj szinten is meghatároztunk, ezek összesen 10 féle *Enterococcus* faj közé sorolhatóak be. *E. gallinarum* és *Enterococcus malodoratus* esetén 1-1, *E. cecorum* esetén 2, *Enterococcus raffinosus* esetén 3, *E. avium*, *E. mundtii* és *E. sacharolyticus* esetén 4-4-4, *Enterococcus pseudoavium* esetén 5, *Enterococcus columbae* esetén 6, *E. faecium* esetén 9, *E. faecalis* esetén 14, *E. durans/hirae* esetén pedig 30 baktériumtörzs érzékenységét határoztuk meg.

5.2. Az *Enterococcus* spp. izolátumok érzékenysége baromfifélékre engedélyezett hatóanyagokkal szemben

A vizsgált 19 hatóanyag közül 12 hatóanyag van engedélyezve baromfifélék bakteriális fertőzéseinek a kezelésére: amoxicillin, neomicin, oxitettraciklin, doxiciklin, tilozin, tilmikozin, linkomicin, tiamulin, florfenikol, enrofloxacin, kolisztin és szulfametoxazol-trimetoprim. A hatóanyagok érzékenységi vizsgálatának az eredményeit a **2. táblázat** foglalja össze.

Amoxicillinnel szemben a vizsgált *Enterococcus* spp. izolátumok 67,0%-a érzékenyek, 33%-a pedig rezisztensnek bizonyult, a MIC₉₀-érték pedig 512 µg/ml volt. Oxitettraciklinnel szemben az izolátumok 28,9%-a érzékeny, 1,8%-a mérsékelten érzékeny, míg 69,3%-a rezisztensnek bizonyult, a MIC₉₀-érték pedig 256 µg/ml volt. A doxiciklin hatóanyag esetén a vizsgált baktériumok 34,4%-a érzékeny, 12,8%-a mérsékelten érzékeny, 52,8%-a pedig rezisztens volt, a MIC₉₀-érték pedig 64 µg/ml volt. Az izolátumok 31,7%-a érzékenyek, 0,9%-a mérsékelten érzékenyek, 67,4%-a pedig rezisztensnek bizonyult tilozinnal szemben, a MIC₉₀-érték pedig >512 µg/ml volt. Linkomicinnel szemben a vizsgált izolátumok csupán 1,4%-a bizonyult érzékenyek, míg 0,9%-a mérsékelten érzékeny,

97,7%-a pedig a rezisztens kategóriába tartozott, a MIC₉₀-érték pedig >512 µg/ml volt. Florfenikol esetén a vizsgált baktériumok 5,0%-a volt érzékeny, 34,4%-a mérsékelten érzékeny, 60,6%-a pedig rezisztens, a MIC₉₀-érték pedig 64 µg/ml volt. Enrofloxacin esetén az izolátumok 45,9%-a érzékeny, 11,9%-a mérsékelten érzékeny, 42,2%-a pedig rezisztensnek bizonyult, a MIC₉₀-érték pedig 32 µg/ml volt. Neomicin, tilmikozin, tiamulin, kolisztin és potenciált szulfonamid esetén nem állnak rendelkezésre klinikai határértékek. Ezen hatóanyagok MIC₉₀-értéke egyöntetűen >512 µg/ml volt. A baromfifélékre engedélyezett hatóanyagok MIC-értékeinek megoszlását az **5-16. ábrák** szemléltetik.

5.3. Az *Enterococcus* spp. izolátumok érzékenysége a humán egészségügyben engedélyezett hatóanyagokkal szemben

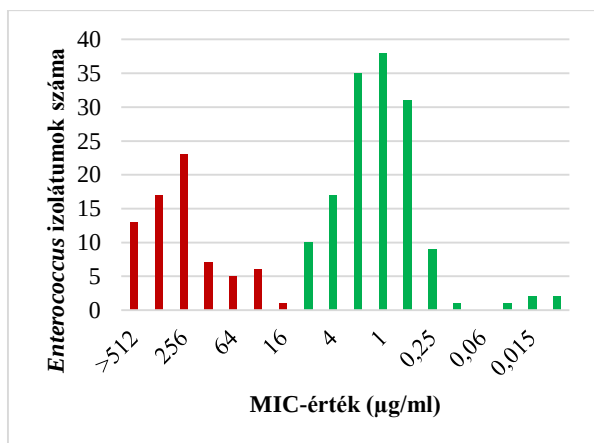
A vizsgált 19 hatóanyag közül 7 csupán a humán egészségügyben van engedélyezve és az állatgyógyászatban csupán off-label vagy egyáltalán nem lehet őket alkalmazni: amoxicillin-klavulánsav, imipenem, ceftriaxon, spektinomycin, azitromicin, vankomicin és linezolid. A hatóanyagok érzékenységi vizsgálatának az eredményeit a **3. táblázat** foglalja össze.

Amoxicillin-klavulánsavval szemben a vizsgált *Enterococcus* spp. izolátumok 82,6%-a érzékeny, 3,7%-a mérsékelten érzékeny, 13,8%-a pedig rezisztens volt, míg a MIC₉₀-érték 32 µg/ml volt. Imipenem vonatkozásában a vizsgált izolátumok közül 92,7% volt érzékeny, 7,3% pedig rezisztens, a MIC₉₀-érték pedig 4 µg/ml volt. Az izolátumok 33,5%-a érzékeny, 4,1%-a mérsékelten érzékeny, 62,4%-a pedig rezisztens volt azitromicin esetén, a MIC₉₀-érték pedig 128 µg/ml volt. Vankomicin esetén az izolátumok 75,2%-a érzékeny, 9,2%-a mérsékelten érzékeny, 15,6%-a pedig rezisztensnek bizonyult, a MIC₉₀-érték pedig 256 µg/ml volt. Linezolid esetén az izolátumok 63,8%-a érzékeny, 17,0%-a mérsékelten érzékeny, 19,3%-a pedig rezisztens volt, a MIC₉₀-érték pedig 128 µg/ml volt. Ceftriaxon és spektinomycin esetén nem állnak a rendelkezésünkre klinikai határértékek. Ezen hatóanyagok MIC₉₀-értéke egyaránt >512 µg/ml volt. A humán gyógyászatban engedélyezett hatóanyagok MIC-értékeinek megoszlását az **17-23. ábrák** szemléltetik.

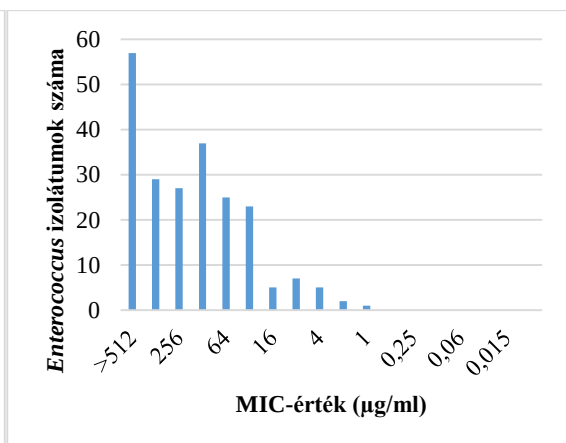
2. táblázat A vizsgált *Enterococcus* izolátumok MIC-értékeinek megoszlása baromfifélékre engedélyezett hatóanyagokra, valamint MIC₅₀ és MIC₉₀ értékei. Hatóanyagoként a felső sorok a darabszámot, az alsó sorok a százalékos megoszlást mutatják. A piros függőleges vonalak a rezisztencia határt jelölik a CLSI ajánlása szerint [34, 64–69].

Hatóanyag	Breakpoint* (µg/ml)	>512	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	<0,015	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)						
Amoxicillin	≥16	13	17	23	7	5	6	1	10	17	35	38	31	9	1	1	2	2		2	512						
		6,0	7,8	10,6	3,2	2,3	2,8	0,5	4,6	7,8	16,1	17,4	14,2	4,1	0,5		0,5	0,9	0,9								
Neomicin	-	57	29	27	37	25	23	5	7	5	2	1											256	>512			
		26,1	13,3	12,4	17,0	11,5	10,6	2,3	3,2	2,3	0,9	0,5															
Oxitetraciklin	≥16	2	7	35	49	25	19	14	4	6	15	18	17	5	1	1				64	256						
		0,9	3,2	16,1	22,5	11,5	8,7	6,4	1,8	2,8	6,9	8,3	7,8	2,3	0,5	0,5											
Doxiciklin	≥16		1	1	6	25	33	49	28	28	14	17	2	6	4	1	1	1	1	16	64						
			0,5	0,5	2,8	11,5	15,1	22,5	12,8	12,8	6,4	7,8	0,9	2,8	1,8	0,5	0,5	0,5	0,5								
Tilozin	≥32	73	44	19	9	1	1	2	7	13	23	22	4											512	>512		
		33,5	20,2	8,7	4,1	0,5	0,5	0,9	3,2	6,0	10,6	10,1	1,8														
Tilmikozin	-	45	11	20	17	13	16	13	4	31	36	5	4											32	>512		
		20,6	5,0	9,2	7,8	6,0	7,3	6,0	1,8	14,2	16,5	2,3	1,8														
Linkomicin	≥8	85	42	12	25	32	4	10	2	2	3	1											512	>512			
		39,0	19,3	5,5	11,5	14,7	1,8	4,6	0,9	0,9	1,4	0,5															
Tiamulin	-	33	60	54	49	13	4	1	1	1	1	1	1											256	>512		
		15,1	27,5	24,8	22,5	6,0	1,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5														
Florfenikol	≥8		1	4	12	5	15	22	73	75	11											8	64				
			0,5	1,8	5,5	2,3	6,9	10,1	33,5	34,4	5,0																
Enrofloxacin	≥4	1	1	3	5	5	7	28	25	17	26	46	31	14	2	1	5	1		2	32						
		0,5	0,5	1,4	2,3	2,3	3,2	12,8	11,5	7,8	11,9	21,1	14,2	6,4	0,9	0,5	2,3	0,5									
Kolisztin	-	133	46	10	9	3	3	3	1	4	3	3	2	1											>512	>512	
		61,0	21,1	4,6	4,1	1,4	0,0	1,4	0,5	1,8	1,4	1,4	0,9	0,5													
Szulfametoxazol-trimetoprim+	-	62	25	9	15	2	5	18	22	15	18	16	8	1	2											128	>512
		28,4	11,5	4,1	6,9	0,9	2,3	8,3	10,1	6,9	8,3	7,3	3,7	0,5	0,9												

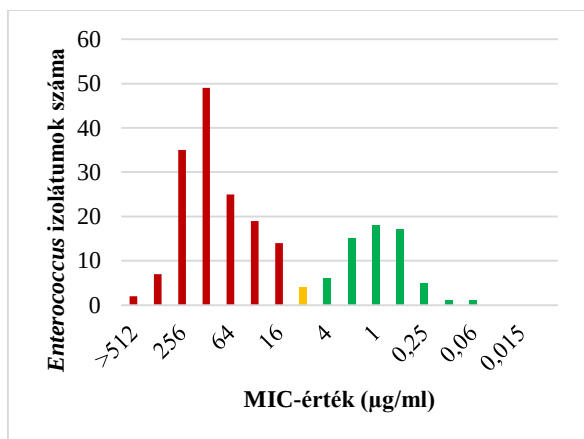
*CLSI; +szulfametoxazol és trimetoprim 20:1 arányban



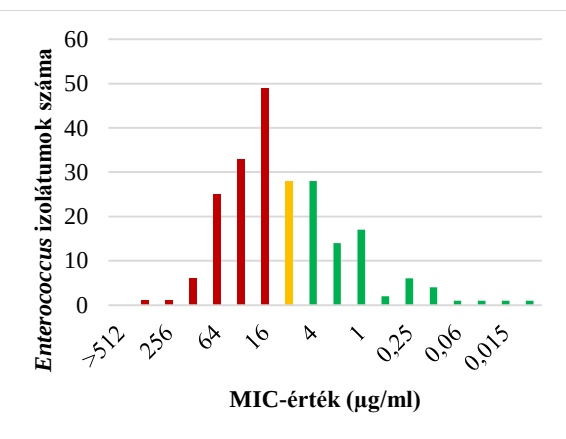
1. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok amoxicillinnel szemben mért MIC-értékeinek megoszlása. Zöld – érzékeny, piros – rezisztens.



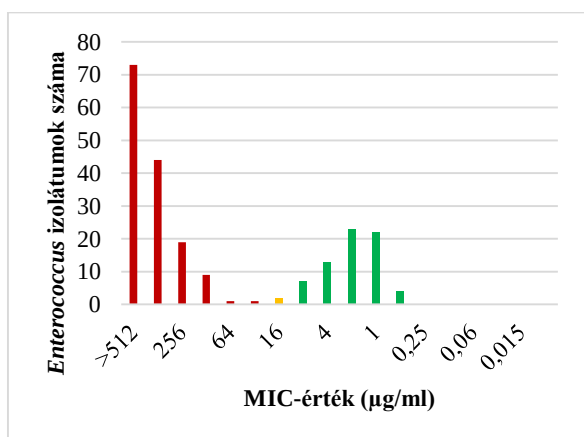
6. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok neomicinnel szemben mért MIC-értékeinek megoszlása.



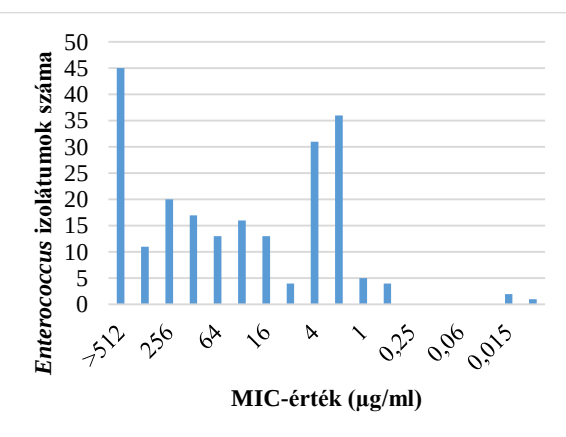
7. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok oxitetraciklinnel szemben mért MIC-értékeinek megoszlása. Zöld – érzékeny, sárga – mérsékelten érzékeny, piros – rezisztens.



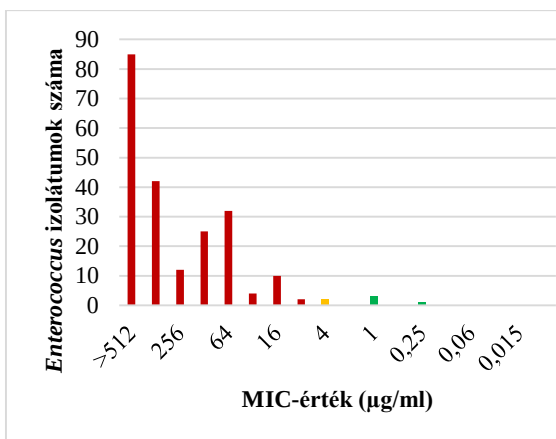
8. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok doxyciklinnel szemben mért MIC-értékeinek megoszlása. Zöld – érzékeny, sárga – mérsékelten érzékeny, piros – rezisztens.



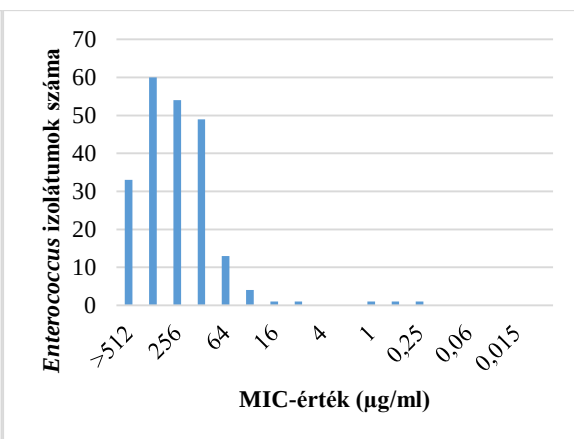
9. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok tilizinnel szemben mért MIC-értékeinek megoszlása. Zöld – érzékeny, sárga – mérsékelten érzékeny, piros – rezisztens.



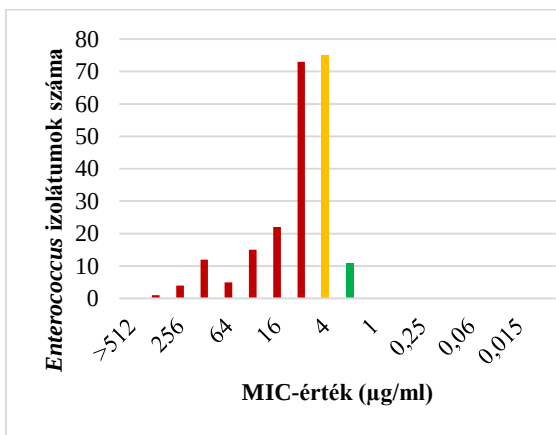
10. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok tilmikozinnal szemben mért MIC-értékeinek megoszlása.



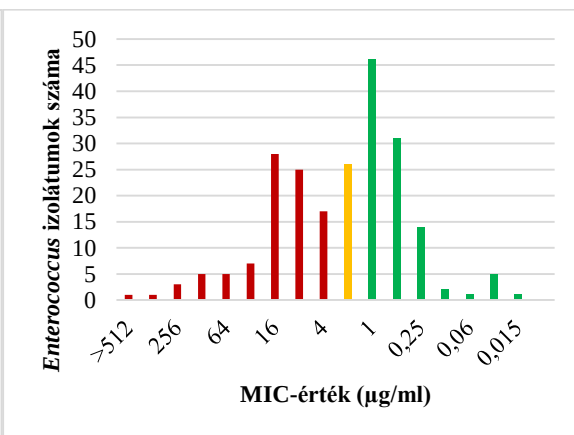
11. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok linkomicinnel szemben mért MIC-értékeinek megoszlása. Zöld – érzékeny, sárga – mérsékelten érzékeny, piros – rezisztens.



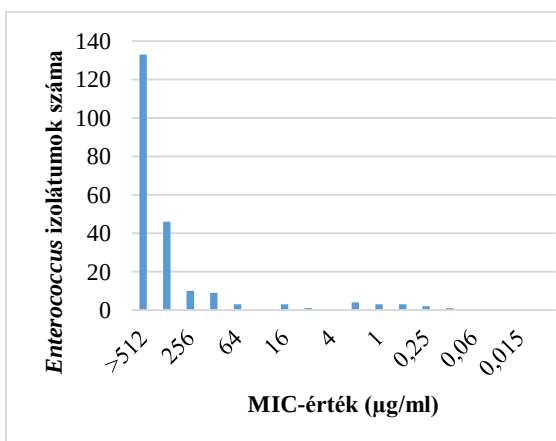
12. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok tiamulinnal szemben mért MIC-értékeinek megoszlása.



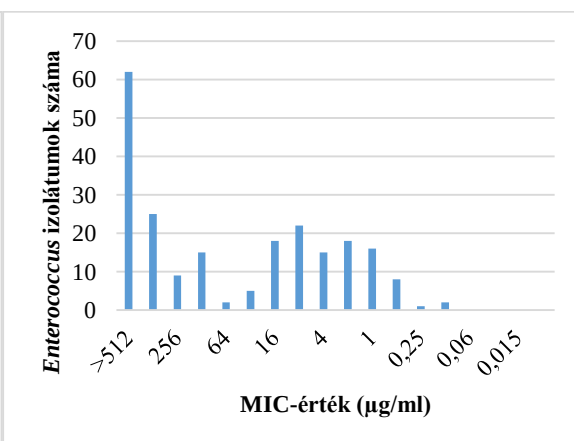
13. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok florfenikollal szemben mért MIC-értékeinek megoszlása. Zöld – érzékeny, sárga – mérsékelten érzékeny, piros – rezisztens.



14. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok enrofloxacinnal szemben mért MIC-értékeinek megoszlása. Zöld – érzékeny, sárga – mérsékelten érzékeny, piros – rezisztens.



15. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok kolisztinnel szemben mért MIC-értékeinek megoszlása.

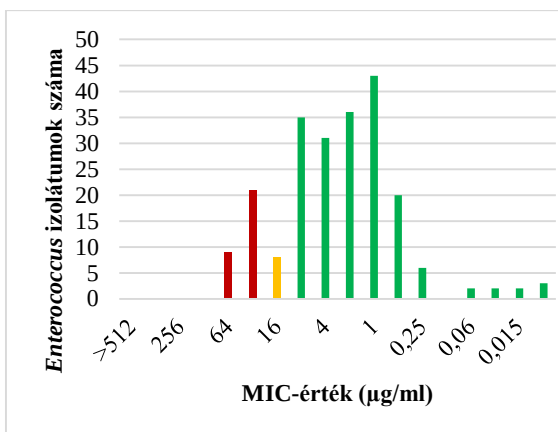


16. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok szulfametoxazol-trimetoprimmal szemben mért MIC-értékeinek megoszlása.

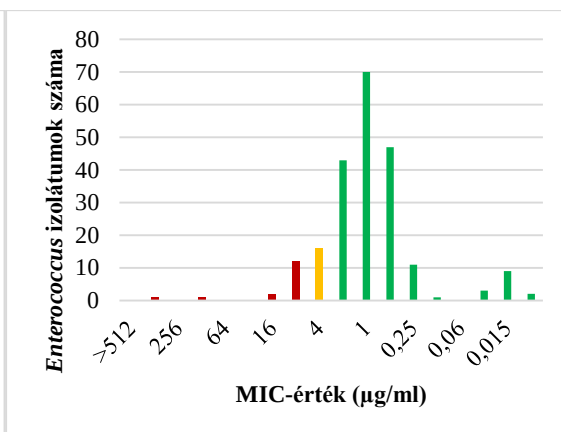
3. táblázat A vizsgált *Enterococcus* izolátumok MIC-értékeinek megoszlása a humán gyógyászatban engedélyezett hatóanyagokra, valamint MIC₅₀ és MIC₉₀ értékei. Hatóanyagokként a felső sorok a darabszámot, az alsó sorok a százalékos megoszlást mutatják. A piros függőleges vonalak a rezisztencia határt jelölik a CLSI ajánlása alapján [34, 64–69].

Hatóanyag	Breakpoint* (µg/ml)	>512	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	<0,015	MIC ₅₀ (µg/ml)	MIC ₉₀ (µg/ml)													
Amoxicillin- klavulánsav+	≥32											9	21	8	35	31	36	43	20	6	2	2	3	2	32									
												4,1	9,6	3,7	16,1	14,2	16,5	19,7	9,2	2,8	0,0	0,9	0,9	1,4										
Imipenem	≥8											1	1	2	12	16	43	70	47	11	1	3	9	2	1	4								
												0,5	0,5	0,9	5,5	7,3	19,7	32,1	21,6	5,0	0,5	1,4	4,1	0,9										
Ceftriaxon	-											63	47	27	21	8	3	11	10	4	2	2	7	3	4	3	2	1	256					
												28,9	21,6	12,4	9,6	3,7	1,4	5,0	4,6	1,8	0,9	0,9	3,2	1,4	1,8	1,4	0,9	0,5						
Spektinomycin	-											32	26	41	40	58	18	3											128	>512				
												14,7	11,9	18,8	18,3	26,6	8,3	1,4																
Azitromicin	≥8											17		35	26	12	24	22	9	8	15	10	6	5	2	11	16	16	128					
												7,8		16,1	11,9	5,5	11,0	10,1	4,1	3,7	6,9	4,6	2,8	2,3	0,9	5,0	7,3							
Vankomicin	≥32	5	13	12	3	1	6	15	21	28	72	31	5	4											2	1	256							
		2,3	6,0	5,5	1,4	0,5	2,8	6,9	9,6	12,8	33,0	14,2	2,3	1,8											0,9									
Linezolid	≥8											4	13	6	5	7	5	2	37	111	23	3											2	128
												1,8	6,0	2,8	2,3	3,2	2,3	0,9	17,0	50,9	10,6	1,4											0,9	

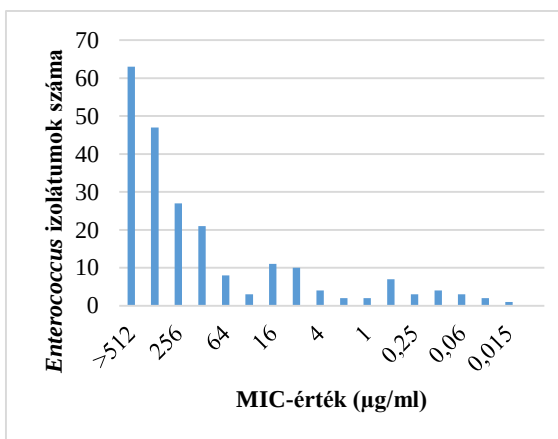
*CLSI; +4:1 arányban



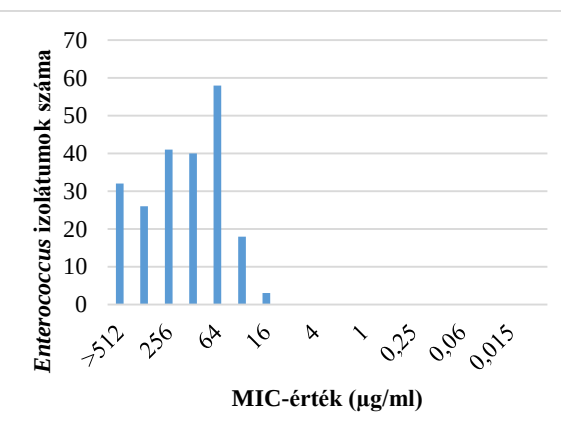
17. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok amoxicillin-klavulánsavval szemben mért MIC-értékeinek megoszlása. Zöld – érzékeny, sárga – mérsékelten érzékeny, piros – rezisztens.



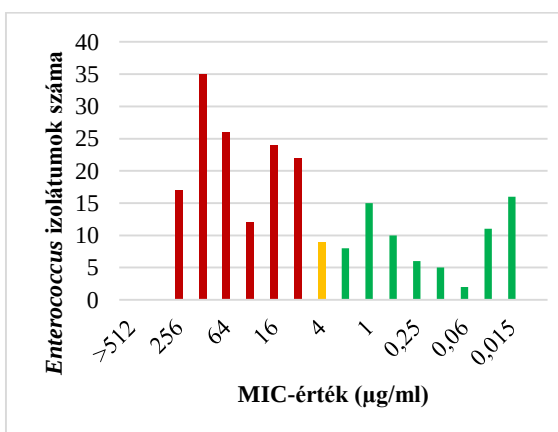
18. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok imipenemmel szemben mért MIC-értékeinek megoszlása. Zöld – érzékeny, sárga – mérsékelten érzékeny, piros – rezisztens.



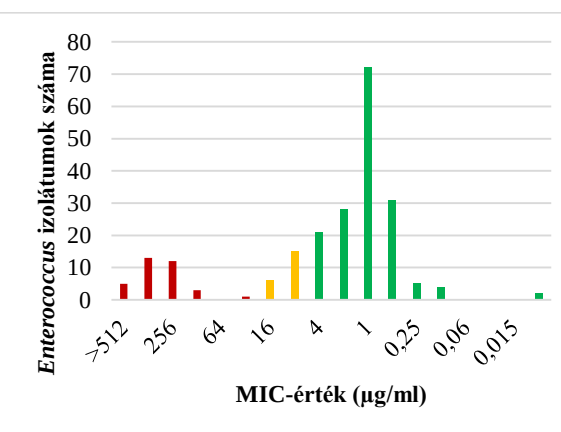
19. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok ceftriaxonnal szemben mért MIC-értékeinek megoszlása.



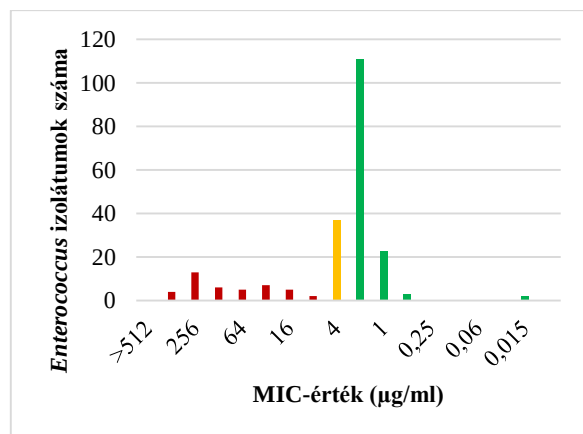
20. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok spektinomocinnal szemben mért MIC-értékeinek megoszlása.



21. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok azitromicinnal szemben mért MIC-értékeinek megoszlása. Zöld – érzékeny, sárga – mérsékelten érzékeny, piros – rezisztens.



22. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok vankomicinnal szemben mért MIC-értékeinek megoszlása. Zöld – érzékeny, sárga – mérsékelten érzékeny, piros – rezisztens.



23. ábra: Az *Enterococcus* spp. izolátumok linezollal szemben mért MIC-értékeinek megoszlása. Zöld – érzékeny, sárga – mérsékeltén érzékeny, piros – rezisztens.

5.4. A vizsgált *Enterococcus* spp. izolátumok megoszlása az EUCAST epidemiológiai határértékei alapján

Az EUCAST által meghatározott epidemiológiai határértékek alapján [70] amoxicillinnel szemben a vizsgált *Enterococcus* spp. izolátumok 45,4%-a, doxiciklinnel szemben az izolátumok 93,6%-a, florfenikollal szemben 60,6%-a, imipenemmel szemben 14,7%-a, linezollal szemben 36,2%-a, neomicinnel szemben 80,3%-a, oxitettraciklinnel szemben 71,1%-a, vankomicinnel szemben pedig 34,9%-a tartozott a nem vad típusú csoportba. Ezeket a megállapításokat a **4. táblázat** foglalja össze.

4. táblázat: Az EUCAST által meghatározott epidemiológiai határértékek (ECOFF) a vizsgált hatóanyagok vonatkozásában és a nem vad típusú (NVD) izolátumok megoszlása darabszám és százalék szerint az adott hatóanyag kapcsán.

Hatóanyag	ECOFF	NVD	
		db	%
Amoxicillin	≥ 4	99	45,4
Doxiciklin	$\geq 0,5$	204	93,6
Florfenikol	≥ 8	132	60,6
Imipenem	≥ 4	32	14,7
Linezolid	≥ 4	79	36,2
Neomicin	≥ 64	175	80,3
Oxitettraciklin	≥ 8	155	71,1
Vankomicin	≥ 4	76	34,9

Ahol az adott hatóanyag esetén klinikai és epidemiológiai határértékek is elérhetőek voltak, ott elvégeztük a két csoport összehasonlítását. Ez alapján azt a megállapítást tettük, hogy az ECOFF-értékek alapján több izolátum tartozott a nem vad típusú csoportba, mint ahány izolátum rezisztensnek minősült a CLSI ajánlása alapján az adott hatóanyaggal szemben. A két határérték közötti különbség jelöli azt a csoportot, amelynél már ugyan az izolátumok mutatnak bizonyos fokú rezisztenciát *in vitro* körülmények között, *in vivo* azonban az adott hatóanyag még sikeresen képes eliminálni a szervezetből a kórokozót, a hatóanyagra jellemző farmakokinetikai tulajdonságokból következően. A klinikai és epidemiológiai határértékek összehasonlítását az adott hatóanyagok vonatkozásában az **5. táblázat** szemlélteti.

5. táblázat: A CLSI által ajánlott klinikai határértékek szerinti rezisztens (R) izolátumok, valamint az EUCAST által ajánlott epidemiológiai határértékek szerinti nem vad típusú (NVD) izolátumok százalékos megoszlása az adott hatóanyagok kapcsán.

Hatóanyagok	R (%)	NVD (%)
Amoxicillin	33,0	45,4
Imipenem	7,3	14,7
Linezolid	19,2	36,2
Oxitetraciklin	69,3	71,1
Doxiciklin	52,8	93,6
Florfenikol	60,6	60,6

5.5. MDR, XDR és PDR izolátumok

Kutatásunk során a 218 *Enterococcus* spp. izolátum érzékenységét 9 antibiotikum csoporttal szemben vizsgáltuk. MDR kórokozóknak azokat az izolátumokat vettük, amelyek három, vagy több antibakteriális csoport, legalább egy hatóanyagával szemben rezisztenciát mutattak. Ezen kritérium alapján az izolátumok 89,9%-a (196 db) minősült MDR kórokozónak. Ebből a 196 izolátumból 8 olyan izolátumot találtunk, amely az általunk vizsgált antibiotikum csoportok közül legfeljebb kettővel szemben mutatott érzékenységet, így ezen izolátumok feltételezhetően XDR kórokozók, és 1 olyan baktériumot találtunk, amely az általunk vizsgált összes hatóanyaggal szemben rezisztens volt, vagyis vélhetően PDR kórokozó. A 196 MDR izolátum közül 34 (17,3%) három, 54 (27,5%) négy, 55 (28,1%) öt, 37 (18,9%) hat, 7 (3,6%) hét, 8 (4,1%) nyolc, 1 (0,5%) pedig kilenc hatóanyagcsoporttal szemben mutatott rezisztenciát. Az eredményeket a **6. táblázat** foglalja össze.

6. táblázat: A 196 multirezisztens (MDR) kórokozó megoszlása darabszám és százalékos érték alapján aszerint, hogy hány antibakteriális csoporttal szemben mutattak rezisztenciát.

Rezisztencia a hatóanyag csoportokkal szemben	Izolátumok (db)	Izolátumok (%)
MDR-3	34	17,3
MDR-4	54	27,5
MDR-5	55	28,1
MDR-6	37	18,9
MDR-7	7	3,6
MDR-8	8	4,1
MDR-9	1	0,5

5.6. Az MDR *Enterococcus* spp. izolátumok megoszlása régiók szerint

Az azonosított 196 MDR *Enterococcus* spp. izolátum közül 15 (7,6%) a dél-alföldi, 22 (11,2%) az észak-magyarországi, 25 (12,8%) a nyugat-dunántúli, 29 (14,8%) a közép-magyarországi, 31 (15,8%) az észak-alföldi, 35 (17,9%) a dél-dunántúli, 39 (19,9%) pedig a közép-dunántúli régióból származott. Az MDR izolátumok megoszlását régiók és a hatóanyagokkal szembeni rezisztencia alapján a **7. táblázat** foglalja össze.

7. táblázat: A multirezisztens (MDR) *Enterococcus* spp. izolátumok százalékos megoszlása régiók szerint az alapján, hogy hány antibakteriális csoporttal szemben mutattak rezisztenciát.

	DA	ÉM	ND	KM	ÉA	DD	KD	Összesen
MDR-3	1,0	4,6	3,1	3,6	2,1	0,0	3,1	17,5
MDR-4	1,0	5,6	4,1	3,6	6,1	4,1	3,1	27,6
MDR-5	1,5	0,5	4,1	4,6	3,6	7,1	6,6	28,0
MDR-6	2,0	0,5	1,0	3,1	2,0	4,6	5,6	18,8
MDR-7	1,0	0,0	0,5	0,0	0,5	0,0	1,5	3,5
MDR-8	1,0	0,0	0,0	0,0	1,5	1,5	0,0	4,0
MDR-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,5
Összesen	7,5	11,2	12,8	14,8	15,8	17,9	19,9	100,0

DA – Dél-Alföld, ÉM – Észak-Magyarország, ND – Nyugat-Dunántúl, KM – Közép-Magyarország, ÉA – Észak-Alföld, DD – Dél-Dunántúl, KD – Közép-Dunántúl

5.7. Rezisztencia gének

Az előzetes szűrések alapján 42 olyan törzset választottunk ki, melyek MDR törzsek voltak és vankomicinre és/vagy linezolidra rezisztenciát mutattak. Ezek közül öt törzs esetén találtunk kifejezetten olyan rezisztencia géneket (*vanC*, *vanR*, *vanS*, *vanT* és *vanXY*), amelyek kifejezetten vankomicin rezisztenciát okoznak (**8. táblázat**). Ezen kívül 14 törzs esetén mutattunk ki peptid antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát kódoló gént, efflux pumpák (*kpnH*, *kpnF*, *kpnE*, *tolC*, *yoiJ*) és antibiotikum célpont mutáció (*bacA*, *pmrF*, *liaS*, *eptA*, *ugd*) mechanizmusok révén.

8. táblázat Vankomicin rezisztenciát kódoló géneket tartalmazó törzsek és rezisztenciaprofiljuk. A szürkével kiemelt cellák a rezisztens értékeket mutatják (a CLSI ajánlása szerint). Ceftriaxon és spektinomycin vonatkozásában nem érhető el klinikai határérték.

Izolátum		VRE* gének					MIC (µg/ml)						
		<i>vanC</i>	<i>vanR</i>	<i>vanS</i>	<i>vanT</i>	<i>vanXY</i>	<i>VAN</i> (≥32)	CTR	AMK (≥32/16)	SPE	IMI (≥8)	AZI (≥8)	LIZ (≥8)
142	<i>E. durans/hirae</i>	x	x	x	x	x	512	1024	1	512	8	32	128
198	<i>E. gallinarum</i>	x		x	x	x	512	512	32	512	8	64	32
322	<i>E. durans/hirae</i>	x	x	x	x	x	512	1024	1	64	4	64	64
432	<i>E. faecium</i>	x					4	512	2	1024	2	128	2
444	<i>E. faecalis</i>	x	x	x	x	x	256	1024	1	1024	1	32	1

*Vankomicin rezisztens *Enterococcus*

VAN-vankomicin; CTR-ceftriaxon; AMK-amoxicillin-klavulánsav; SPE-spektinomycin; IMI-imipenem; AZI-azitromicin; LIZ-linezolid

A *vanC* klaszter *Enterococcus gallinarum* esetén öt génből áll, ezek a *vanC*, *vanR*, *vanS*, *vanT* és *vanXY*. Ezek közül három meglete elegendő a rezisztencia kialakulásához [80]. A *vanC* egy D-Ala-D-Ala ligáz homológ gén, ami D-Ala-D-Ser-t szintetizál, a peptidoglikán szintézis alternatív szubsztátját, amely csökkenti a vankomicin kötődési affinitását a célponthoz. Az *Enterococcus gallinarum* és az *Enterococcus casseliflavus* fajokra specifikus, ami belső (*intrinsic*) rezisztenciát alakít ki [81]. A *vanXY* egy d,d-dipeptidáz-karboxipeptidáz jelöl, amely hidrolizálja a d-Ala-d-Ala-t és eltávolítja a d-Ala-t az UDP-MurNAc-pentapeptidből (d-Ala), a *vanT* pedig egy membránhoz kötött szerin racemázt kódol, amely a d-Ser-t biztosítja a szintézis útvonalához. A *vanS* és *vanR* gének kétkomponensű szabályozó rendszerként homológiát mutató fehérjéket jelölnek [80].

Az előzetes szűrés során leszűrt 42 db MDR törzs közül 18 olyan törzset találtunk fenotípusosan vizsgálva, amelyek rezisztenciát mutattak linezolidra. A metagenomikai vizsgálatok során viszont kifejezetten linezolid rezisztenciát okozó gént nem sikerült azonosítanunk (9. táblázat).

A *catA4* gén egy klóramfenikol-acetiltranszferáz jelöl, amely rezisztenciát okoz klóramfenikollal szemben [82]. A *TEM-1* gén egy kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) jelöl. Rezisztenciát alakít ki a penicillinekkal és az első generációs cefalosporinokkal szemben [83, 84].

9. táblázat A linezolid rezisztenciával összefüggésbe hozható más rezisztencia géneket hordozó törzsek és azok rezisztencia profilja. A szürkével kiemelt cellák a rezisztens értékeket mutatják (a CLSI ajánlása szerint). Ceftriaxon és spektinomycin vonatkozásában nem érhető el klinikai határérték.

Izolátum		Linezolid rezisztencia összefüggés, ARG (db)				MIC (µg/ml)						
		Aminoglikozidok	Fenikolok	catA4*	β-laktamáz	LIZ (≥8)	AMK (≥32/16)	CTR	SPE	IMI (≥8)	AZI (≥8)	VAN (≥32)
18	<i>E. faecium</i>	6	2	x	TEM-1 ¹	32	0,001	1024	128	0,5	4	2
142	<i>E. durans/hirae</i>	2	2	x		128	1	1024	512	8	32	512
153	<i>Enterococcus spp.</i>	1				128	1	512	128	2	128	1
189	<i>Enterococcus spp.</i>	2	2	x		2	8	512	1024	1	4	2
198	<i>E. gallinarum</i>	4	2	x		32	32	512	512	8	64	512
243	<i>E. mundtii</i>	5	6		MIR-3	512	8	256	512	1	64	512
245	<i>E. mundtii</i>	8	6		MIR-16 OXA-10	512	64	512	1024	2	32	512
254	<i>E. mundtii</i>	4	6		MIR-3	512	1	0,5	512	2	16	512
301	<i>Enterococcus spp.</i>	8	10		EC-15	256	32	0,5	32	0,5	64	0,5
313	<i>E. durans/hirae</i>	2				64	32	0,125	512	0,003	1	2
322	<i>E. durans/hirae</i>	2	2	x		64	1	1024	64	4	64	512
328	<i>Enterococcus spp.</i>	2	3	x		16	1	1024	512	1	64	512
391	<i>Enterococcus spp.</i>	10	10		EC-18 TEM-1 ^{1,2}	256	2	512	256	0,25	128	256
399	<i>E. faecium</i>	5				256	32	512	512	128	128	128
434	<i>Enterococcus spp.</i>	11	12		EC-18 TEM-1 ^{1,2}	256	64	256	1024	0,125	16	256
447	<i>Enterococcus spp.</i>	11	12		EC-18 TEM-1 ^{1,2}	128	32	256	1024	0,5	8	1
450	<i>E. durans/hirae</i>	2	2	x		16	32	256	512	4	64	512
543	<i>E. faecalis</i>	2				128	32	1024	1024	0,5	64	1

*klóramfenikol antimikrobiális rezisztencia gén (ARG); ¹plazmidon kódolt; ²mobilis genetikai elem

VAN-vankomicin; CTR-ceftriaxon; AMK-amoxicillin-klavulánsav; SPE-spektinomycin; IMI-imipenem; AZI-azitromicin; LIZ-linezolid

A MIR gének általában plazmid mediált β-laktamáz gének [85], amelyek az *ampC* típusú β-laktamázok közé tartozó, főleg szabályozásban résztvevő enzimeket takarnak [86]. Az OXA-10 oxacillináz termelésért felelős, Ambler D és Bush-Jacoby 2d csoportba sorolt gén, amely kiterjedt spektrumú cefalosporináz enzim [87–89]. Az EC-15 és EC-18 gének C osztályú, *ampC* típusú β-laktamázok [76, 90].

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Az általunk gyűjtött 218 *Enterococcus* spp. izolátum érzékenységét 19 hatóanyaggal szemben határoztuk meg. Ebből 12 hatóanyag kapcsán elérhető a baromfi ágazatban engedélyezett állatgyógyászati készítmény. Amoxicillin, oxitetraciklin, doxiciklin, florfenikol, tilozin, linkomicin és enrofloxacin vonatkozásában elérhetőek a szakirodalomban a CLSI ajánlása alapján meghatározott klinikai határértékek [34, 64–69]. Az állatgyógyászatban használt ezen hatóanyagok közül a legnagyobb mértékű rezisztenciát linkomicin esetén tapasztaltunk (97,7%), amely hasonló eredmény ahhoz, mint amit Maasjost és mtsai. publikáltak és a MIC₉₀-érték is (>512 µg/ml) hasonló az általuk leírtakhoz [66]. Oxitetraciklinnel szemben az általunk vizsgált izolátumok 69,3%-a mutatott rezisztenciát, a MIC₉₀-érték pedig 256 µg/ml volt, ezzel szemben Maasjost és mtsai. [66] tetraciklinnel szemben 128 µg/ml-es MIC₉₀-értéket állapítottak meg, és 82%-os rezisztenciáról számoltak be. Egy litván felmérésben az izolátumok 75,6%-a [68], egy kínai felmérésben pedig a baktériumok 91,0%-a volt rezisztens a tetraciklinekkel szemben [69]. Ezzel szemben egy brazil felmérésben Fracalanza és mtsai. által vizsgált *Enterococcus* törzsek 31,2%-a volt csupán rezisztens tetraciklinekkel szemben [91], és ehhez hasonló eredményeket írtak le Banik és mtsai. [92], valamint Roy és mtsai. [93] is. Doxiciklin esetén az általunk vizsgált izolátumok 52,8%-a bizonyult rezisztensnek, amely mérsékeltőbb annál, mint amit Stępień-Pyśniak és mtsai. (67,3%) [94] és Dolka és mtsai. (83%) [95] publikáltak. Tilozinnal szemben az általunk vizsgált *Enterococcus* spp. izolátumok 67,4%-a mutatott rezisztenciát, amely némileg kedvezőbb, mint amit Stępień-Pyśniak és mtsai. publikáltak (71,4%) [94], de nagyobb mértékű, mint Maasjost és mtsai. felmérésében (44%) [66]. Florfenikollal szemben az izolátumok 60,6%-a volt rezisztens, amely jóval nagyobb mértékű, mint amit Liu és mtsai. korábban leírtak (26,9%) [69]. Enrofloxacin vonatkozásában az általunk vizsgált izolátumok 42,2%-a volt rezisztens, amelytől csupán Liu és mtsai. írtak le jobb eredményt (30,7%) [69], míg Stępień-Pyśniak és mtsai. 69,4%-os [94], Dolka és mtsai. pedig 87%-os [95] rezisztenciáról számoltak be. Az általunk vizsgált hatóanyagok közül az amoxicillin bizonyult a leghatékonyabbnak, az izolátumok 33,3%-a volt rezisztens. Ez azonban így is kimagaslóan rossz eredménynek számít, a szakirodalomban ugyanis ampicillinnel szemben közel 100%-os érzékenységről számoltak be korábban [66, 69, 91, 93]. Neomicin, tilmikozin, tiamulin, kolisztin és potenciált szulfonamid kapcsán nem érhetőek el klinikai határértékek, azonban a nagy MIC₉₀-érték alapján (>512 µg/ml) nagy arányú rezisztenciát feltételezhetünk.

Bár az amoxicillin-klavulánsav kombináció kapcsán találhatunk engedélyezett állatgyógyászati készítményeket, azonban a baromfiágazatban jelenleg még nincs engedélyezve ez a kombináció. Ezért is különösen meglepő, hogy az általunk vizsgált *Enterococcus* spp. izolátumok 30,0%-a rezisztensnek bizonyult, a MIC₉₀-érték pedig 32 µg/ml volt. Ezzel szemben Maasjost és mtsai. 100%-os érzékenységről és 1 µg/ml-es MIC₉₀-értékről számoltak be [66]. Azitromicinnel szemben az általunk vizsgált izolátumok 62,4%-a volt rezisztens, amely némileg kedvezőbb, mint amelyről Banik és mtsa. korábban beszámoltak (77,3%) [92]. Imipenem kapcsán csupán az izolátumok 7,3%-a esetén tapasztaltunk rezisztenciát, amely érték megfelel a szakirodalomban leírtaknak – Fracalanza és mtsai. 1,1%-os [91] rezisztenciát írtak le, Banik és mtsai. pedig nem azonosítottak imipenem rezisztens törzseket a felmérésük során [92]. Roy és mtsai. ezzel szemben bangladesi felmérésük során imipenemmel kapcsolatban 55,6%-os rezisztenciáról számoltak be [93]. Spektinomycin kapcsán nem érhető el klinikai határérték az irodalomban, azonban aggodalomra ad okot, hogy a MIC₉₀-érték >512 µg/ml volt, amely nagyfokú rezisztenciát feltételez. A ceftriaxonnal szemben az *Enterococcus* spp. *ab ovo* rezisztensek.

A vankomicin és a linezolid a humán gyógyászatban használt, kritikusan fontos antibiotikumok, amelyek érzékenységének megőrzése a kórokozókkal szemben a közegészségügy szempontjából kimagasló jelentőséggel bír. Éppen ezért aggodalomra ad okot, hogy az általunk vizsgált izolátumok 15,6%-a volt rezisztens vankomicinnel szemben, 19,3% pedig linezoliddal kapcsolatban mutatott rezisztenciát, a MIC₉₀-értékek pedig 256 és 128 µg/ml voltak. Wada és mtsai. [96] Malajziában a vankomicin rezisztens enterococcusok prevalenciáját 24%-ra becsülték, míg Nilsson és mtsai. 11%-ban mutattak ki VRE törzseket Svédországban, ezek mindegyike *vanA* gént hordozó *E. faecium* volt [97], míg mi ezen izolátumok esetén *vanC* gént azonosítottunk. O’Dea és mtsai. ausztrál brojlercsirkékből izolált *E. faecium* törzsek esetén linezolidra csupán 1,3%-os rezisztenciát határoztak meg, vankomicin rezisztenciát nem mutattak ki, az MDR törzsek aránya pedig 23,4% volt, míg nálunk ez az arány 89,9% lett. *E. faecalis* esetén már 2,4%-os linezolid rezisztenciát határoztak meg, az MDR arány pedig 2,4% volt. Az egyéb fajok közül *E. durans*, *E. hirae* és *E. gallinarum* esetén sem linezolid, sem vankomicin rezisztenciát nem mutattak ki [98]. Ünal és mtsai. Törökországban található brojlerházakból érkező mintákat vizsgáltak. A 300 vizsgált kloákatampon mintából 6-ban (2%), a környezetből érkező 50 mintából 13-ban (26%) találtak vankomicin rezisztens *Enterococcus faecium*-ot. A rezisztens törzsek genomja 95%-ban megegyezett és mindegyikükben megtalálható volt a *vanA* gén [99]. Mudenda és mtsai. Zambiában végeztek antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat, tojótyúk

állományokból érkezett kloákatampon mintákból 2020 szeptembere és 2021 áprilisa között. Az általuk vizsgált mintákból izolált *Enterococcus* törzsek 32,8%-a mutatott rezisztenciát vankomicinnel szemben, 30,2%-uk pedig linezoliddal szemben [100]. Alzahrani és mtsai. háztáji brojlerekből származó, 2019 márciusa és 2020 decembere között gyűjtött kloákatampon mintákból 90 *Enterococcus* törzset izoláltak, amelyek közül egyik törzs sem mutatott rezisztenciát linezoliddal szemben [101]. Habib és mtsai. az Egyesült Arab Emírségekből származó baromfihús mintákat vizsgáltak. Az *E. faecalis* minták 21,7%-a, az *E. faecium* minták 20,6%-a bizonyult rezisztensnek linezoliddal szemben. Az összes linezolid rezisztens minta hordozta az oxazolidinon rezisztenciát biztosító *optrA* gént [102]. Az USA-ban 2004-ben indult egy LEADER program, ami a linezolid rezisztencia nyomon követését tűzte ki célul öt éven keresztül. A 901 izolátum közül a vankomicin rezisztens törzsek aránya 27,2% volt, ebből a fenotípusos rezisztencia mögött 91,9%-ban a *vanA* gén volt kimutatható. Linezolidra magas szintű, 99,4%-os érzékenységet mutattak ki [103].

A baromfi ágazatban jelenlévő rezisztens *Enterococcus* spp. baktériumok terjedését támasztja alá kutatásunk, amely során az első előszűrés során kapott 218 izolátum 89,9%-a MDR kórokozó volt. A baromfi ágazatban engedélyezett hatóanyagok nagyfokú rezisztenciáját mutatja, hogy az általunk vizsgált hatóanyagok többségénél 50% feletti rezisztenciát tapasztaltunk, ez alól csak az enrofloxacin, valamint az amoxicillin volt a kivétel. Linkomicinnel szemben közel 100%-os rezisztenciát tapasztaltunk. A humán gyógyászatban engedélyezett hatóanyagok közül csupán az azitromicin kapcsán tapasztaltunk 50% feletti rezisztenciát (62,4%), viszont aggodalomra ad okot, hogy a humán gyógyászatban kimagasló jelentőségű vankomicinnel és linezoliddal szemben is 15,6%-os, illetve 19,3%-os rezisztenciát tapasztaltunk. Fontos kiemelni, hogy ezen rezisztencia profilok úgy alakultak ki, hogy ezeket a hatóanyagokat egyáltalán nem alkalmazzuk a haszonállat gyógyászatban. Míg a metogenomikai vizsgálatok során az irodalomban főleg *vanA* gént azonosítottak a VRE törzsek hátterében, addig mi elsősorban *vanC* gént azonosítottunk. Kutatásunk limitációja, hogy a CLSI által ajánlott klinikai határértékek a humán törzsekkel szemben lettek felállítva. A jövőben fontos lenne baromfi törzsekkel szembeni klinikai határértékeket is megfogalmazni, hogy pontosabb képet kaphassunk a rezisztencia helyzetéről. Hosszútávú céljaink között szerepel egy országos szintű, a vankomicin rezisztenciát kódoló génkészlet regionális gyakoriságát ábrázoló géntérkép elkészítése.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A 21. század egyik nagy jelentőséggel bíró kihívása az antibiotikumrezisztens kórokozók egyre nagyobb térnyerése. Ezen kórokozók közé sorolhatók egyes *Enterococcus* fajok, amelyek az állat- és közegészségügyben egyre nagyobb gondot okoznak, antibiotikumrezisztens törzseik révén. Kutatásunk során magyarországi házityúk és pulyka állományokból, összesen 969 mintából baromfifélékre engedélyezett hatóanyagokkal előszűrést végeztünk, majd a 218 darabra szűkített mintákat a humán egészségügyben fontos hatóanyagokra történő antibiotikum érzékenységi vizsgálattal tovább szűrtük. A humán egészségügyben fontosnak számító linezoliddal és vankomicinnel szemben rezisztenciát mutató izolátumok rezisztenciaprofilját metagenomikai vizsgálatokkal térképeztük fel.

Vizsgálatunk során az előszűrt 218 mintából 196 (89,9%) minősült multirezisztens (MDR) kórokozónak. Ezen 196 izolátumból az általunk figyelembe vett szempontok alapján 8 feltételezhetően kiterjedt gyógyszerrezisztens törzs (XDR), 1 pedig feltételezhetően pánrezisztens törzs (PDR) kórokozónak bizonyult. A baromfifélékre engedélyezett hatóanyagok között a rezisztencia mértéke 97,7% és 42,2% között változott. Ezen hatóanyagok közül az enrofloxacin bizonyult a leghatékonyabb, a linkomicin pedig a legkevésebb hatásos antibiotikumnak. A humángyógyászatban alkalmazott hatóanyagok közül az imipenem bizonyult a leghatékonyabbnak, csupán a vizsgált minták 7,3%-a számított rezisztensnek. A vizsgált minták 15,6%-a bizonyult rezisztensnek vankomicinnel szemben, 19,3%-a pedig linezoliddal szemben. A *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) epidemiológiai határértékei alapján a nem vad típusú csoportba tartozott a minták 36,2%-a linezoliddal szemben, 71,1%-a vankomicinnel szemben. Metagenomikai vizsgálatra 42 MDR törzset választottunk ki, amelyek vankomicinre és/vagy linezolidra rezisztensek voltak. Közülük öt törzs esetén találtunk vankomicin, 14 törzs esetében pedig peptid antibiotikumokkal szembeni rezisztenciáért felelős gént. Fenotípusosan 18 törzs mutatott linezoliddal szembeni rezisztenciát, azonban a metagenomikai vizsgálat során linezolid rezisztenciáért felelős gént nem találtunk.

Kutatásunk az ágazatban jelenlévő rezisztens *Enterococcus* törzsek terjedését támasztja alá, hiszen az előszűrt 218 izolátum 89,9%-a MDR kórokozónak bizonyult. A baromfifélékre engedélyezett hatóanyagok többségénél 50% feletti rezisztenciát tapasztaltunk, míg a humán készítmények közül csak azitromicinnél volt ilyen magas az érték (62,4%). A vankomicinnel és linezoliddal szembeni értékek aggodalomra adnak okot, mivel ezeket a hatóanyagokat egyáltalán nem használják a haszonállat gyógyászatban.

8. SUMMARY

One of the major challenges of the 21st century is the growing prevalence of antibiotic-resistant pathogens. These pathogens include certain *Enterococcus* species, which are a growing concern in animal and public health due to their antibiotic-resistant strains. In our study, we pre-screened a total of 969 samples from Hungarian flocks of domestic chickens and turkeys with approved substances for poultry, and further filtered the samples down to 218 by antibiotic susceptibility testing for substances of importance in human health. The resistance profiles of isolates showing resistance to linezolid and vancomycin, which are important in human health, were mapped by metagenomic studies.

In our study, 196 (89.9%) of the 218 pre-screened samples were classified as multidrug-resistant (MDR). Of these 196 isolates, 8 were presumptively extensively drug-resistant (XDR) and 1 was presumptively pandrug-resistant (PDR) based on the criteria we considered. Among the substances approved for use in poultry, resistance rates varied between 97.7% and 42.2%. Among these agents, enrofloxacin was found to be the most effective antibiotic and linkomycin the least effective. Among the human agents, imipenem was the most effective, with only 7.3% of the samples tested being resistant. 15.6% of the samples tested were resistant to vancomycin and 19.3% to linezolid. Based on the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) epidemiological cut-off values, 36.2% of the samples were in the non-wild-type group against linezolid and 71.1% against vancomycin. For metagenomic analysis, 42 MDR strains resistant to vancomycin and/or linezolid were selected. Among them, genes specifically encoding resistance to vancomycin were found in five strains and genes encoding resistance to peptide antibiotics in 14 strains. Phenotypically, 18 strains showed resistance to linezolid, but no genes specifically encoding linezolid resistance were found in the metagenomic analysis.

Our research supports the spread of resistant *Enterococcus* strains in the sector, as 89.9% of the 218 pre-filtered isolates were found to be MDR pathogens. The majority of the substances authorised for poultry showed resistance above 50%, while only azithromycin (62.4%) showed such a high level of resistance among human products. The values against vancomycin and linezolid are of concern as these active substances are not used at all in livestock medicine.

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. Usui M, Tamura Y, Asai T (2022) Current status and future perspective of antimicrobial-resistant bacteria and resistance genes in animal-breeding environments. *J Vet Med Sci* 84:1292–1298. <https://doi.org/10.1292/jvms.22-0253>
3. Marshall BM, Levy SB (2011) Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev* 24:718–733. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>
4. Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I (2003) The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother* 52:159–161. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg313>
5. Salim HMD, Huque KS, Kamaruddin KM, Haque Beg A (2018) Global Restriction of Using Antibiotic Growth Promoters and Alternative Strategies in Poultry Production. *Science Progress* 101:52–75. <https://doi.org/10.3184/003685018X15173975498947>
6. European Centre for Disease Prevention and Control, European Medicines Agency (2009) The bacterial challenge : time to react : a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. Publications Office, LU
7. Hofer U (2019) The cost of antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol* 17:3–3. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0125-x>
8. Diarra MS, Malouin F (2014) Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Frontiers in Microbiology* 5:
9. Rehman MA, Yin X, Zaheer R, Goji N, Amoako KK, McAllister T, Pritchard J, Topp E, Diarra MS (2018) Genotypes and Phenotypes of Enterococci Isolated From Broiler Chickens. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 2:
10. Rehman MA, Hasted T-L, Persaud-Lachhman MG, Yin X, Carrillo C, Diarra MS (2019) Genome Analysis and Multiplex PCR Method for the Molecular Detection of Coresistance to Cephalosporins and Fosfomycin in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg. *Journal of Food Protection* 82:1938–1949. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-205>
11. Mak PHW, Rehman MA, Kiarie EG, Topp E, Diarra MS (2022) Production systems and important antimicrobial resistant-pathogenic bacteria in poultry: a review. *J Anim Sci Biotechnol* 13:148. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00786-0>
12. Dubin K, Pamer EG (2014) Enterococci and their interactions with the intestinal microbiome. *Microbiol Spectr* 5:10.1128/microbiolspec.BAD-0014–2016. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0014-2016>
13. Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, Huyen CK, Hanrahan JA, Huger AM, Hutton-Thomas RA, Whalen CC, Bonomo RA, Rice LB (2000) Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med* 343:1925–1932. <https://doi.org/10.1056/NEJM200012283432604>
14. Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, Equinda MJ, Son T, Samstein M, Viale A, Socci ND, van den Brink MRM, Kamboj M, Pamer EG (2010) Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest* 120:4332–4341. <https://doi.org/10.1172/JCI43918>
15. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18:268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
16. MacCallum WG, Hastings TW (1899) A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov. spec.), with a description of the microorganism. *J Exp Med* 4:521–534
17. Ben Braïek O, Smaoui S (2019) Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *Biomed Res Int* 2019:5938210. <https://doi.org/10.1155/2019/5938210>
18. Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ (2017) Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Frontiers in Veterinary Science* 4:
19. Rivera-Gomis J, Marín P, Otal J, Galecio JS, Martínez-Conesa C, Cubero MJ (2021) Resistance patterns to C and D antibiotic categories for veterinary use of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. commensal isolates from laying hen farms in Spain during 2018. *Prev Vet Med* 186:105222. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105222>
20. Aqib AI, Alsayeqh AF (2022) Vancomycin drug resistance, an emerging threat to animal and public health. *Front Vet Sci* 9:1010728. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1010728>

21. Cheng G, Hao H, Xie S, Wang X, Dai M, Huang L, Yuan Z (2014) Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Front Microbiol* 5:217. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00217>
22. Wegener HC (2003) Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology* 6:439–445. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.009>
23. Robbins KM, Suyemoto MM, Lyman RL, Martin MP, Barnes HJ, Borst LB (2012) An outbreak and source investigation of enterococcal spondylitis in broilers caused by *Enterococcus cecorum*. *Avian Dis* 56:768–773. <https://doi.org/10.1637/10253-052412-Case.1>
24. Jørgensen SL, Poulsen LL, Thorndal L, Ronaghinia AA, Bisgaard M, Christensen H (2017) Characterization of *Enterococcus faecalis* isolated from the cloaca of “fancy breeds” and confined chickens. *J Appl Microbiol* 122:1149–1158. <https://doi.org/10.1111/jam.13416>
25. Makrai L, Nemes C, Simon A, Ivanics É, Dudás Z, Fodor L, Glávits R (2011) Association of *Enterococcus cecorum* with vertebral osteomyelitis and spondylolisthesis in broiler parent chicks. *Acta Veterinaria Hungarica* 59:11–21. <https://doi.org/10.1556/avet.59.2011.1.2>
26. Gregersen R, Petersen A, Christensen H, Bisgaard M (2010) Multilocus sequence typing of *Enterococcus faecalis* isolates demonstrating different lesion types in broiler breeders. *Avian pathology: journal of the WVPA* 39:435–40. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.517250>
27. de Jong A, Simjee S, Rose M, Moyaert H, El Garch F, Youala M (2019) Antimicrobial resistance monitoring in commensal enterococci from healthy cattle, pigs and chickens across Europe during 2004–14 (EASSA Study). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74:921–930. <https://doi.org/10.1093/jac/dky537>
28. Sharma P, Gupta SK, Barrett JB, Hiott LM, Woodley TA, Kariyawasam S, Frye JG, Jackson CR (2020) Comparison of Antimicrobial Resistance and Pan-Genome of Clinical and Non-Clinical *Enterococcus cecorum* from Poultry Using Whole-Genome Sequencing. *Foods* 9:686. <https://doi.org/10.3390/foods9060686>
29. Jung A, Chen LR, Suyemoto MM, Barnes HJ, Borst LB (2018) A Review of *Enterococcus cecorum* Infection in Poultry. *Avian Dis* 62:261–271. <https://doi.org/10.1637/11825-030618-Review.1>
30. Jung A, Rautenschlein S (2014) Comprehensive report of an *Enterococcus cecorum* infection in a broiler flock in Northern Germany. *BMC Veterinary Research* 10:311. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0311-7>
31. Borst LB, Suyemoto MM, Sarsour AH, Harris MC, Martin MP, Strickland JD, Oviedo EO, Barnes HJ (2017) Pathogenesis of Enterococcal Spondylitis Caused by *Enterococcus cecorum* in Broiler Chickens. *Vet Pathol* 54:61–73. <https://doi.org/10.1177/0300985816658098>
32. Herdt P, Defoort P, Steelant J, Swam H, Tanghe L, Goethem SV, Vanrobaeys M (2009) *Enterococcus cecorum* osteomyelitis and arthritis in broiler chickens. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*
33. de Jong A, Thomas V, Klein U, Marion H, Moyaert H, Simjee S, Vallé M (2013) Pan-European resistance monitoring programmes encompassing food-borne bacteria and target pathogens of food-producing and companion animals. *International Journal of Antimicrobial Agents* 41:403–409. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.11.004>
34. de Jong A, Simjee S, Garch FE, Moyaert H, Rose M, Youala M, Dry M, EASSA Study Group (2018) Antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from healthy cattle, pigs and chickens in nine EU countries (EASSA Study) to critically important antibiotics. *Vet Microbiol* 216:168–175. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.010>
35. Kahlmeter G, Turnidge J (2022) How to: ECOFFs—the why, the how, and the don’ts of EUCAST epidemiological cutoff values. *Clinical Microbiology and Infection* 28:952–954. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.02.024>
36. Huttner A, Bielicki J, Clements MN, Frimodt-Møller N, Muller AE, Paccaud J-P, Mouton JW (2020) Oral amoxicillin and amoxicillin–clavulanic acid: properties, indications and usage. *Clinical Microbiology and Infection* 26:871–879. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.11.028>
37. Amoxicillin and Clavulanic Acid: MedlinePlus Drug Information. <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a685024.html>. Accessed 1 Sep 2023
38. Richards DM, Heel RC, Brogden RN, Speight TM, Avery GS (1984) Ceftriaxone. *Drugs* 27:469–527. <https://doi.org/10.2165/00003495-198427060-00001>
39. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA (2011) Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4943–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
40. Torres JA, Villegas MV, Quinn JP (2007) Current concepts in antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5:833–843. <https://doi.org/10.1586/14787210.5.5.833>
41. Papich MG (2017) β -Lactam Antibiotics: Penicillins, Cephalosporins, and Related Drugs. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. John Wiley & Sons, p 826
42. Pharmacokinetics of imipenem-cilastatin following intravenous administration in healthy adult horses - ORSINI - 2005 - *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2885.2005.00667.x>. Accessed 3 Feb 2023

43. Holloway WJ (1982) Spectinomycin. *Medical Clinics of North America* 66:169–173. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)31450-X](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)31450-X)
44. Themes UFO (2018) Chloramphenicol and Derivatives, Macrolides, Lincosamides, and Miscellaneous Antimicrobials. In: *Veterian Key*. <https://veteriankey.com/chloramphenicol-and-derivatives-macrolides-lincosamides-and-miscellaneous-antimicrobials/>. Accessed 3 Feb 2023
45. Amsden GW (2001) Advanced-generation macrolides: tissue-directed antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18:11–15. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(01\)00410-1](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(01)00410-1)
46. Lode H, Borner K, Koeppe P, Schaberg T (1996) Azithromycin—review of key chemical, pharmacokinetic and microbiological features. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 37:1–8. https://doi.org/10.1093/jac/37.suppl_C.1
47. Panteix G, Guillaumond B, Harf R, Desbos A, Sapin V, Leclercq M, Perrin-Fayolle M (1993) In-vitro concentration of azithromycin in human phagocytic cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 31:1–4. https://doi.org/10.1093/jac/31.suppl_E.1
48. M. Dowling P Peptide Antibiotics: Polymyxins, Glycopeptides, Bacitracin, and Fosfomycin. In: *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine Fifth Edition*
49. Joshi S, Shallal A, Zervos M (2021) Vancomycin-Resistant Enterococci: Epidemiology, Infection Prevention, and Control. *Infectious Disease Clinics of North America* 35:953–968. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2021.07.002>
50. Raza T, Ullah SR, Mehmood K, Andleeb S (2018) Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. *J Pak Med Assoc* 68:768–772
51. Papich MG (2017) Chloramphenicol and Derivatives, Macrolides, Lincosamides, and Miscellaneous Antimicrobials. In: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. John Wiley & Sons, p 903
52. (2018) Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC (Text with EEA relevance)
53. Diekema DI, Jones RN (2000) Oxazolidinones: a review. *Drugs* 59:7–16. <https://doi.org/10.2165/00003495-200059010-00002>
54. Zhanel GG, Shroeder C, Vercaigne L, S Gin A, Embil J, J Hoban D (2001) A critical review of oxazolidinones: An alternative or replacement for glycopeptides and streptogramins? *Can J Infect Dis* 12:379–390
55. Flamm RK, Mendes RE, Hogan PA, Streit JM, Ross JE, Jones RN (2016) Linezolid Surveillance Results for the United States (LEADER Surveillance Program 2014). *Antimicrob Agents Chemother* 60:2273–2280. <https://doi.org/10.1128/AAC.02803-15>
56. Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S, Hindler J, Humphries RM (2013) The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. *J Antimicrob Chemother* 68:4–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dks354>
57. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM (2018) Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol* 122:e59. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
58. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A (2021) Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology* 82:801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
59. Mardis ER (2013) Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry* 6:287–303. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062012-092628>
60. Tucker T, Marra M, Friedman JM (2009) Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine. *The American Journal of Human Genetics* 85:142–154. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.06.022>
61. Next-Generation Sequencing for Beginners | NGS basics for researchers. <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners.html>. Accessed 6 Feb 2023
62. Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE (2020) Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet* 21:597–614. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0236-x>
63. (2018) CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11. th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
64. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Drucker DB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ (2004) Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal* 37:756–763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2004.00865.x>
65. Hällgren A, Abednazari H, Ekdahl C, Hanberger H, Nilsson M, Samuelsson A, Svensson E, Nilsson LE, Swedish ICU Study Group the (2001) Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci in intensive care units in Sweden evaluated by different MIC breakpoint systems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48:53–62. <https://doi.org/10.1093/jac/48.1.53>
66. Maasjost J, Mühldorfer K, Cortez de Jäckel S null, Hafez HM (2015) Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated from Poultry Flocks in Germany. *Avian Dis* 59:143–148. <https://doi.org/10.1637/10928-090314-regr>

67. Fass RJ (1993) Erythromycin, clarithromycin, and azithromycin: use of frequency distribution curves, scattergrams, and regression analyses to compare in vitro activities and describe cross-resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37:2080–2086. <https://doi.org/10.1128/aac.37.10.2080>
68. Ruzauskas M, Siugzdiniene R, Spakauskas V, Povilonis J, Seputiene V, Suziedeliene E, Daugelavicius R, Pavilonis A (2010) Susceptibility of bacteria of the *Enterococcus* genus isolated on Lithuanian poultry farms. *Veterinárni medicína* 54 (2009):583–588. <https://doi.org/10.17221/44/2009-VETMED>
69. Liu Y, Liu K, Lai J, Wu C, Shen J, Wang Y (2013) Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species of food animal origin from Beijing and Shandong Province, China. *Journal of Applied Microbiology* 114:555–563. <https://doi.org/10.1111/jam.12054>
70. MIC EUCAST. [https://mic.eucast.org/search/?search\[method\]=mic&search\[antibiotic\]=-1&search\[species\]=250&search\[disk_content\]=-1&search\[limit\]=50&fbclid=IwAR0s-NufAql3fjV_Jri5mLIdT-yeyUqHwqnmH-RuHWA8CPkHwV0cqlQ](https://mic.eucast.org/search/?search[method]=mic&search[antibiotic]=-1&search[species]=250&search[disk_content]=-1&search[limit]=50&fbclid=IwAR0s-NufAql3fjV_Jri5mLIdT-yeyUqHwqnmH-RuHWA8CPkHwV0cqlQ). Accessed 5 Mar 2023
71. Metzker ML (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11:31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
72. Andrews S (2012) FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Accessed 25 Apr 2022
73. Krueger F (2022) Trim Galore
74. Dinghua MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph | Bioinformatics | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/31/10/1674/177884>. Accessed 25 Apr 2022
75. Hyatt D, Chen G-L, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11:119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>
76. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen A-LV, Cheng AA, Liu S, Min SY, Miroshnichenko A, Tran H-K, Werfalli RE, Nasir JA, Oloni M, Speicher DJ, Florescu A, Singh B, Faltyn M, Hernandez-Koutoucheva A, Sharma AN, Bordeleau E, Pawlowski AC, Zubyk HL, Dooley D, Griffiths E, Maguire F, Winsor GL, Beiko RG, Brinkman FSL, Hsiao WWL, Domselaar GV, McArthur AG (2020) CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 48:D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
77. Johansson MHK, Bortolaia V, Tansirichaiya S, Aarestrup FM, Roberts AP, Petersen TN (2021) Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *J Antimicrob Chemother* 76:101–109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>
78. Krawczyk PS, Lipinski L, Dziembowski A (2018) PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. *Nucleic Acids Res* 46:e35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1321>
79. Roux S, Enault F, Hurwitz BL, Sullivan MB (2015) VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data. *PeerJ* 3:e985. <https://doi.org/10.7717/peerj.985>
80. Arias CA, Courvalin P, Reynolds PE (2000) vanC Cluster of Vancomycin-Resistant *Enterococcus gallinarum* BM4174. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1660–1666
81. Courvalin P (2006) Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases* 42:S25–S34. <https://doi.org/10.1086/491711>
82. Charles IG, Keyte JW, Shaw WV (1985) Nucleotide sequence analysis of the cat gene of *Proteus mirabilis*: comparison with the type I (Tn9) cat gene. *J Bacteriol* 164:123–129. <https://doi.org/10.1128/jb.164.1.123-129.1985>
83. Salverda MLM, De Visser JAGM, Barlow M (2010) Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiol Rev* 34:1015–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00222.x>
84. Tsang KK, Maguire F, Zubyk HL, Chou S, Edalatmand A, Wright GD, Beiko RG, McArthur AG (2021) Identifying novel β -lactamase substrate activity through in silico prediction of antimicrobial resistance. *Microb Genom* 7:. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000500>
85. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA (1990) Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 34:2200–2209. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.11.2200>
86. Lee Y, Choi H, Yum JH, Kang G, Bae IK, Jeong SH, Lee K (2012) Molecular Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Enterobacter cloacae* Clinical Isolates from Korea and Clinical Outcome. *Ann Clin Lab Sci* 42:281–286
87. Paetzel M, Danel F, de Castro L, Mosimann SC, Page MG, Strynadka NC (2000) Crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-10. *Nat Struct Biol* 7:918–925. <https://doi.org/10.1038/79688>
88. Simo Tchuinte PL, Stalder T, Venditti S, Ngandjio A, Dagot C, Ploy M-C, Barraud O (2016) Characterisation of class 3 integrons with oxacillinase gene cassettes in hospital sewage and sludge samples from France and Luxembourg. *Int J Antimicrob Agents* 48:431–434. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.018>

89. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K (2020) Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care* 8:13. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>
90. Medina-Pizzali ML, Venkatesh A, Riveros M, Cuicapuza D, Salmon-Mulanovich G, Mäusezahl D, Hartinger SM (2022) Whole-Genome Characterisation of ESBL-Producing *E. coli* Isolated from Drinking Water and Dog Faeces from Rural Andean Households in Peru. *Antibiotics* 11:692. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050692>
91. Fracalanza SAP, Scheidegger EMD, Santos PF dos, Leite PC, Teixeira LM (2007) Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:853–859. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000120>
92. Banik A, Mohammad N, Akter T, Fatema K, Abony M (2018) Prevalence, Identification and Antibiotic Susceptibility of Enterococcus Species Isolated from Chicken and Pigeon Meat in Gazipur Area of Bangladesh. *Open Journal of Medical Microbiology* 8:74–83. <https://doi.org/10.4236/ojmm.2018.83007>
93. Roy K, Islam MdS, Paul A, Levy S, Talukder M, Sobur MdA, Ballah FM, Khan MdSR, Rahman MdT (2022) Molecular detection and antibiotyping of multi-drug resistant Enterococcus faecium from healthy broiler chickens in Bangladesh. *Veterinary Medicine and Science* 8:200–210. <https://doi.org/10.1002/vms3.669>
94. Stępień-Pyśniak D, Marek A, Banach T, Adaszek Ł, Pyzik E, Wilczyński J, Winiarczyk S (2016) Prevalence and antibiotic resistance of Enterococcus strains isolated from poultry. *Acta Veterinaria Hungarica* 64:148–163. <https://doi.org/10.1556/004.2016.016>
95. Dolka B, Chrobak-Chmiel D, Makrai L, Szeleszczuk P (2016) Phenotypic and genotypic characterization of Enterococcus cecorum strains associated with infections in poultry. *BMC Vet Res* 12:129. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0761-1>
96. Wada Y, Irekeola AA, Shueb RH, Wada M, Afolabi HA, Yean CY, Harun A, Zaidah AR (2022) Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococcus (VRE) in Poultry in Malaysia: The First Meta-Analysis and Systematic Review. *Antibiotics (Basel)* 11:171. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020171>
97. Nilsson O, Alm E, Greko C, Bengtsson B (2019) The rise and fall of a vancomycin-resistant clone of Enterococcus faecium among broilers in Sweden. *J Glob Antimicrob Resist* 17:233–235. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.12.013>
98. O'Dea M, Sahibzada S, Jordan D, Laird T, Lee T, Hewson K, Pang S, Abraham R, Coombs GW, Harris T, Pavic A, Abraham S (2019) Genomic, Antimicrobial Resistance, and Public Health Insights into Enterococcus spp. from Australian Chickens. *J Clin Microbiol* 57:e00319-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00319-19>
99. Ünal N, Bal E, Karagöz A, Altun B, Koçak N (2020) Detection of vancomycin-resistant enterococci in samples from broiler flocks and houses in Turkey. *Acta Vet Hung* 68:117–122. <https://doi.org/10.1556/004.2020.00024>
100. Mudenda S, Matafwali SK, Malama S, Munyeme M, Yamba K, Katemangwe P, Siluchali G, Mainda G, Mukuma M, Bumbangi FN, Mirisho R, Muma JB (2022) Prevalence and antimicrobial resistance patterns of Enterococcus species isolated from laying hens in Lusaka and Copperbelt provinces of Zambia: a call for AMR surveillance in the poultry sector. *JAC Antimicrob Resist* 4:dlac126. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlac126>
101. Alzahrani OM, Fayez M, Alswat AS, Alkafay M, Mahmoud SF, Al-Marri T, Almuslem A, Ashfaq H, Yusuf S (2022) Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation, and Virulence Genes in Enterococcus Species from Small Backyard Chicken Flocks. *Antibiotics (Basel)* 11:380. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030380>
102. Habib I, Lakshmi GB, Mohamed M-YI, Ghazawi A, Khan M, Li D (2022) Enumeration, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes Screening of Enterococcus spp. Isolated from Retail Chicken Carcasses in the United Arab Emirates. *Foodborne Pathog Dis* 19:590–597. <https://doi.org/10.1089/fpd.2022.0022>
103. Farrell DJ, Mendes RE, Ross JE, Jones RN (2009) Linezolid surveillance program results for 2008 (LEADER Program for 2008). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 65:392–403. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.10.011>

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm Dr. Jerzsele Ákos tanszékvezető, egyetemi docens, kutatási és innovációs rektorhelyettes Úrnak a kísérlet feltételeinek megteremtésében nyújtott segítségét és támogatását.

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Kerek Ádámnak és Dr. Mag Patriknak végtelen türelmüket és segítségüket, illetve azt, hogy mentorként álltak mellettem dolgozatom elkészülése során. Köszönöm Dr. Somogyi Zoltánnak, hogy elindított ezen az úton.

Köszönettel tartozom Dr. Bányai Krisztiánnak, Dr. Kaszab Eszternek és Dr. Bali Krisztinának a szekvenálásban, valamint Dr. Solymosi Norbertnek és Dr. Papp Mártonnak a bioinformatikai elemzésben nyújtott segítségéért; valamint köszönöm a laboratóriumi munkák előkészítésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségét Balogh Katalinnak és Pénzem Imre Tamásnének.

Továbbá szeretném megköszönni menyasszonyom, családom és barátaim odaadó támogatását, nélkülük dolgozatom nem készülhetett volna el.

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 **Horváth Ákos**, ötödik évfolyamos hallgató „*Baromfi eredetű multirezisztens Enterococcus baktériumtörzsek antibiotikum érzékenységi és metagenomikai vizsgálata*” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2023. 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, 2023. október hó 03. nap.

.....

Dr. Kerek Ádám
témavezető