

TDK DOLGOZAT

Horváth Áron

2023

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



Hazai nagylétszámú házityúk állományokból izolált *Enterococcus* baktériumtörzsek ECOFF (*Epidemiological cut-off value*) értékének meghatározása

Készítette:

Horváth Áron

4. évf. ao. hallgató

Témavezető:

Dr. Kerek Ádám

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, egyetemi tanársegéd

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Az <i>Epidemiological cut-off value</i> gyakorlati jelentősége, meghatározása	5
2.2. Az antimikrobiális rezisztencia 21. századi helyzete.....	8
2.3. Az <i>Enterococcus</i> spp. köz- és állategészségügyi jelentősége.....	9
2.4. Az <i>Enterococcus</i> spp. fajszerű gyakorisága, előfordulása a baromfifélékben	11
2.5. Az <i>Enterococcus</i> spp. okozta fertőzések kezelésének gyakorlati lehetőségei.....	12
3. Célkitűzések	16
4. Anyag és módszer.....	17
4.1. A minták eredete	17
4.2. A törzsek izolálása	17
4.3. A hatóanyag törzsoldatok elkészítése	17
4.4. A minimális gátló koncentráció meghatározása	18
4.5. Az ECOFF érték meghatározása.....	20
5. Eredmények.....	21
6. Következtetések.....	29
7. Összefoglalás.....	32
8. Summary.....	33
9. Irodalomjegyzék	34
10. Köszönetnyilvánítás	41

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMR	Antimikrobiális rezisztencia (<i>Antimicrobial resistance</i>)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</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>
ECOFF	Epidemiológiai küszöbérték (<i>Epidemiological cut-off value</i>)
ECV	Epidemiológiai töréspont (<i>Epidemiological cut-off value</i>)
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
MDR	Multirezisztens (<i>Multidrug resistance</i>)
MHB	Müller-Hinton leves (<i>Müller-Hinton broth</i>)
MIC	Minimális gátló koncentráció (<i>Minimum inhibitory concentration</i>)
PK/PD	Farmakokinetika és farmakodinámia
VRE	Vankomicin rezisztens <i>Enterococcus</i>

1. BEVEZETÉS

Az antimikrobiális rezisztencia globális terjedése maga után vonta, hogy a multirezisztens (MDR) törzsek is széles körben kezdtek terjedni. Az *Enterococcus* fajok olyan kommenzalista mikrobák, melyek feltörekvő fertőző nozokomiális megbetegedéseket képesek kialakítani. Állategészségügyi szerepük az utóbbi időben egyre inkább felértékelődött. Egyre gyakrabban találkozhatunk a hagyományos kezelésekre rezisztenssé váló (penicillinek) törzsekkel, melyek idővel a második vonalbeli szerekre, mint a vankomicin is rezisztenssé válnak. Különösen fontos az Egy egészség tükrében feltérképezni használatunk körében egy-egy baktérium populációra jellemző fenotípusosan megjelenő rezisztenciaprofiljukat és elkülöníteni a vad típusú törzseket a rezisztensektől. Ebben segít az epidemiológiai küszöbérték (ECOFF, *epidemiological cut-off value*) meghatározása.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az *Epidemiological cut-off value* gyakorlati jelentősége, meghatározása

Az epidemiológiai töréspont (ECV) a vad típusú törzsek esetén az a legmagasabb minimális gátló koncentráció, amely a vad típusú törzseknek a 95%-át lefedi [1]. A vad típusú törzs kritériuma, hogy az nem hordozhat a vizsgált hatóanyaggal szemben rezisztencia kialakulásáért felelős rezisztenciagént. A nem vad típusú törzsek kialakult rezisztenciával rendelkeznek, ami lehet szerzett vagy mutáció révén kialakult tulajdonság, amelyet antimikrobiális rezisztencia gének formájában hordoznak [2]. Az ECOFF meghatározásához minimális gátló koncentráció (MIC) értékeket ábrázolnak grafikonon, aminek bimodális eloszlást kell mutatnia, ami eltérő súlyú jelenségből fakadó eloszlás, két normál eloszlás keveréke, azonos szórással, különböző magasságú csúcsokat eredményezve [3–5]. Az ECV és ECOFF fogalom lényegében ugyanazt takarja, az előbbit a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), utóbbit az *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) használja.

Az Európai Bizottság az antimikrobiális szerek érzékenységeinek vizsgálata révén egy nemzetközi érzékenységvizsgálati bizottságot hozott létre, amelyet az Európai Klinikai Mikrobiológiai és Fertőző Betegségek Európai Társasága (ESCMID) működtet, és az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) törésponti tanácsadó bizottságaként működik. Az EUCAST eredeti feladata az európai klinikai töréspontok harmonizálása volt, de nagyon hamar feladataik túlnőtték Európa határait, és kiterjedtek az újonnan engedélyezett szerekre is. A mérőföldkövek között szerepelt a nagyszámú MIC-eloszlások összesítése, az ezen eloszlások megjelenítésére szolgáló szoftverek létrehozása, így az EUCAST koncepciója az ECOFF értékek meghatározása, valamint az EUCAST lemezdiffúziós módszerének kidolgozása. Az EUCAST fejlesztőlaboratórium döntő szerepet játszott az antimikrobiális érzékenységvizsgálati (AST) módszertan fejlesztésében, beleértve az új antimikrobiális szerekre és a közvetlenül a vérmintákból történő gyors AST-re vonatkozó fejlesztési munkát [6]. Az EUCAST-nak több állandó albizottsága van, többek között a gombák (AFST) és a baktériumok (AMST), valamint az állategészségügyi érdekeltségű mikroorganizmusok (VetCAST) AST-jával foglalkozó albizottságok, továbbá *ad hoc* albizottságok olyan témákkal, mint az anaerob baktériumok, a MIC értékek és zónaátmérő eloszlások és a járványügyi határértékek, a fenotípusos és genotípusos rezisztencia közötti kapcsolatot vizsgáló, valamint a rezisztencia-mechanizmusok kimutatására vonatkozó szakértői szabályokkal és módszerekkel foglalkozó bizottság [7, 8].

Az EUCAST a klinikai töréspontok meghatározásakor több tényezőt vesz figyelembe, beleértve az adagolási információkat, a MIC-eloszlásokat, az ECOFF értékeket, a preklinikai és klinikai farmakokinetikai és farmakodinámiai (PK/PD) értékeket, a Monte Carlo-szimulációkat és a PK/PD töréspontokat, valamint a klinikai adatokat [9]. Az ECOFF meghatározáshoz legalább öt adatkészlet szükséges, amelyek mindegyike legalább 15 MIC-értéket tartalmaz, összesen pedig legalább 100 MIC-értéket tartalmaz, és a modális MIC-érték a leggyakoribb modális MIC-értéktől ± 1 kétszeres hígításon belül van. Ez az adatmennyiség gyakran nem áll rendelkezésre, és ekkor a töréspontokat a rendelkezésre álló adatokkal állítják be, ha azt megfelelőnek ítélik. Példa erre a *Candida dubliniensis* gombára meghatározott töréspontok, mivel a filogenetika, a klinikai fertőzések és a MIC-értékek tekintetében nagyon hasonlít a *Candida albicans* gombára [10].

A humán fertőzéseket ritkán okozó baktérium fajok esetében egyelőre nem áll rendelkezésre elegendő adat a töréspontok meghatározásához. Ezeknél azonban a rendelkezésre álló MIC-adatok lehetővé teszik előzetes ECOFF értékek meghatározását. Az ECOFF értékek informatívak a vad típusú eloszlás felső határát illetően, valamint akkor, ha egy mikroorganizmus rezisztencia mechanizmusokat szerzett, jelezve, hogy a klinikai kimenetel eltérhet az adott fajra vonatkozó általános tapasztalatoktól. Az ECOFF értékek továbbá lehetővé teszik a más fajokkal történő összehasonlítást a saját érzékenységi mintázat tekintetében [11].

Szükségessé vált Európában a töréspontok egyeztetése és rendszerezése, ez idő alatt a MIC-eloszlások mennyiségi leírása is fókuszba került, mely során egyértelművé vált, szükséges a vad típusú MIC-értékek, továbbá olyan értékek (epidemiológiai határértékek) megállapítására, amelyek különbséget tesznek a szerzett rezisztencia mechanizmusokkal rendelkező törzsek és a vad típusú törzsek között. Ezek a töréspontok képezik az alapját a szerzett rezisztencia laboratóriumi kimutatásának és a rezisztencia kialakulásának nyomon követésének. Emellett az európai folyamatok MIC-határértékek meghatározásának során, alkalmazásra kerül egy olyan metódus, amelyben az informatívan meghatározott töréspontokat a vad típusú MIC-eloszlásokkal összevetik abból a célból, hogy a határértékek ne befolyásolják a célmikroorganizmusok MIC-eloszlásait [12].

Az ECOFF meghatározás nem csak antimikrobiális szerek esetén végezhető el, tehát a jelen pillanatig nincsenek egyértelmű feltételek annak a megállapítására, hogy egy bármi-

lyen mikroba fogékony-e az adott antimikrobiális szerre vagy nem. Morrissey és mtsai. ebből kifolyólag célul tűzték ki, hogy rezisztens és a vad organizmusok megkülönböztetésére meghatározzák a MIC és a minimális baktériumölő koncentráció (MBC) eloszlását négy gyakran használt biocid hatóanyagra: nátrium-hipoklorit, triklozán, klórhexidin és benzalkónium-klorid. A vizsgálat során összesen 3319 klinikai izolátumot vizsgáltak, kiemelt figyelemmel a *Staphylococcus aureus* (n=1635) *Salmonella* spp. (n=901), *Escherichia coli* (n=368), *Candida albicans* (n=200), *Klebsiella pneumoniae* (n=60), *Enterobacter* spp. (n=54), *Enterococcus faecium* (n=53) és *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (n=56) fajokra. A felhasznált adatokból megállapításra került azok ECOFF értéke. Kimutatták, hogy az MBC-értékek minden hatóanyag esetében magasabbak voltak, mint azok MIC értékei. Az esetek döntő többségében mindkét érték normális eloszlást követett. Megfigyeltek bimodális eloszlásokat, melyek az adott hatóanyagra rezisztens bizonyos alpopulációk létezését sejtették. Az *Escherichia coli*, az *Enterobacter* spp. és a *Staphylococcus aureus* esetén triklozán hatóanyaggal továbbá Az *Enterobacter* spp. esetén klórhexidinnel szemben volt megfigyelhető érzékenység. Ezek alapján felmerül annak a lehetősége, hogy biocidok révén az antimikrobiális szerek rezisztenciájának szelekciója megy végbe. Azonban a kutatás eredménye alapján a vizsgált biocidekkel szembeni rezisztencia, ebből kifolyólag az antimikrobiális szerek rezisztenciájával való kapcsolat és egymásra hatásuk nem gyakori a klinikumban releváns baktériumok esetén [13].

Az EUCAST működése során különböző vegyületekkel szembeni rezisztencia osztályozására különböző kritériumokat dolgozott ki, a vad típusú MIC-eloszlásokra alapozva is elkészítette azokat az eljárásokat, melyek a járványügyi határértékek meghatározását szolgálják. Ennek feltételeként meghatározásra került, hogy az adott antimikrobiális szer koncentrációtartományába bele kell tartoznia a fogékony vad típusú populációnak és további, legkevesebb négy határérték feletti koncentrációnak. Az EUCAST a MIC adatokat egy központi adatbázisban foglalja össze, melyekhez az adatokat az elérhető legkülönbözőbb forrásokból használ fel, és azok alapján egy bizottság készíti el javaslatait egy cut-off érték meghatározása során [14].

Az említettek alapján járványügyi határértékek meghatározásához nélkülözhetetlenek a vad típusú MIC-eloszlások, mindezt annak biztosításaképpen, hogy a klinikai töréspontok ne válasszák szét a meghatározott fajok vad típusú populációit. Ebből kifolyólag, hozott létre az EUCAST a vad típusú eloszlásra egy referencia MIC eloszlást, amelyhez képest a módszerek kalibrálhatóak. Minderre azért van szükség, hogy az epidemiológiai határértékek

használata során megelőzzük a rezisztencia kimutatásának epidemiológiai és klinikai szempontjai között létrejövő kompromisszumokat. Ezek különösen akkor válnak értékessé, ha a MIC-értékek közötti különbség a klinikai határérték és a vad típusú eloszlás felső vége között számottevő, ha a klinikai határérték a baktériumok vad típusú eloszlását osztja meg. Az ECOFF fontosságára példa lehet, ha a klinikai határértékek vagy az azzal kapcsolatos közös állaspont hiányzik. Az ECOFF értékek gyakorlati felhasználását teszik szükségessé, ha a járványügyi határértékek lehetővé teszik a rezisztencia kimutatását és annak összehasonlítását, továbbá új és régi gyógyszerek esetében, amelyeknél a rezisztenciát még nem írták le, mint például *Streptococcus pyogenes* esetén penicillin hatóanyagra. Továbbá olyan esetekben, ahol számottevő, hogy a rezisztencia mechanizmusokkal rendelkező mikroorganizmusokkal szemben kerüljön felhasználásra, például az antimikrobiális szerek használata és a rezisztencia közötti összefüggésre vonatkozó kutatások, valamint a létrejövő rezisztencia elleni stratégiákat vizsgáló tanulmányok, amelyek esetében kiemelkedő jelentőséggel bír nagy érzékenység és a nagy specificitás, szintén hasznos lehet az ECOFF-értékek meghatározása [15].

Következésképpen az epidemiológiai határértékek felhasználhatóak a rezisztencia számszerűsítésére és leírására, továbbá a rezisztencia mértékétől vagy az esetleges klinikai érzékenységtől függetlenül megjósolja a jövőbeli rezisztencia-tendenciákat, bizonyos vele szemben támasztott feltételek figyelembevételével. Ez lehetőséget biztosít a korai cselekvésre, tehát a jövőben fellépő rezisztencia kialakulása elleni megelőző intézkedésekre. A járványtani határérték meghatározásának további előnye annak objektivitása, tehát a kapott eredmény standard módszerekkel van alátámasztva és független, amit gyakran nem figyelhetünk meg maradéktalanul a klinikai töréspontok esetében [16].

2.2. Az antimikrobiális rezisztencia 21. századi helyzete

Az antimikrobiális rezisztencia (AMR) növekedésének és problémájának kérdésköre méltán foglal helyet az emberiség nagy kihívásai között a 21. században. Az AMR kialakulásának az oka baktériumok, vírusok, gombák és egyéb paraziták antimikrobiális szerrel történő kezelésre adott válaszában hiánya. Ennek következtében fokozatosan növekszik az adott hatóanyaggal szemben rezisztens mikrobák száma, valamint az interakciók következtében a rezisztencia földrajzi terjedése is megvalósul. Bizonyos előre jelző becslési modellek 2050-re évi 10 millió ember halálát vetítik elő, melynek oka az AMR lesz [17]. A probléma mára olyan mértékű jelentőségűvé vált, hogy az Egészségügyi Világszervezet (WHO) az AMR-t az emberiség számára legmeghatározóbb 10 globális közegészségügyi kihívás

közé sorolja. Becslések szerint 2019-ben 4,95 millió ember halála volt köthető bizonyítottan bakteriális AMR következményéhez, amiből közvetlenül 1,27 ember halála tulajdonítható az AMR-nek. Globális szinten a hat fő bakteriális kórokozó az *Escherichia coli*, a *Staphylococcus aureus*, a *Klebsiella pneumoniae*, a *Streptococcus pneumoniae*, az *Acinetobacter baumannii* és a *Pseudomonas aeruginosa* [18].

A mikrobák közé tartozó vírusokra és gombákra a baktériumokkal ellentétben sokkal kisebb mértékű figyelem jut, azonban egyre inkább nő azon jelentett esetek száma, melyben az általuk okozott, emberi életet veszélyeztető fertőzések mértéke nő a rezisztencia következtében. Ebből fakadóan bizonyos régiókban a gombák, a protozoák (pl. *Plasmodium falciparum*) és vírusok (pl. HIV) esetén megjelenő rezisztencia komoly veszélyt jelent, melyre nem fektetünk elég hangsúlyt [19]. Erre a kihívásra adott válaszként fogalmazták meg a „One Health” koncepciót 2008-ban, mely a probléma tekintetében egy nagy összegzést és iránymutatást mutató program. Kiterjed a köz- és állategészségügy viszonyára, továbbá globálisan és regionális szinten is iránymutatást ad. Három alappillérre épül, amelyek a kommunikáció, a kollaboráció és az együttműködés, amelyeknek szükséges létrejönnie a szakemberek, a döntéshozók, a kutatók és a polgárok között [20]. A rezisztencia elleni küzdelem során hozta létre az EUCAST az ECOFF-ot, mely a kórokozó fenotípusos tulajdonságain alapulva könnyebben és gyorsan adhat választ egy adott állomány baktériummal szemben jelen lévő rezisztencia megfelelő antimikrobiális szerrel történő kezelésére [21].

2.3. Az *Enterococcus* spp. köz- és állategészségügyi jelentősége

Az *Enterococcus* nemzetségbe tartozó fajok számos humán fertőzés hátterében állhatnak. A nemzetségből kiemelkedik az *E. faecalis*, mely endocarditist, meningitist, bakterémiát, és húgyúti fertőzéseket okozhat. Az endocarditises esetek kialakulása mögött 5-15%-ban azonosították, továbbá kimutatták, hogy az *Enterococcus* fertőzésben szenvedők 25%-nál alakul ki az endocarditis [22]. Egy Skócia területére kiterjedő 25 éves időtartamot átfogó kórházban kezelt endocarditisben szenvedő személyeket vizsgáló tanulmány (950 eset) kimutatta, hogy az endocarditis mögött 8,9%-ban volt izolálható *Enterococcus* faj, továbbá a kutatás kimutatta, hogy a *Staphylococcus aureus* mellett az *Enterococcus* nemzetség felelős a legnagyobb mortalitásért fertőző endocarditis esetén [23]. Az *E. faecalis* és *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) kiemelkedő szereppel bír bakterémiával járó megbetegedésekben, Európában és Amerikában 11-13%-ban felelős bakterémia kialakulásáért. Ezek az állati eredetű törzsek, szennyezett élelmiszerrel való kapcsolat útján vagy az állatokkal való közvetlen érintkezés útján okozhatnak emberi megbetegedéseket [24].

Egy 710 esetet feldolgozó kórházi tanulmány során *Enterococcus* fajok okozta vérfer-tőzés előfordulási gyakoriságát 100 000 esetre vetítve 6,9 esetben állapították meg; a nem-zetségből kiemelkedik az *E. faecalis*, mely 100 000 esetből 4,5 esetben volt megfigyelhető, továbbá megállapították, hogy az esetek 23%-a volt végzetes kimenetelű [25]. Egy vizsgálat során megállapították, hogy az *E. faecalis* a harmadik leggyakrabban megfigyelt kórokozó a humán húgyúti fertőzések mögött, a kutatás alapjául szolgáló vizsgálat során a minták 70%-ban mutatták ki a jelenlétét. Nemek tekintetében a nők esetén 75%, míg férfiak esetén 25% volt az *E. faecalis* okozta húgyúti fertőzések prevalenciája [26]. Ezt megerősíti egy Egyesült Államokból származó 7158 kórházi mintát és Európából származó 6531 kórházi mintát feldolgozó kutatás, mely szerint az amerikai minták esetén a Gram-pozitív baktériu-mok 50,1%-ban, míg az európai minták esetén 40,6%-ban felelősek vérfertőzés kialakulá-sáért. Egy másik kutatás kimutatta, hogy a Gram-pozitív baktériumok között az *Enterococ-cus* nemzetség a második leggyakoribb húgyúti fertőzést okozó ágens [27]. Ezek túlme-nően jelentős szereppel bírnak még bakteriális tüdőgyulladás kialakulásában, melyet alátá-maszt a Negash és mstai. által végzett vizsgálat, mely során 549 kórházban kezelt gyermek vérmintái esetén a bakteriális tüdőgyulladás prevalenciája 5,6% volt és a tüdőgyulladásban szenvedők 11,8%-a esetén mutatták ki *E. faecium* törzs jelenlétét [28].

Az enterococcusok jelenléte az állategészségügyben is számottevő. Karunarathna és mtsai. az *Enterococcus* spp. és *E. coli* hatását vizsgálták brojler embriókkal kapcsolatban, mivel a bakteriális eredetű fertőzéseket az embrió és újszülöttkori csirkehalálozás vezető okának ismerik el. Továbbá a kutatás alapját képező fajok fertőzésének számos szövődmé-nye is lehet a brojlerok életében. Ide tartozik a septicémia, a krónikus ízületi betegség, ami-ből rossz takarmányértékesítés és teljesítmény csökkenés, tehát gazdasági kár következik be állomány szinten. A tojások szennyeződése bekövetkezhet nem megfelelő tárolás és higié-nia, továbbá a szülőpár állomány kolonizáltsága is nagy mértékben hatással van a keltetés kori mortalitásra [29].

Az előbb említett tünetek mellett, számos más, patológiai vizsgálatok szempontjából jelentős elváltozásokat képes okozni. Ezeket a főként szívre és tüdőre kiterjedő morfológia változásokat vizsgálták Tankson és mtsai. A tüdő esetén léphet fel a tüdőhipertenziós szindróma (PHS). Ennek okát korábban a tenyésztés genetikai hátterére, a brojlerok gyors növe-kedési erélyére vezették vissza. Ennek során az egyed növekedését nem képes a vasculáris rendszere követni, amiből hypoxia, nyomás fokozódás és folyadék kilépés ered. Tankson

korábbi kutatása során kimutatta, hogy baktériumok is képesek PHS-t okozni. A kutatás kiterjedt a szív vizsgálatára, mely egy korábbi kutatáson alapul. *E. faecalis* által fertőzött brojlerek jobb kamrájának falán üregképződéseket figyeltek meg, míg a kontrolok esetében ezt nem tapasztalták [30].

2.4. Az *Enterococcus* spp. fajszintű gyakorisága, előfordulása a baromfifélékben

Az *Enterococcus* nemzetség a házityúk bélmikrobiomjának állandó tagja, opportunista kórokozóknak tekinthetők, mivel patogenitásukat főként immunszuppresszált egyedekben fejtik ki. Az egyes fajok egymáshoz viszonyított aránya külső körülmények és az életkor függvényében változik. A nemzetségen belül 28 fajt ismerünk, közülük kiemelendő az *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus cecorum* (*E. cecorum*), *Enterococcus durans*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus avium* és az *Enterococcus gallinarum*.

Egy 250 brojlert érintő vizsgálat során, melyet bélsármintákból végeztek, 8 fajt azonosítottak PCR segítségével. Az enterococcusok nemzetségéből az *E. faecalis* fordult elő legnagyobb arányban (40%), ez követte az *Enterococcus casseliflavus* (10,8%), majd az *Enterococcus munditi* (10,8%), az *E. faecium* (10,8%), az *Enterococcus columbae* (5,8%) és az *Enterococcus gallinarum* (4,2%). Az izolátumok maradék 10%-ban az alábbi fajok voltak azonosíthatók: *Enterococcus pseudoavium*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans*, *E. cecorum*, *Enterococcus sulfureus*, *Enterococcus asini*, *Enterococcus malodoratus* és *Enterococcus raffinosus*. Továbbá megállapították, hogy az *E. faecalis* és az *E. faecium* voltak a leggyakoribb fajok a fiatal egyedekben, míg idősebb korban ezek gyakorisága csökkent [31].

Az *E. faecium* és *E. faecalis* kiemelkedő humán járványügyi kockázattal bír, ebből kifolyólag számos kutatás fókuszában állnak. Egy 70 brojlercsirkét érintő vizsgálat során a bélsármintákból 264 *Enterococcus* törzset izoláltak, melyből 230 volt *E. faecalis* és *E. faecium*, összességében 87% arányban. A fajok közül az *E. faecium* volt a domináns, ami a vizsgált állományban 72,9%-ban volt megtalálható, az *E. faecalis* pedig az esetek 47,1%-át adta [32]. Egy másik kutatás során az *E. cecorum* esetén találtak dominanciát. Ebben az esetben 2011-2016 közötti lengyel adatok szerint a vajdaságok 87,6%-ból jelentettek fertőzés kitöréseket, mind magas és alacsony telepítési sűrűséggel rendelkező brojlertelepekről, ami utalhat a patogenitásra képes törzsek széles körű elterjedésére. A brojlerállományok több mint 51,4%-nál patogén *E. cecorum* törzsek okoztak megbetegedéseket, a tenyésztő állományok több mint 25%-nál és a tojótyúkok 15,5%-nál azonosították ezeknek a törzseknek

a jelenlétét. Ez alapján megállapítható, hogy a brojlerhasznú házityúkállományok a legfogékonyabbak az *E. cecorum* fertőzésre [33].

A *Enterococcus* fajok által okozott fertőzőttség végig kíséri a baromfi egész életciklusát, melynek periódusaiban más-más tüneteket okoz, de a napos kortól egészen a vágóhídig okozhat állategészségügyi és gazdasági károkat is, aminek következtében, bizonyos esetekben a vágóhídi selejtezési arány meghaladhatja a nevelési idő alatti elhullási arányt. A tipikus klinikai tünetek főként 5 hetes kortól, technológia függvényében egészen 10 hetes korig jelentkezhetnek, melyek főként sántaságban nyilvánulnak meg [34].

Vizsgálták az embrionális korban történő fertőzés hatását, melyben 23 *E. cecorum* izolátumot használtak fel *embryo lethality assay* (ELA) módszer alkalmazása során. Az embrió mortalitás 53,4%-nál magasabb volt, ebből is kiemelkedik a brojler állományokból származó izolátumok aránya, mely esetén a mortalitás 68,9%-ban volt megfigyelhető. Az embriók elhullása jellemzően a fertőzést követő első nap után következett be, viszont a túlélő embriókból továbbra is kimutatható volt az *E. cecorum* [35]. Naposcsibéken végzett vizsgálat során 480 csibéből vettek kloáka mintát a kikelést követő 24 órával. PCR vizsgálattal kimutatták 101 izolátumból az *E. faecalis* jelenlétét. További vizsgálatok során megállapították, hogy a barna Lohmann fajta esetén 24 óra alatt 14%-ról 97%-ra, míg a fehér Lohmann fajta esetén 24 óra alatt 0,5%-ról 23%-ra nőtt az *E. faecalis* prevalenciája. A prevalencia terjedése főként az *E. faecalis* nyálkahártya mucosát kolonizáló gyors hatásának köszönhető [36]. Egy másik embriókon végzett kutatás során második és harmadik életnapon elpusztult embriók vizsgálatát végezték el, majd megállapították, hogy a patogén *E. cecorum* izolátumok letalitása 39,7% volt, míg a kommenzalista törzseké 18,9% volt. Ebben az esetben is a túlélő embriók esetében is kimutatható volt az *E. cecorum* jelenléte [37].

2.5. Az *Enterococcus* spp. okozta fertőzések kezelésének gyakorlati lehetőségei

Az antimikrobiális rezisztencia világszintű terjedése számos már ismert hatóanyag hatékonyságát csökkenti, ebből kifolyólag a rezisztencia növekedés csökkentése mellett fontos az alternatív kezelési lehetőségek kutatása [38]. Számos tanulmányban foglalmazódott meg javaslat a rezisztencia csökkentésre, probiotikumok alkalmazására, a patogén és az élettani mikrobiom viszonyáról. Egy ilyen kutatás során különböző hatóanyagokat szubterápiás dózisban alkalmazva vizsgálták azoknak a csirkék vakbél mikrobiomjára és metagenomjára gyakorolt hatását. A kísérlet során használt monensin-virginamicin és a monensin-tilsoin

kombinációk esetében az *Enterococcus*ok mértéke jelentős mértékben csökkent, devirginamicinnel szemben viszont kifejezett rezisztenciát figyeltek meg [39].

Egy svéd kutatás középpontjában a vankomicin rezisztens *Enterococcus* törzsek vizsgálata állt, vizsgálták a perzisztencia csökkentésének lehetőségét tisztítás és fertőtlenítés segítségével. A vankomicin rezisztens *Enterococcus* (VRE) törzsek aránya a svédországi brojlerekből vett izolátumok között alacsony volt, azonban 2000- 2005 között a prevalencia rohamosan nőtt. Azt is megállapították, hogy a rezisztens baktériumok kis eséllyel kerültek kívülről a telepre, így a telepi higiénia és a megfelelő gyógyszerhasználat segítségével a prevalencia csökkenthető volt. Hatékonyan csökkentette a VRE szintjét a gőz és formaldehid kombinációja. A vizsgálat során az érzékenységvizsgálatra kiválasztott izolátumok mindegyike *E. faecium* volt, és a vankomicin MIC-értéke ezeknek az izolátumoknak jellemzően >128 mg/l volt [40].

Egy kanadai kutatás során 82 csirkeállományban vizsgálták az antimikrobiális rezisztencia helyzetét. A keltetőben az állományok 76%-a esetén a megelőző 7 évben leggyakrabban használt hatóanyag a ceftiofur volt, a takarmányban használt leggyakoribb hatóanyag pedig a virginomicin volt. A rezisztencia vizsgálatok során az *Enterococcus* törzsek többségénél rezisztenciát figyeltek meg bacitracin, eritromicin, lincomicin, kinupristin-dalfopristin és tetraciklin ellen, azonban vankomicinnel szemben nem. A ceftiofur hatóanyag használata élelmiszertermelő állatok esetében ma már nem engedélyezett [41].

Egy 383 brojlercsirke bevonásával készült rezisztencia vizsgálat során napos kortól vizsgálták az izolált fajok érzékenységét. A vizsgált hatóanyagok a linkomicin és a spektinomicin voltak, a kísérlet során 20 csirkén végeztek boncolást a 7., 14., 21., 42. vizsgálati napokon, megállapították, hogy a linkomicin és a spektinomicin kombinációja elősegíti az *E. coli* és a *Shigella* spp. arányának növekedését, továbbá csökkentette a hasznos *Lactobacillus* spp. mennyiségét a vakbélben. Az antibiotikus kezelések hatására az *Enterococcus* fajok gyakorisága esetén jelentős növekedést tapasztaltak. Ez alapján a linkomicin-spektinomicin kombináció az állatok életkorának első heteiben alkalmas az *Enterococcus* fajok okozta fertőzések megelőzésében, azonban antibiotikum élelmiszertermelő állatoknál profilaxis céljából ma már nem alkalmazható [42]. A patogén *Enterococcus* törzsek prevalenciájának csökkentése közegészségügyi szempontból is fontos. Brojlercsirkék vágását megelőző antibiotikus kezelés hatását vizsgálva azt tapasztalták, hogy a takarmánymegvonásban

részesült egyedek esetén magasabb volt az *Enterococcus* törzsek aránya a vártnál, amit az éhségből fakadó alom evéssel magyaráztak [43].

Egy *E. faecium* alapú probiotikum *in ovo* beoltásának hatását vizsgálva a keltethetőségre, az élő teljesítményre és a gasztrointesztinális paraméterekre azt tapasztalták, hogy a vizsgált különböző koncentrációk egyike sem befolyásolta ($p=0,58$) a keltethetőséget [44]. Tojáshéjról izolált *Enterococcus* spp. gyakoriságának és antimikrobiális rezisztencia-profiljának vizsgálata során tojótyúkokat vizsgáltak egy 25 napig tartó kísérletben. A tojáshéjakat *Enterococcus* spp. számlálásnak vetették alá, amit proteomikai elemzésekkel azonosítottak. Az antimikrobiális rezisztenciát korongdiffúziós teszttel határozták meg. Megfigyelték, hogy a minták 97,3%-a ($n=146$) *Enterococcus* spp.-vel volt szennyezett [45].

Egy vizsgálat során mikrokapszulázott *E. faecalis* (MEF) és a *Camellia oleifera* mag kivonatának (ECOS) hatását nézték tojótyúkok tojástermelésére, a szérumbiokémiai paramétereire és a vakbél mikrobiom összetételére. Összesen 180 tojótyúkot vizsgálva nem volt kimutatható szignifikáns különbség a kezelés hatására a tojástermelési rátára, az átlagos tojásméretre, az átlagos napi takarmányfelvételre, a takarmányértékesítési arányra, a tojáshéj vastagságára, az albumin mennyiségére és a sárgája színére ($p > 0,05$), de jelentős hatás volt megfigyelhető a tojás alaki indexére, a tojáshéj szilárdságára és az albumin minőségére ($p < 0,05$) a teljes takarmányozási időszak alatt [46].

Mivel számos *Enterococcus* faj az élettani mikrobiom része, ezért alkalmasak lehetnek brojlerek probiotikus kezelésére is; ezzel kapcsolatban L. Zhang és mtsai. végeztek kutatást, melyben mikrokapszulázott *E. faecium* készítményeket a brojlercsirkék immunrendszerére, növekedési teljesítményére, és a vakbél mikrobiótájára, antioxidáns aktivitására vizsgáltak. Az *Enterococcus* spp. prekapszulázott formája során javult a takarmány értékesítés, továbbá kiváló alternatívának bizonyult hozamfokozás céljából történő felhasználás esetén [47].

A linezolid egy oxazolidinon osztályú antibiotikum, amelyet különböző multirezisztens Gram-pozitív kórokozók, köztük enterococcusok által okozott fertőzések kezelésére használható utolsó vonalbeli hatóanyag. Az utóbbi időben azonban az állatokban előforduló linezolid-rezisztens izolátumokat humán-egészségügyi veszélynek tekintik. A brojlertartás során az antimikrobiális rezisztencia átkerülhet a környezetbe és a kereskedelmi forgalomba került húson keresztül eljuthat az emberbe. Egy brojler szülői állományból származó, linezolid rezisztens *E. faecalis* előfordulásának és jellemzőinek vizsgálata során a klóramfenikol és linezolid rezisztens izolátumok előfordulása 0-12,1% közötti, illetve 0-8,0% közötti volt;

a gazdaságok között nem voltak jelentős különbségek. Az *optrA* gyógyszerrezisztencia gén hordozása linezoliddal, tedizoliddal és fenikolokkal szembeni rezisztenciát eredményezhet [48], melynek szintén óriási közegészségügyi jelentősége lehet a baromfifélékből származó enterococcus fajok antimikrobiális rezisztencia és fertőzés közvetítő szerepe által.

Az enterococcus fajok okozta fertőzések kezelésében jöhet szóba az amoxicillin, ami a β -laktám antibiotikum csoportba tartozó időfüggő baktericid hatásmódú hatóanyag [49, 50]. A neomicin olyan poláris bázikus aminoglikozid, ami szájon át adva rosszul szívódik fel, így hatása helyi a bélfertőzésekben. Enterococcusok okozta fertőzések kezelésében a gentamicin vagy a sztreptomycin jöhetnek még szóba [50, 51]. Ezen kívül multirezisztens humán fertőzések esetén vehető igénybe a vankomicin, a kvinupristin-dalfopristin és az 5. generációs cefalosporinok, linezolid, daptomicin és tigeciklin használata. Azonban meg kell azt említeni, hogy az enterococcus fajok képesek konjugált transzpozonok és plazmidokon keresztül exogén rezisztenciagének felvételével kialakítani rezisztenciát [52].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás célja az volt, hogy Magyarországon országos szinten felmérjük a nagylétszámú háziállatok állományokból izolált kommenzalista *Enterococcus* fajok esetén a köz- és állategészségügyi szempontból jelentős antibiotikumok rezisztenciájának fenotípusos kifejeződését minimális gátló koncentráció (MIC) érték meghatározás segítségével. Az így kapott adatokból meghatároztuk az ún. ECOFF értékeket, amelynek az ún. vad típusú és rezisztens részpopulációk elkülönítésében és küszöbértékek megállapításában van jelentősége. Az így kapott értékeknek klinikai jelentősége van az adott baktérium okozta fertőzések kezelésében választott terápia során.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A minták eredete

A nagylétszámú baromfitelepekről származó minták gyűjtése 2022. február és 2023. júniusa között zajlott. A minták gyűjtése egészséges, termelő állatokból történt, amelyeket egyedi azonosítószámmal láttunk el, valamint a mintákkal kapcsolatban gyűjtött információk között számon tartottuk, hogy milyen szervből (légcső vagy kloáka), milyen településről, megyéből és régióból származtak azok, valamint a hasznosítás típusát (hús, tojás, tenyész), életkorát (növendék, felnőtt), és az állomány nagyságát (1-1000, 1001-5000, 5001-50000, 50001-100000, >100001). A kérdőív kitöltésével monitoroztuk a telepek antibiotikum felhasználási szokásait (mit, hogyan, milyen baktérium esetén), az állományban előforduló betegségeket, és hogy végeztenek-e antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat. A humán rezisztencia adatokat a Nemzeti Népegészségügyi Központ bocsájtotta rendelkezésünkre.

4.2. A törzsek izolálása

Telepenként 15-15 db légcső és kloáka mintát vettünk Amies-típusú (Biolab Zrt., Budapest, Magyarország), szén nélküli, normál alumínium pálcás mintavevő pálca segítségével. Ezt követően izolálás céljából m-Enterococcus modified Agar (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) felhasználásával szélesztettük a mintákat, majd 18-42 órás inkubációt és elbírálást követően az izolált telepeket Trypton-szója agarra (Biolab Zrt., Budapest, Magyarország) szélesztettük és újabb 18-24 órás 41 °C-on történő inkubálást követően a szintenyészeteket Microbank™ rendszerben (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada) fagyaszottuk le -80 °C-os hőmérsékletre, felhasználásig.

4.3. A hatóanyag törzsoldatok elkészítése

Az érzékenységi vizsgálatához szükséges hatóanyagokból a (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) törzsoldatokat készítettünk CLSI ajánlás szerint [53]. Az amoxicillin és amoxicillin-klavulánsavat 2:1 arányban (pH 7,2, 0,01 mol/L) és az imipenemet (pH 6, 0,1 mol/L) foszfát pufferoldatban oldottuk fel. A ceftriaxon, doxiciklin, spektinomycin, neomicin, kolisztin, tilozin, tiamulin, linkomicin és vankomicin esetén desztillált vizet használtunk. A potenciált szulfonamid elkészítése során szulfametoxazolt és trimetoprimot használtunk 20:1 arányban, előbbi forró vízben néhány csepp 2,5 mol/l NaOH-val oldottuk fel, míg utóbbit néhány csepp 0,05 mol/l HCl-al desztillált vízben oldottuk fel. Az enrofloxacin pár csepp 1 mol/l NaOH oldattal desztillált vízben készítettük el. A florfenikolt néhány csepp 95%-os etanol és desztillált víz segítségével oldottuk fel. Minden vizsgálatához 1024 µg/ml

koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, korrigálva a hatóanyagok gyártó által meghatározott tisztaságára.

4.4. A minimális gátló koncentráció meghatározása

A rezisztencia fenotípusos kifejeződését az egyes baktériumtörzsek MIC érték meghatározásával vizsgáltuk a CLSI módszertanával, illetve az ECOFF vizsgálat fejezetben leírt ajánlásokat vettük figyelembe [53], a rezisztencia határértékeket (*breakpoint*) a CLSI és az EUCAST irányelvei alapján határoztuk meg. Az ECOFF vizsgálatához a vizsgált hatóanyag koncentráció tartománya 512-0,001 µg/ml között volt.

A -80 °C-on tárolt izolátumokat a vizsgálat előtti napon 3 ml Müller-Hinton levesbe (MHB) kioltottuk, majd 37 °C-on 18-24 órán át inkubáltuk. A vizsgálatokat 96-lyukú mikrotiter lemezen (VWR International, LLC., Magyarország) végeztük. A munkalemezek első oszlopának kivételével a lyukakat 90 µl MHB-vel (1. lépés) töltöttük fel (**1. ábra**). Majd elkészítettük a vizsgált hatóanyag törzsoldatok kettes alapú hígítását MHB-vel, ezzel minden esetben 512 µg/ml koncentrációval indítottuk a hígítási sort, amit egy második lemezen tovább folytatva lefedtük a vizsgált koncentrációk teljes tartományát. A felére hígított törzsoldatból 180 µl-t mértünk a munkalemez első oszlopába (2. lépés), majd 2-es alapú hígítási sort készítettünk belőle (3. lépés). Végül a második munkalemez 10. oszlopa után a felesleget pipettaheggyel együtt eldobtuk, így minden oszlopban 90 µl térfogatot kialakítva. Minden baktériumtörzs vizsgálatához egy sort használtunk fel a mikrotiter munkalemezen (**2. ábra**).

1. lépés: feltöltés

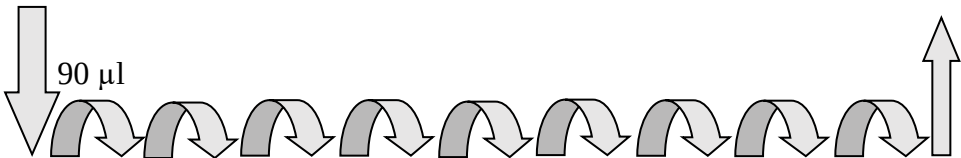
↓ 90 µl

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

1. ábra A lemezek feltöltése 90 µl MHB-vel

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

90 µl feleslegben kidob



	2x	4x	8x	16x	32x	64x	128x	256x	512x	1024x		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
B	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
C	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
D	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
E	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
F	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
G	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-
H	180	90	90	90	90	90	90	90	90	90	+	-

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

Egy segédlemezen 0,5 McFarland értékre állítottuk be a baktériumok ráoltásához szükséges baktériumsuszpenziót. Ehhez minden segédlemezt 240 µl MHB-vel töltöttünk meg (**3. ábra**), majd minden lyukba 10 µl alaposan vortexelt baktériumsuszpenziót mértünk (4. lépés). Ezt követően a baktériumtörzseket az elkészített munkalemezre mértük, a munkalemez 11. oszlopától kezdve haladva visszafelé 10 µl baktériumsuszpenziót pipetázva a segédlemezről (5. lépés). A 11. oszlop pozitív kontroll volt (baktériumsuszpenzió, leves), a negatív kontroll (leves) pedig a 12. oszlop volt (**4. ábra**).

4. lépés: a baktériumsuszpenzió 0,5 McFarland értékkel

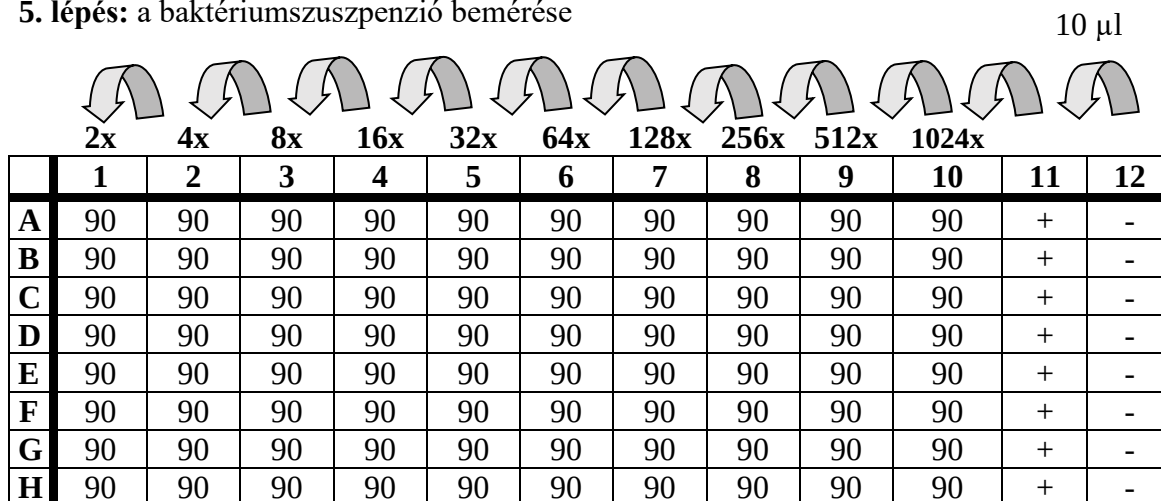
10 µl



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	240		240		240		240		240		240	
B	240		240		240		240		240		240	
C	240		240		240		240		240		240	
D	240		240		240		240		240		240	
E	240		240		240		240		240		240	
F	240		240		240		240		240		240	
G	240		240		240		240		240		240	
H	240		240		240		240		240		240	

3. ábra A baktériumsuszpenzió 25x hígításának elkészítése segédlemezen

5. lépés: a baktériumszuspenzió bemérése



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

Ezt követően a munkalemezeket 18-24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd szemmel elbíraltuk a MIC értékeket a pozitív és negatív (11-12. oszlop) kontrollhoz viszonyítva. Az értékelés során a – (nincs zavarosodás) és ± (nehezen megítélhető) jelöléssel ellátott lyukakat negatív eredménynek tekintettük, míg pozitív eredménynek a + (enyhe zavarosodás), ++ (mérsékelt zavarosodás), +++ (jelentős zavarosodás) jelöléseket használtuk.

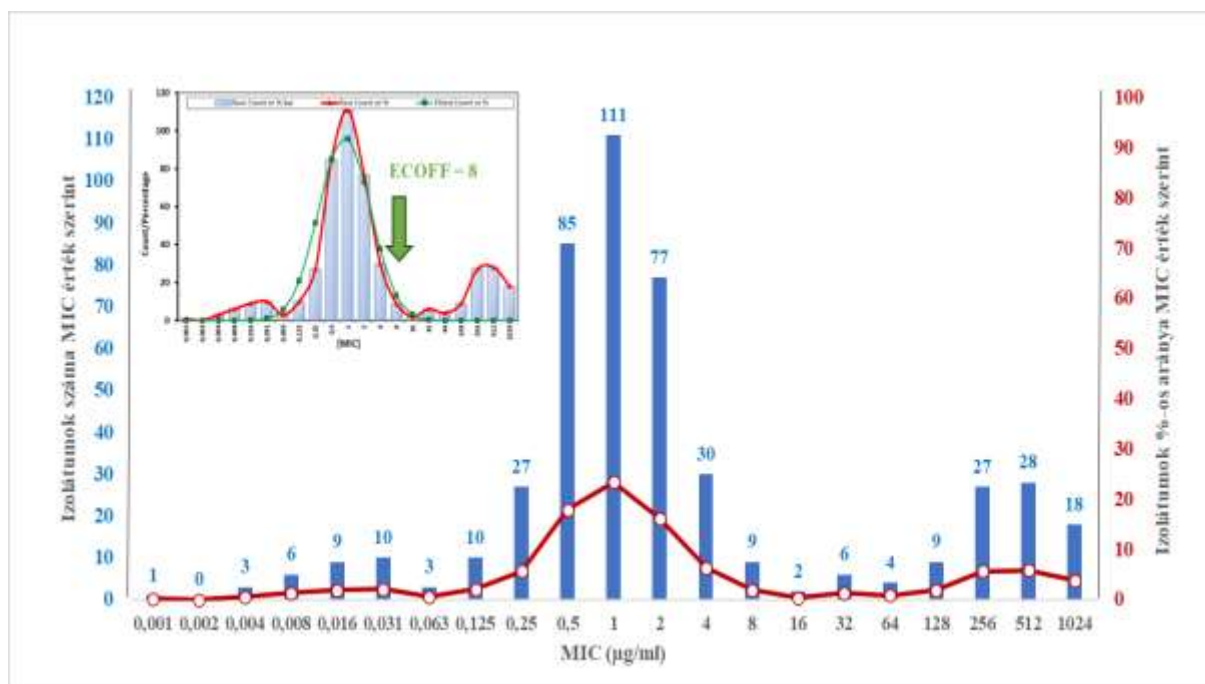
4.5. Az ECOFF érték meghatározása

Az ECOFF értékeket az ECOFFinder template [1] segítségével határoztuk meg. A 99%-os küszöbértékkel dolgoztunk, ami az a MIC érték, amely a modellezett vad típusú populáció 99%-át lefedti, ezzel növelve a vad típusú populációra vonatkozó specificitást.

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

5. EREDMÉNYEK

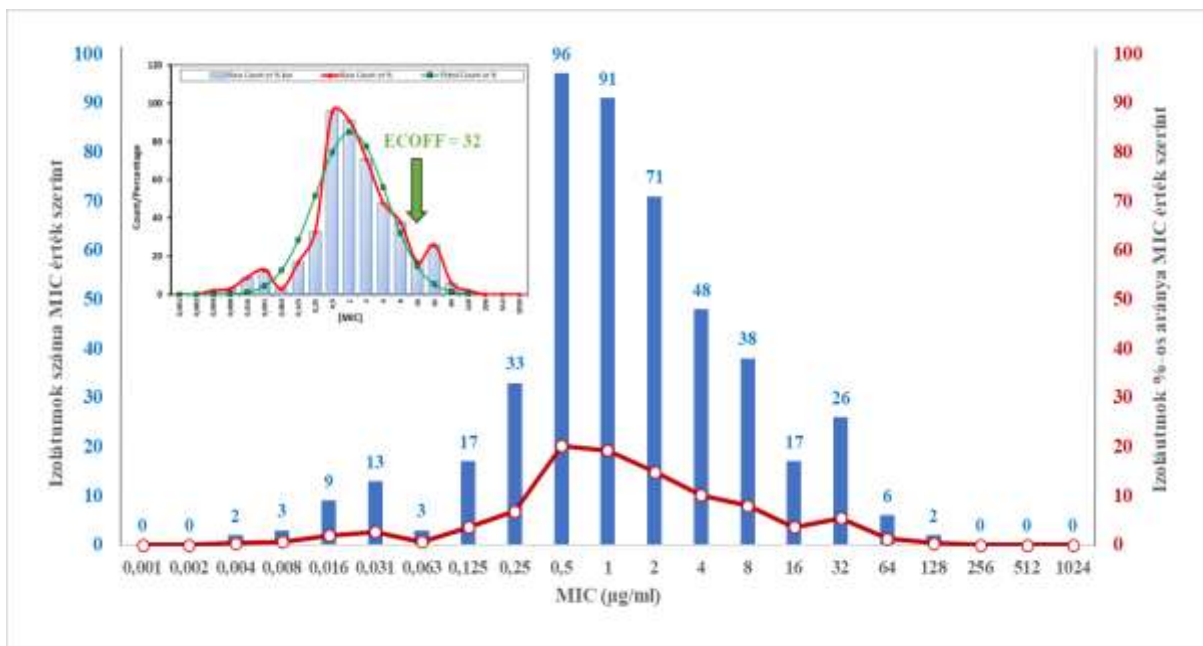
Összesen 475 házityúk eredetű *Enterococcus* törzs MIC-értékét határoztuk meg 15-féle hatóanyagra, összességében pedig 7125 MIC-értéket kaptunk. A MIC-értékekből hatóanyagonként készített gyakorisági táblázatok és az adatok megoszlása alapján amoxicillin, amoxicillin-klavulánsav, imipenem, spektinomycin, doxiciklin, florfenikol, enrofloxacin és vankomicin hatóanyagok esetén tudtunk ECOFF-értékeket meghatározni.



5. ábra Amoxicillin ECOFF-értéke házityúkból izolált *Enterococcus* spp. esetén

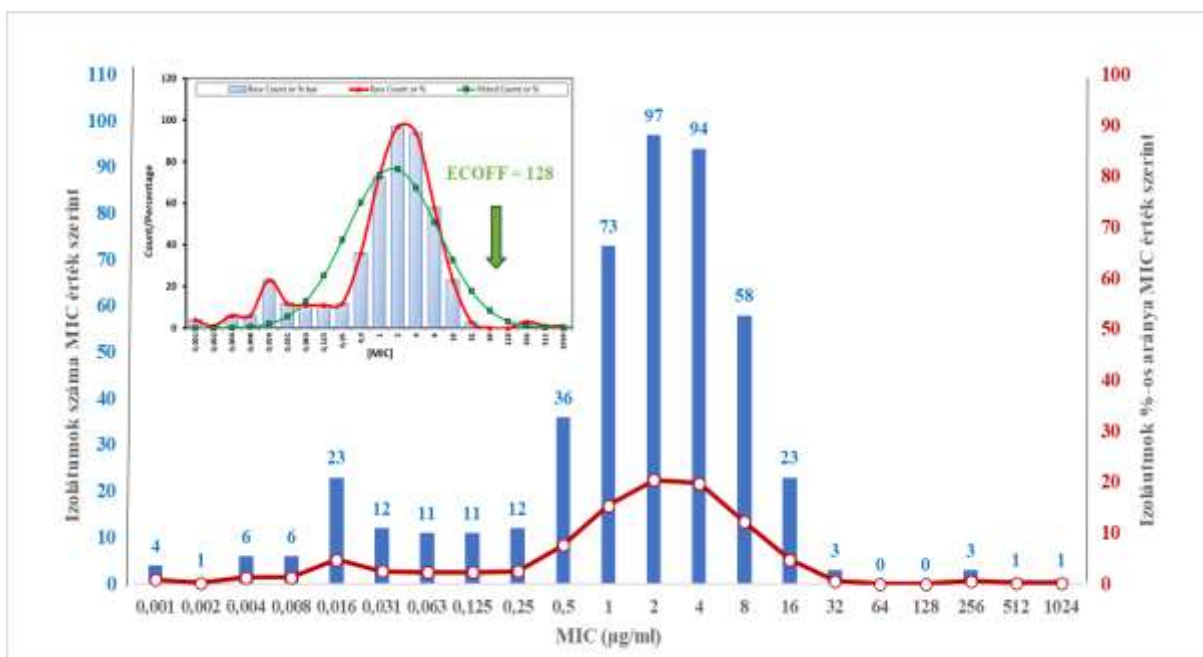
Az 5. ábrán látható, hogy amoxicillin esetén a program által számolt ECOFF-érték 8 µg/ml lett, ami egybevág az EUCAST által javasolt breakpoint értékkel. A törzsek MIC-érték szerinti megoszlása bimodális volt, így egyértelműen elkülönültek a vad-típusú törzsek, a rezisztens törzsektől. A törzsek 21%-a volt rezisztens. A 6. ábra szemlélteti az amoxicillin-klavulánsav esetén kapott ECOFF-értéket (32 µg/ml), ami az EUCAST 8 µg/ml breakpoint értékéhez képest két hígítással nagyobb, viszont az előzőhöz hasonlóan a rezisztencia mértéke ebben az esetben is 20% volt. Ceftriaxon esetén az *Enterococcus* spp. általában *ab ovo* rezisztensek a hatóanyagra nézve, amit alátámasztott az általunk kapott 97%-os rezisztencia érték is, ebben az esetben így nem volt értelme, illetve az adatok megoszlása sem tette lehetővé, hogy ECOFF-értéket határozzunk meg. A tiamulint és a kolisztint nem használjuk enterococcusok okozta fertőzések kezelésében, az adatok megoszlása szintén nem tette lehetővé ECOFF-érték meghatározását. Neomicin esetén a 77%-os rezisztencia

érték mellett a megoszlás következtében ugyan lefutott a program, de 32 768 µg/ml ECOFF-értéket kaptunk, aminek gyakorlati alkalmazása nem reális.



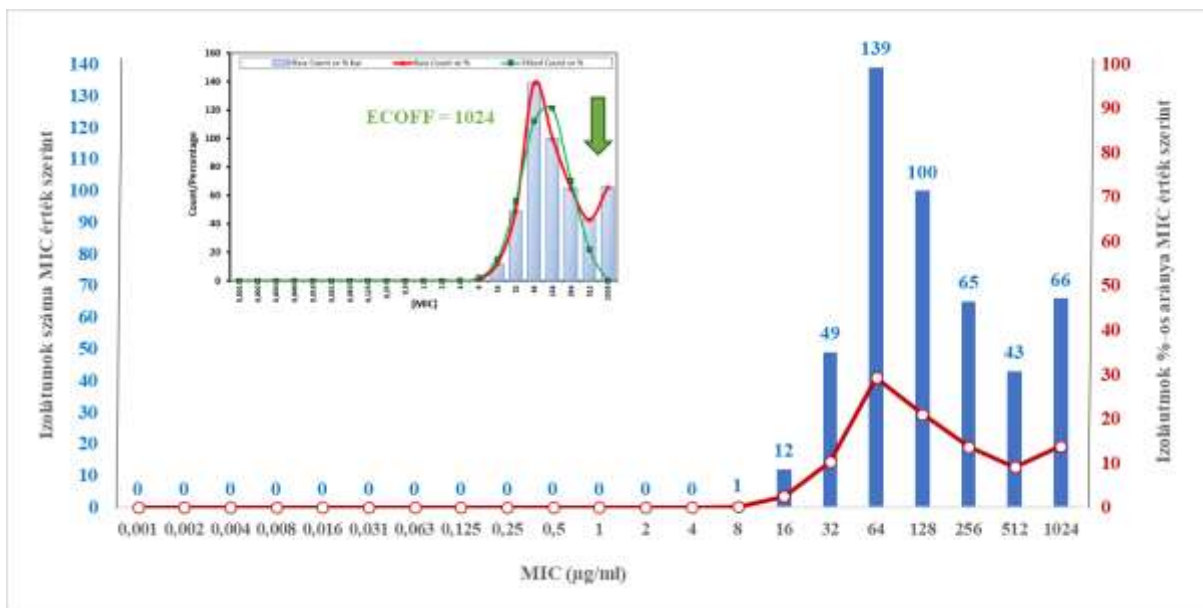
6. ábra Amoxicillin-klavulánsav ECOFF-értéke háztályukból izolált *Enterococcus* spp. esetén

Imipenem esetén (**7. ábra**) a 19%-os rezisztencia fenntartásokkal kezelendő, a hatóanyag szakirodalomban is leírt instabilitása miatt. Azonban elvégezve az ECOFF meghatározást 128 µg/ml értéket kaptunk, amit ha alapul veszünk a saját törzseink vizsgálata esetén, akkor a törzsek 99%-a érzékenynek bizonyul.



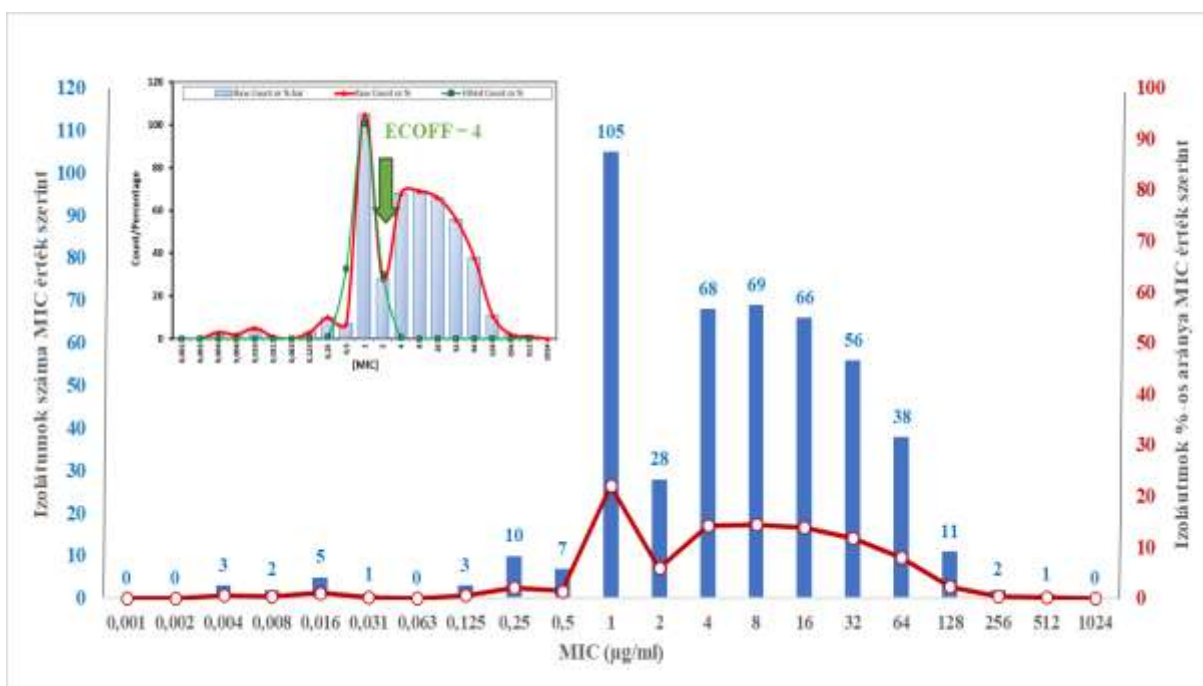
7. ábra Imipenem ECOFF-értéke háztályukból izolált *Enterococcus* spp. esetén

Spektinomicin esetén (8. ábra) az értékek jobbra tolódása ellenére sikeresen meghatározható volt az ECOFF-érték 1024 µg/ml koncentrációban, bár a törzseknek így a 86%-a bizonyul érzékenynek, ilyen magas koncentrációban használata nem gyakorlatias.



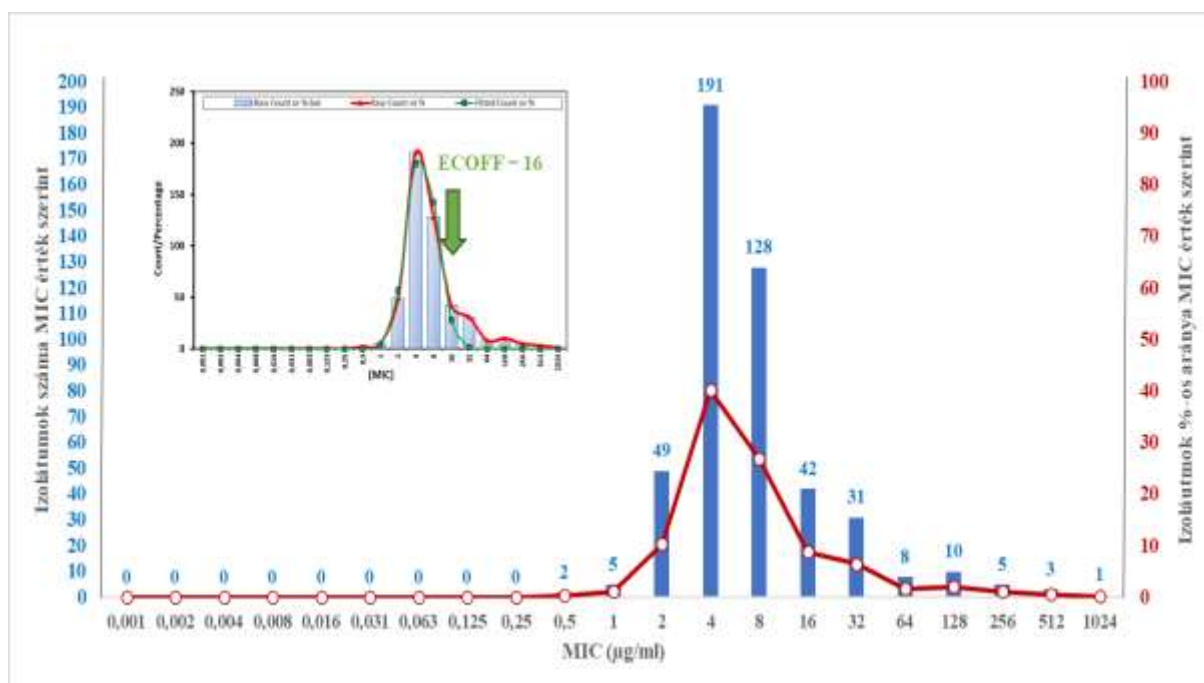
8. ábra Spektinomicin ECOFF-értéke házityúkból izolált *Enterococcus* spp. esetén

Doxiciklin esetén (9. ábra) a megoszlás alapján 4 µg/ml ECOFF-értéket kaptunk, ami bár magasabb az EUCAST breakpointjához képest (0,5 µg/ml), azonban a törzseknek még így is csak a 28%-a bizonyult érzékenynek, ellenben az EUCAST adatai alapján a törzsek 95%-a volt rezisztens.

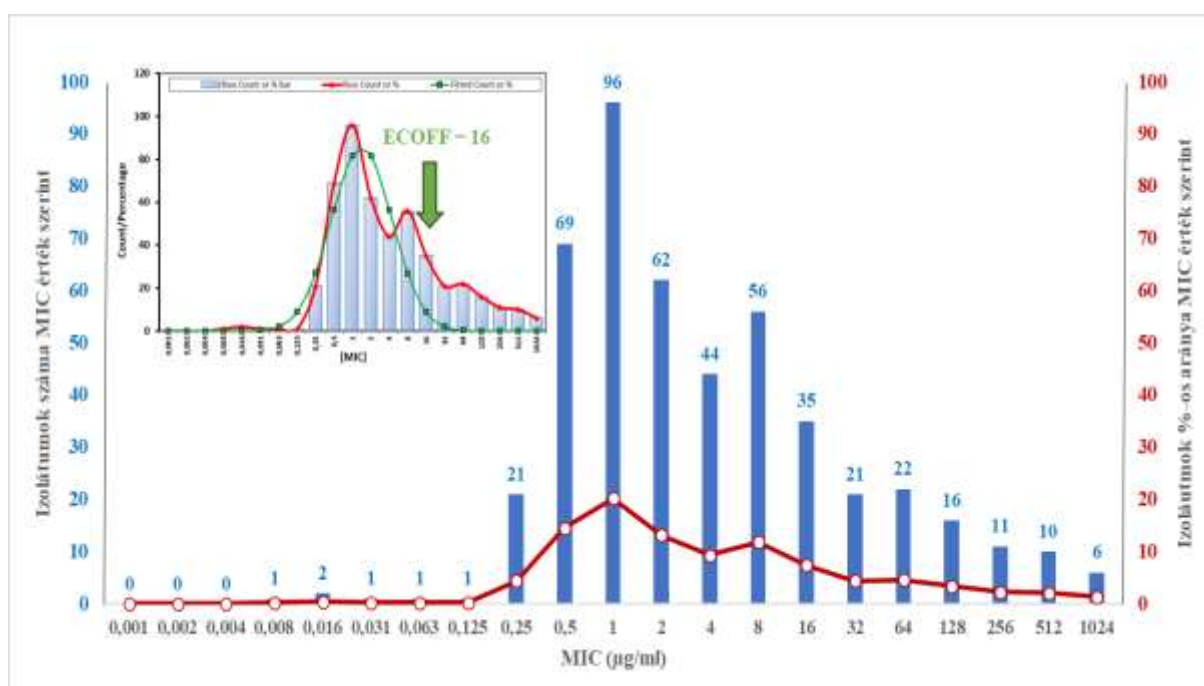


9. ábra Doxiciklin ECOFF-értéke házityúkból izolált *Enterococcus* spp. esetén

A **10. ábrán** látható a florfenikol MIC-értékeinek gyakorisági grafikonja, amiből a meghatározott ECOFF-érték 16 µg/ml érték lett, ez az EUCAST breakpointjához képest egy hígítással történő növekedést mutat. Az EUCAST töréspontja alapján a törzsek 50%-a volt rezisztens.

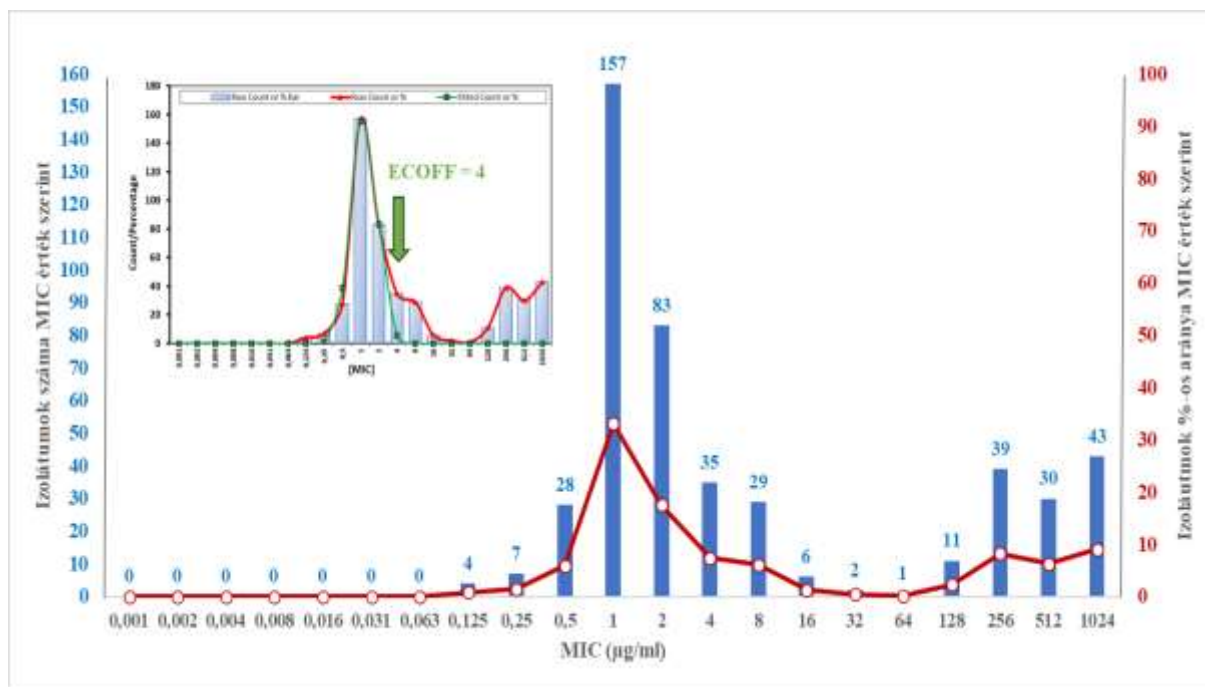


10. ábra Florfenikol ECOFF-értéke házityúkból izolált *Enterococcus* spp. esetén



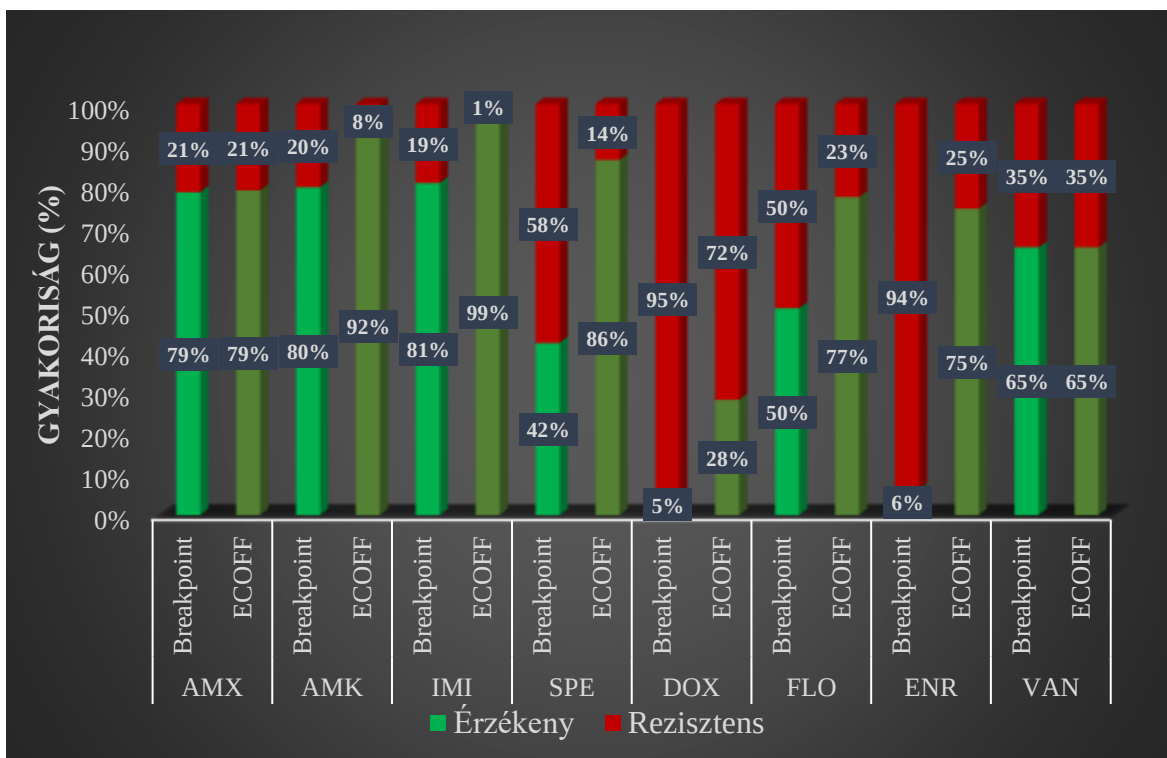
11. ábra Enrofloxacin ECOFF-értéke házityúkból izolált *Enterococcus* spp. esetén

Enrofloxacin esetén (**11. ábra**) általában magas MIC-értékeket tapasztaltunk, így az adatok megoszlása alapján a meghatározott ECOFF-érték 16 µg/ml lett, amit figyelembe véve a törzsek 75%-a tekinthető érzékenynek a hatóanyagra. Ellenben az EUCAST töréspontja szerint 94% volt rezisztens. Vankomicin esetén (**12. ábra**) a megoszlások egybevág-
tak az EUCAST által tapasztaltakkal, hiszen az ECOFF-értékünk az EUCAST töréspontjához hasonlóan 4 µg/ml volt. A rezisztens törzsek aránya így 35% volt.



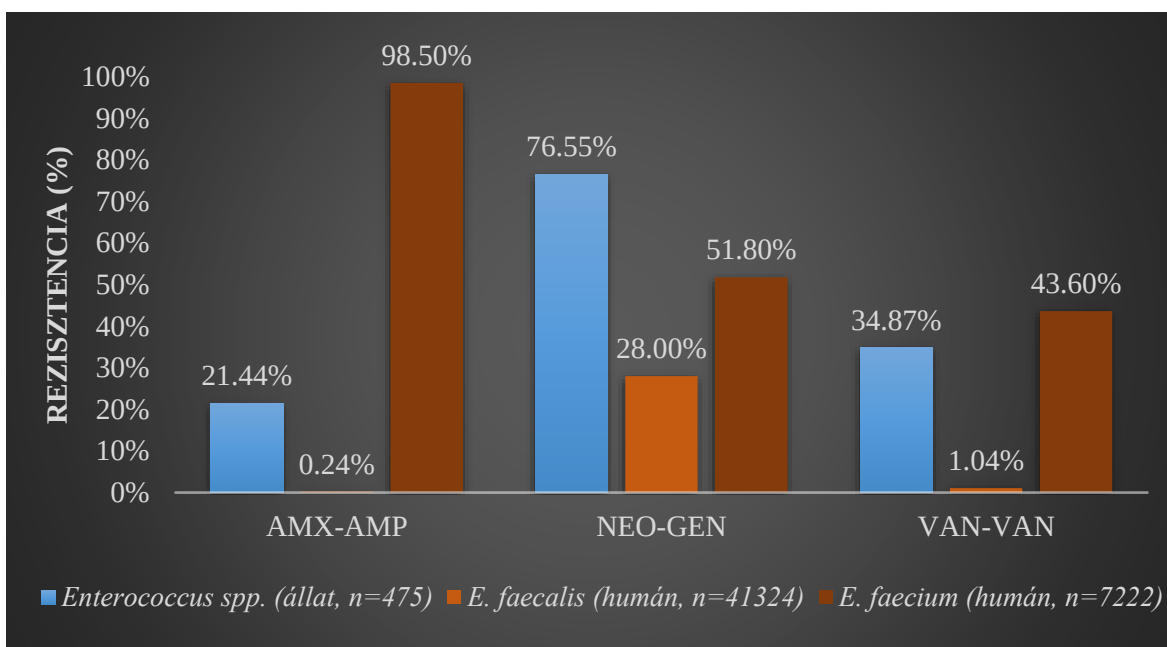
12. ábra Vankomicin ECOFF-értéke házityúkból izolált *Enterococcus* spp. esetén

A **13. ábrán** összehasonlítottuk az általunk használt, valamint a CLSI és EUCAST által meghatározott töréspont értékek alapján kiszámolt érzékenységi és rezisztencia megoszlást. Ez alapján amoxicillin esetén (8 µg/ml) és vankomicin esetén (4 µg/ml) ugyanazt az eredményt kaptuk, mint amit a szakirodalomban használnak. Amoxicillin-klavulánsav esetén (8 µg/ml; 32 µg/ml), imipenem esetén (4 µg/ml; 128 µg/ml), spektinomycin esetén (128 µg/ml; 1024 µg/ml), doxiciklin esetén (0,5 µg/ml; 2 µg/ml), florfenikol esetén (8 µg/ml; 16 µg/ml) és enrofloxacin esetén (0,5 µg/ml; 16 µg/ml) viszont nagyobb értékeket kaptunk. Az adott területre meghatározott ECOFF-értékek használatának létjogosultságát tükrözik az érzékenységi adatok közötti különbségek is, amoxicillin-klavulánsav esetén (80%; 92%) imipenem esetén (81%; 99%), spektinomycin esetén (42%; 86%), doxiciklin esetén (5%; 28%), florfenikol esetén (50%; 77%) és enrofloxacin esetén (6%; 75%) az érzékenység aránya jóval közelebb áll a valósághoz, ha az adott terület vad-típusú és nem vad-típusú törzseire alapozott eredmények vettük alapul, mintha más töréspontokat használunk fel.



AMX-amoxicillin; AMK-amoxicillin-klavulánsav; IMI-imipenem; SPE-spektinomycin; DOX-doxiciklin; FLO-florfenikol; ENR-enrofloxacin; VAN-vankomicin

13. ábra EUCAST breakpointok és a saját adatainkból házityúk *Enterococcus* törzsekre (n=475) meghatározott ECOFF értékek alapján kapott érzékenységi és rezisztencia arányok



Állatorvosi adatok esetén: AMX-amoxicillin; NEO-neomicin; VAN-vankomicin. Humán adatok tekintetében: AMP-ampicillin; GEN-gentamicin; VAN-vankomicin.

14. ábra Az állati és humán izolátumok antibiotikum érzékenységi profiljának összevetése, a rendelkezésre álló adatok alapján

Összehasonlítottuk a rendelkezésre álló adatok alapján három hatóanyag (**14. ábra**) esetén az állati eredetű törzsek és a humán eredetű törzsek rezisztencia profilját. Vizsgálatunk során az állati eredetű törzsek rezisztencia profilját nemzetség szintjén határoztuk meg, humán vonalon viszont *E. faecalis* és *E. faecium* fajok szintjén álltak rendelkezésünkre az adatok. Minden esetben jól látszik, hogy az *E. faecium* törzsek esetén jóval kedvezőtlenebb a rezisztencia helyzete, míg az *E. faecalis* törzsek általában kismértékű rezisztenciát mutatnak a hatóanyagokra. Egyedül az aminoglikozidokat vizsgálva láthatjuk, hogy neomicin esetén állatorvosi vonalon sokkal nagyobb mértékű a rezisztencia (76,55%), ami a hatóanyagcsoport évtizedek óta történő, széleskörű használatának tulajdonítható az állatorvoslásban.

1. táblázat Az egyes hatóanyagokra meghatározott ECOFF-értékek regionális szinten

Hatóanyag	Breakpoint	ECOFF 99% R'd-up						
		Dél-Alföld n=55	Dél-Dunántúl n=80	Észak-Alföld n=71	Észak-Magyarország n=71	Közép-Dunántúl n=92	Közép-Magyarország n=56	Nyugat-Dunántúl n=50
		µg/ml						
amoxicillin	8	4	4	8	128	16	2	8
amoxicillin-klavulánsav	8	2	-	8	-	16	8	8
imipenem	4	8	-	16	-	-	8	32
neomicin	64	-	-	512	-	2048	-	1024
spektinomycin	128	1024	-	-	256	256	2048	128
doxiciklin	2	128	256	128	64	8192	1024	-
florfenikol	8	16	32	16	8	32	32	8
tilozin	128	8	-	-	2	2	-	2
tiamulin	-	-	-	512	-	-	2048	-
linkomicin	128	-	-	-	8192	-	-	128
enrofloxacin	0,5	1	-	16	4	16	16	4
potenciált szulfonamid	16	128	-	-	-	-	8	-
vankomicin	4	16	-	32	1	4	-	2

Az **1. táblázatban** összefoglalva láthatóak a regionális szintre lebontott adatok alapján történt ECOFF-érték meghatározás eredményei; azokban az esetekben, ahol a MIC-értékek bimodális megoszlást követtek, így kiszámolhatóak voltak ezek az értékek. Mivel régióként az adatok mennyisége nem éri el az ajánlott minimális százalékot, így ezek az eredmények tájékoztató és előzetes jellegűek. Amoxicillin esetén az észak-magyarországi régióban kaptunk kiugró értéket (128 µg/ml), de voltak olyan régiók, ahol a nemzetközi törésponthoz képest sokkal jobb volt a helyzet, mint például Közép-Magyarország (2 µg/ml) régiója. Amoxicillin-klavulánsav esetén regionális szinten szintén nagyon hasonló értékeket kaptunk az EUCAST eredményeihez viszonyítva (8 µg/ml). Imipenem esetén már minden esetben magasabb értékeket tapasztaltunk, melyek közül a nyugat-dunántúli érték mutatta a legmagasabbat (32 µg/ml). Neomicin esetén az eredmények jól tükrözik a nagyfokú rezisztencia jelenlétét, bár több esetben sikerült meghatározni ECOFF-értéket, azonban ezen koncentrációk használata már nem gyakorlatias. Spektinomycin és doxiciklin esetén szintén jóval magasabb értékeket kaptunk, melyek használata a gyakorlatban nem releváns. Florfenikol esetén szintén indokolt lehet a töréspont növelése, hiszen a legtöbb esetben meghaladta mind a regionális és az országos ECOFF-érték a nemzetközi elfogadott értéket (8 µg/ml). Tilozin esetén az adatok eloszlása miatt bár országos szinten nem lehetett ECOFF-értéket meghatározni, regionális szinten néhány esetben igen, ahol sokkal nagyobb érzékenységet tapasztaltunk, mint ahogy a szakirodalomban leírt töréspont mutatja (128 µg/ml). Az enrofloxacin eredményei egyértelműen a rezisztencia széles körű elterjedését mutatják, ami a baromfifélék körében indokoltá teszi a breakpoint értékének felülbírálatát. A potenciált szulfonamid (szulfametoxazol és trimetoprim) használata különösen a háziállatok esetén korábban a kokcidiózis kezelésében széles körű volt, ami miatt a rezisztencia is elterjedt, ezt alátámasztják az általunk kapott eredmények is. Vankomicin esetén a legtöbb régió összhangban áll mind a nemzetközi breakpoint értékkel (4 µg/ml), mind pedig az országosan szinten meghatározott ECOFF-értékkel (4 µg/ml). A dél-alföldi (16 µg/ml) és az észak-alföldi (32 µg/ml) régiók esetén tapasztaltunk kiugróan magas értékeket.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataink során 475 házityúkból izolált *Enterococcus* spp. törzs MIC-értékét határoztuk meg 15-féle hatóanyagra nézve, majd összesen 7125 MIC-érték felhasználásával ECOFF-értékek meghatározását végeztük el. Az adatok megoszlása alapján 8-féle hatóanyag esetén határoztuk meg sikeresen az ECOFF-értéket. Vizsgálataink során a többi hatóanyag esetén az adatok megoszlása nem volt bimodális, ezért nem volt lehetséges az ECOFF-érték meghatározása, Laurentie és mtsai. vizsgálataik során az adatok nem bimodális megoszlásából fakadóan hasonlókat tapasztaltak [54].

Amoxicillin esetén 8 µg/ml ECOFF-értéket kaptunk, ami egybevág az EUCAST által meghatározott értékkel [55]. Összehasonlító irodalmi forrás nem áll rendelkezésre. Az általunk vizsgált törzsek 21%-a bizonyult rezisztensnek, ezzel ellenben Bekele és mtsai. 43-63% közötti rezisztencia értékekről számoltak be [56]. Lemsaddek és mtsai. penicillinre hagyományos tartás esetén 33,3%-os, szabadtartás esetén 6,25%-os rezisztenciát írtak le [57]. Amoxicillin-klavulánsav vizsgálata során 32 µg/ml ECOFF-értéket határoztunk meg, ami a EUCAST értékéhez képest (8 µg/ml) nagyobb [55], összehasonlító szakirodalmi adat nincs. A rezisztens törzsek aránya 20% volt, Ayeni és mtsai. ezzel szemben 73,3%-os rezisztenciát tapasztaltak [58], ezzel szemben Pesavento és mtsai. 1,47%-os rezisztenciát írtak le [59]. Imipenem hatóanyagra az ECOFF-érték 128 µg/ml, ami jóval nagyobb, mint az EUCAST 4 µg/ml értéke [55], összehasonlító vizsgálat nem áll rendelkezésre, azonban az imipenem ismert stabilitási problémái miatt az eredményt tájékoztató jellegűnek tekinthetjük. A rezisztens törzsek aránya 19% volt, Roy és mtsai. viszont 55,6%-os rezisztenciát írtak le [60], viszont Schwaiger és mtsai. ökológia tartásban csak 4,3%-os, hagyományos tartásban 5,5%-os [61], Li és mtsai. 15,9%-os rezisztenciát írtak le [62].

Spektinomicin esetén 1024 µg/ml ECOFF-értéket írtunk le és a törzsek 58%-a bizonyult rezisztensnek, ezzel szemben Karunarathna és mtsai. 9%-os rezisztenciát írtak le [63]. A tetraciklinek közül doxiciklin hatóanyagot vizsgáltunk, melynek az ECOFF-értéke 2 µg/ml lett, Laurentie és mtsai. 1 µg/ml értéket határoztak meg [64]. A rezisztencia mértéke doxiciklinre 95%-os volt, ezzel szemben Ayeni és mtsai. tetraciklinre 81,7%-os [58], Bekele és mtsai. doxiciklinre 26-41%-os [56], Pesavento és mtsai. tetraciklinre 75%-os [59], Roy és mtsai. tetraciklinre 26,7%-os [60], Schwaiger és mtsai. doxiciklinre ökotartásban 39,7%-os, hagyományos tartásban 70,1%-os [61], Semedo-Lemsaddek és mtsai. tetraciklinre hagyományos tartásban 77,7%-os, szabadtartásban 87,5%-os [57], Karunarathna és mtsai. tetraciklinre 73,4%-os [63], Pavia és mtsai. 84,4%-os [65], Noh és mtsai. tetraciklinre 78,1%-os,

doxiciklinre 58,2%-os [66], Usui és mtsai. pedig oxitetraciklinre 69,2%-os [67] rezisztenciát állapítottak meg.

Florfenikol esetén 16 µg/ml ECOFF-értéket kaptunk, szemben az EUCAST 8 µg/ml értékéhez képest [55]. A rezisztens törzsek aránya 50% volt, ezzel szemben Schwaiger és mtsai. ökotartásban és hagyományos tartásban sem találtak rezisztens törzset [61]. Karunarathna és mtsai. 0,4%-os [63] rezisztenciát találtak. Enrofloxacin esetén 16 µg/ml ECOFF-értéket számoltunk ki, szemben az EUCAST 0,5 µg/ml értékével [55], Laurentie és mtsai. ciprofloxacinnal esetén 4 µg/ml, levofloxacin esetén 2 µg/ml ECOFF-értéket határoztak meg [64]. Enrofloxacin esetén 56%-os rezisztenciát tapasztaltunk, Ayeni és mtsai. ofloxacin esetén 68,3%-os [58], Pesavento és mtsai. ciprofloxacinnal esetén 10,3%-os [59], Roy és mtsai. ciprofloxacinnal és norfloxacinnal 17,8%-os [60], Schwaiger és mtsai. ciprofloxacinnal viszont csak 0,6%-os [61], Karunarathna és mtsai. enrofloxacinra 5,1%-os [63] rezisztenciát írtak le.

Vankomicin esetén eredményeink egybevágtak az EUCAST által is megállapított 4 µg/ml ECOFF-értékkel [64], Pantozzi és mtsai. szintén 4 µg/ml ECOFF-értéket mutattak ki [68], viszont Laurentie és mtsai. 2 µg/ml ECOFF-értéket találtak [64]. A rezisztencia tekintetében a törzsek 35%-a esetén tapasztaltunk rezisztenciát, ezzel szemben Liu és mtsai. 92% feletti rezisztenciát figyeltek meg vizsgálataik során [69]. Ayeni és mtsai. 65%-os [58], Bekele és mtsai. 15-66% közötti [56], Pesavento és mtsai. viszont csak 2,9%-os [59], Roy és mtsai. pedig csak 4,4%-os [60], Karunarathna és mtsai. 1,9%-os [63], ellenben Schwaiger és mtsai. nem mutattak ki rezisztenciát a vizsgált törzsek esetén [61], ahogy Semedo-Lemsaddek és mtsai. sem [57].

Neomicin esetén 77%-os rezisztenciát tapasztaltunk, az adatok megoszlása alapján pedig igen magas és nem gyakorlatias ECOFF-értéket kaptunk, Laurentie és mtsai. gentamicinre 4 µg/ml ECOFF-értéket állapítottak meg [64], Li és mtsai. 5,7%-os rezisztenciát írtak le [62]. Potenciált szulfonamid (szulfametoxazol és trimetoprim) tekintetében a MIC-értékek megoszlása nem tette lehetővé az ECOFF-érték meghatározását, a vele szembeni rezisztencia pedig 56%-os volt. Makarov és mtsai. *E. faecalis* esetén 32,9%-os és *E. faecium* esetén 36,6%-os [70], Karunarathna és mtsai. viszont csak 7,4%-os [63] rezisztenciát állapítottak meg.

Összehasonlítottuk a kommenzalista törzsek és a humán rezisztencia adatok érzékenységét. A penicillinek közül állatorvosi vonalon amoxicillin esetén 21,4%-os, humán vonalon ampicillin esetén *E. faecalis* fajra 0,2%-os, *E. faecium* fajra 98,5%-os rezisztenciát találtunk.

Bortolaia és mtsai. összehasonlító vizsgálatuk során *E. faecium* törzseknél Dániában ampicillinre brojlercsirkénél összességében kb. 20%-os, a humán egészségügyben pedig >90%-os rezisztenciát találtak; Svédországban a 80%-os humán rezisztencia ellenére csirkékben nem mutattak ki rezisztenciát; Hollandiában brojlercsirkékben 10%-os, emberekben közel 90%-os rezisztenciát írtak le, ezzel szemben az Amerikai Egyesült Államokban brojlercsirkékben összességében 60% feletti, míg humán törzseknél kb. 90%-os rezisztenciát találtak [24].

Az aminoglikozidok közül állatorvosi vonalon neomicinre 76,6%-os, humán vonalon gentamicin esetén *E. faecalis* fajra 28%, *E. faecium* fajra 51,8%-os rezisztenciát találtunk. Bortolaia és mtsai. összehasonlító vizsgálatuk során *E. faecium* törzseknél Dániában gentamicinre brojlercsirkénél összességében kb. 5%-os, a humán egészségügyben pedig kb. 60%-os rezisztenciát találtak; Svédországban a 20%-os humán rezisztencia ellenére csirkékben nem mutattak ki rezisztenciát; Hollandiában brojlercsirkékben kb. 2%-os, emberekben közel 70%-os rezisztenciát írtak le, ezzel szemben az Amerikai Egyesült Államokban brojlercsirkékben összességében kb. 20%-os, míg humán törzseknél kb. 10%-os rezisztenciát találtak [24].

Vankomicin hatóanyagra állatorvosi vonalon 34,9%-os, humán vonalon *E. faecalis* fajra 1%-os, *E. faecium* fajra 43,6%-os rezisztenciát találtunk. Bortolaia és mtsai. összehasonlító vizsgálatuk során *E. faecium* törzseknél Dániában vankomicinre brojlercsirkénél 0%-os, a humán egészségügyben pedig kb. 5%-os rezisztenciát találtak; Svédországban és Hollandiában nem mutattak ki rezisztenciát, ezzel szemben az Amerikai Egyesült Államokban brojlercsirkékben 0%-os, viszont humán törzseknél kb. 80%-os rezisztenciát írtak le [24].

Összességében elmondhatjuk, hogy érdemes nemcsak állatorvosi, hanem közegészségügyi szempontból fontos hatóanyagok rezisztencia vizsgálatát is elvégezni, nem csak országos, hanem területi bontásban is. Érdemes követni és összehasonlítani az állat-és közegészségügyi adatok alakulását, hiszen az *Enterococcus* fajok okozta fertőzések feltörekvő betegségek, a baromfiipar pedig az egyik legnagyobb antibiotikum felhasználó. Az ECOFF-értékek segíthetnek a hatékony kezelések kiválasztásában, azáltal, hogy segítségükkel területileg el tudjuk különíteni a vad-típusú és a nem vad-típusú baktérium populációkat.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az antimikrobiális rezisztencia meghatározó tényezővé vált az emberiség jövője szempontjából, új kihívásokat állítva az állat- és humánegészségügy számára. Kutatásom közepontjában az *Enterococcus* nemzettség áll, amelynek közegészségügyi jelentősége nagy, kiváltképpen a multirezisztens és nozokomiális fertőzésekhez köthetően.

Korábban Magyarországon olyan átfogó tanulmány nem készült, ami a baromfiágazat kommenzalista *Enterococcus* törzseinek állat- és közegészségügyi szempontból jelentős antimikrobiális hatóanyagokkal szembeni érzékenységét vizsgálta országos és regionális szinten. Vizsgálataink során minimális gátló koncentráció (MIC) értékek meghatározását követően az eredmények felhasználásával epidemiológiai küszöbértékek (ECOFF) meghatározását végeztük el a vad-típusú és nem vad-típusú törzsek elkülönítése érdekében. Továbbá eredményeinket összehasonlítottuk humán rezisztencia adatokkal.

Az országos ECOFF-értékek tekintetében amoxicillin esetén 8 µg/ml értéket állapítottunk meg, ami egybevág a *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) eredményeivel. Amoxicillin-klavulánsav esetén viszont jóval magasabb értéket kaptunk (32 µg/ml), mint az EUCAST által megállapított 8 µg/ml érték. Doxiciklin esetén 2 µg/ml értéket kaptunk, szemben az EUCAST 0,5 µg/ml értékével. Florfenikol esetén eredményünk nagyon hasonló az EUCAST által meghatározott törésponthoz. Enrofloxacin esetén viszont sokkal nagyobb (16 µg/ml) értéket állapítottunk meg, szemben az EUCAST 0,5 µg/ml értékéhez. Ennek az oka valószínűsíthetően arra vezethető vissza, hogy a baromfiágazatban jellemző a fluorokinolon hatóanyagok túlzott mértékű felhasználása. Vizsgáltuk a humán egészségügy számára tartalékolt vankomicin hatóanyagot is, ebben az esetben eredményeink egybevágtak az EUCAST eredményeivel (4 µg/ml). Regionális szinten jelentős eltéréseket figyeeltünk meg, számos esetben a törzsek ECOFF-értéke kedvezőbb volt az országos, illetve az EUCAST értékeihez képest. A humán adatokkal összevetve az eredményeket, megállapíthatjuk, hogy a humán *E. faecium* törzsek ampicillin rezisztenciája csaknem teljes (98,5%), szemben az állati minták 21,44%-os értékével. Az életmentő vankomicin hatóanyaggal szembeni humán rezisztencia mértéke szintén meghaladja (43,6%) az állati eredetű mintákét (34,8%).

Eredményeink alapján indokolt a rezisztencia regionális szintű monitorozása, valamint az ECOFF-értékek meghatározása is, hiszen a vad-típusú törzsek és a nem vad-típusú törzsek közötti töréspont megállapítása hozzájárulhat a hatékony dózis kiválasztásához, ezáltal megalapozva a kezelés hatékonyságát, minimalizálva a rezisztencia kialakulásának esélyét.

8. SUMMARY

Antimicrobial resistance has become a key factor for the future of humanity, posing new challenges for animal and human health. My research focuses on the genus *Enterococcus*, which is of great public health importance, particularly in relation to multi-drug resistant and nosocomial infections.

Previously, no comprehensive study has been conducted in Hungary to investigate the susceptibility of commensal *Enterococcus* strains of the poultry sector to antimicrobial agents of animal and public health significance at national and regional level. In our studies, minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined, and the results were used to establish epidemiological thresholds (ECOFF) to differentiate wild-type and non-wild-type strains. Furthermore, our results were compared with human resistance data.

The national ECOFF values for amoxicillin were found to be 8 µg/ml, which is in line with the results of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). For amoxicillin-clavulanic acid, however, a much higher value (32 µg/ml) was obtained than the 8 µg/ml value established by EUCAST. For doxycycline, a value of 2 µg/ml was obtained compared to the EUCAST value of 0.5 µg/ml. For florfenicol our results are very similar to the EUCAST breakpoint. For enrofloxacin, however, we obtained a much higher value (16 µg/ml) compared to the EUCAST value of 0.5 µg/ml. This is probably due to the overuse of fluoroquinolone active substances in the poultry sector. We also tested vancomycin, an active substance reserved for human health, and in this case our results were in line with EUCAST (4 µg/ml). At regional level, we observed significant differences, with several strains having ECOFF values more favourable than national and EUCAST values. Comparing the results with the human data it can be concluded that ampicillin resistance in human *E. faecium* strains is almost complete (98.5%) compared to 21.44% in animal samples. The level of human resistance to the life-saving drug vancomycin is also higher (43.6%) than that of animal samples (34.8%).

Our results also justify the regional monitoring of resistance and the determination of ECOFF values, as the identification of the breakpoint between wild-type and non-wild-type strains can contribute to the selection of an effective dose, thus establishing the efficacy of treatment and minimising the chance of resistance development.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G (2006) Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect* 12:418–425. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01377.x>
2. Zhang H-L, Wu S-L, Fu J-L, Jiang H-X, Ding H-Z (2021) Research Note: Epidemiological cutoff values and acquired resistance mechanisms of three veterinary antibiotics against *Escherichia coli* from chicken respiratory tract infections. *Poult Sci* 100:1093–1097. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.11.049>
3. Siegel AF (2012) Chapter 3 - Histograms: Looking at the Distribution of Data. In: Siegel AF (ed) *Practical Business Statistics (Sixth Edition)*. Academic Press, Boston, pp 35–64
4. Rodríguez-Reinoso F, Sepúlveda-Escribano A (2001) Chapter 9 - POROUS CARBONS IN ADSORPTION AND CATALYSIS. In: Nalwa HS (ed) *Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials*. Academic Press, Burlington, pp 309–355
5. Donner S (2021) Chapter Three - Rotational ground motion measurements for regional seismic moment tensors: A review. In: Schmelzbach C (ed) *Advances in Geophysics*. Elsevier, pp 141–186
6. Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy C-J, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G (2013) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection* 19:141–160. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x>
7. Nikolaisen NK, Ronaghinia AA, Lassen DCK, Chehabi CN, Lindegaard M, Struve T, Chriél M, Damborg P, Kahlmeter G, Jensen LB, Pedersen K (2020) Employing MIC Data for Mink Pathogens to Propose Tentative Epidemiological Cut-Off Values: A Step Toward Rationalizing Antimicrobial Use in Mink. *Front Vet Sci* 7:544594. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.544594>
8. Giske CG, Turnidge J, Cantón R, Kahlmeter G Update from the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *J Clin Microbiol* 60:e00276-21. <https://doi.org/10.1128/jcm.00276-21>
9. Mouton JW, Brown DFJ, Apfalter P, Cantón R, Giske CG, Ivanova M, MacGowan AP, Rodloff A, Soussy C-J, Steinbakk M, Kahlmeter G (2012) The role of pharmacokinetics/pharmacodynamics in setting clinical MIC breakpoints: the EUCAST approach. *Clinical Microbiology and Infection* 18:E37–E45. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03752.x>
10. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW (2013) Breakpoints for antifungal agents: An update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp. and triazoles against *Aspergillus* spp. *Drug Resistance Updates* 16:81–95. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2014.01.001>

11. Arendrup MC, Friberg N, Mares M, Kahlmeter G, Meletiadis J, Guinea J, Arendrup MC, Meletiadis J, Guinea J, Friberg N, Mares M, Kahlmeter G, Andersen CT, Arikian-Akdagli S, Barchiesi F, Chryssanthou E, Hamal P, Järn H, Klimko N, Kurzai O, Lagrou K, Lass-Flörl C, Matos T, Muehlethaler K, Rogers TR, Velegraki A, Arikian S (2020) How to interpret MICs of antifungal compounds according to the revised clinical breakpoints v. 10.0 European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). *Clinical Microbiology and Infection* 26:1464–1472. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.06.007>
12. Turnidge J, Kahlmeter G, Kronvall G (2006) Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clinical Microbiology and Infection* 12:418–425. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01377.x>
13. Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, Curiao T, Coque T, Kalkanci A, Martinez JL, BIOHYPO Consortium (2014) Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS One* 9:e86669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086669>
14. Bronzwaer S (2008) Harmonised monitoring of antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* isolates from food animals in the European Union. *Clinical Microbiology and Infection* 14:522–533. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02000.x>
15. Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, MacGowan AP, Mouton JW, Österlund A, Rodloff A, Steinbakk M, Urbaskova P, Vatopoulos A (2003) European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:145–148. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg312>
16. Cornaglia G, Hryniewicz W, Jarlier V, Kahlmeter G, Mittermayer H, Stratchounski L, Baquero F (2004) European recommendations for antimicrobial resistance surveillance. *Clinical Microbiology and Infection* 10:349–383. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00887.x>
17. Tang KWK, Millar BC, Moore JE (2023) Antimicrobial Resistance (AMR). *Br J Biomed Sci* 80:11387. <https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387>
18. Antimicrobial Resistance Collaborators (2022) Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399:629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
19. Freitas AR, Werner G (2023) Nosocomial Pathogens and Antimicrobial Resistance: Modern Challenges and Future Opportunities. *Microorganisms* 11:1685. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071685>
20. Salam MdA, Al-Amin MdY, Salam MT, Pawar JS, Akhter N, Rabaan AA, Alqumber MAA (2023) Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare (Basel)* 11:1946. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>
21. 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>

22. Seby R, Kim C, Khreis M, Khreis K (2022) Enterococcus faecalis-induced infective endocarditis: an unusual source of infection and a rare clinical presentation. *J Int Med Res* 50:3000605221112019. <https://doi.org/10.1177/03000605221112019>
23. Shah ASV, McAllister DA, Gallacher P, Astengo F, Rodríguez Pérez JA, Hall J, Lee KK, Bing R, Anand A, Nathwani D, Mills NL, Newby DE, Marwick C, Cruden NL (2020) Incidence, Microbiology, and Outcomes in Patients Hospitalized With Infective Endocarditis. *Circulation* 141:2067–2077. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044913>
24. Bortolaia V, Espinosa-Gongora C, Guardabassi L (2016) Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and Staphylococcus aureus on poultry meat. *Clin Microbiol Infect* 22:130–140. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.003>
25. Pinholt M, Ostergaard C, Arpi M, Bruun NE, Schønheyder HC, Gradel KO, Søgaard M, Knudsen JD, Danish Collaborative Bacteraemia Network (DACOBAN) (2014) Incidence, clinical characteristics and 30-day mortality of enterococcal bacteraemia in Denmark 2006-2009: a population-based cohort study. *Clin Microbiol Infect* 20:145–151. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12236>
26. Hussain A, Sohail M, Abbas Z (2016) Prevalence of Enterococcus faecalis mediated UTI and its current antimicrobial susceptibility pattern in Lahore, Pakistan. *J Pak Med Assoc* 66:1232–1236
27. Mendes RE, Sader HS, Castanheira M, Flamm RK (2018) Distribution of main Gram-positive pathogens causing bloodstream infections in United States and European hospitals during the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2010-2016): concomitant analysis of oritavancin in vitro activity. *J Chemother* 30:280–289. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2018.1516272>
28. Negash AA, Asrat D, Abebe W, Hailemariam T, Hailu T, Aseffa A, Vaneechoutte M (2019) Bacteremic Community-Acquired Pneumonia in Ethiopian Children: Etiology, Antibiotic Resistance, Risk Factors, and Clinical Outcome. *Open Forum Infect Dis* 6:ofz029. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz029>
29. Karunarathna R, Ahmed KA, Goonewardene K, Gunawardana T, Kurukulasuriya S, Liu M, Gupta A, Popowich S, Ayalew L, Chow-Lockerbie B, Willson P, Ngeleka M, Gomis S (2022) Exposure of embryonating eggs to Enterococcus faecalis and Escherichia coli potentiates E. coli pathogenicity and increases mortality of neonatal chickens. *Poult Sci* 101:101983. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101983>
30. Tankson JD, Thaxton JP, Vizzier-Thaxton Y (2002) Morphological changes in heart and lungs of broilers experiencing pulmonary hypertension syndrome caused by Enterococcus faecalis. *Poult Sci* 81:365–370. <https://doi.org/10.1093/ps/81.3.365>
31. Cassenego APV, d’Azevedo PA, Ribeiro AML, Frazzon J, Van Der Sand ST, Frazzon APG (2011) Species distribution and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with Eimeria spp and fed with diets containing different supplements. *Braz J Microbiol* 42:480–488. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110002000012>

32. Nowakiewicz A, Ziółkowska G, Trościańczyk A, Zięba P, Gnat S (2017) Determination of resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* strains isolated from poultry and their genotypic characterization by ADSRRS-fingerprinting. *Poultry Science* 96:986–996. <https://doi.org/10.3382/ps/pew365>
33. Dolka B, Chrobak-Chmiel D, Czopowicz M, Szeleszczuk P (2017) Characterization of pathogenic *Enterococcus cecorum* from different poultry groups: Broiler chickens, layers, turkeys, and waterfowl. *PLoS One* 12:e0185199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185199>
34. Jung A, Rautenschlein S (2014) Comprehensive report of an *Enterococcus cecorum* infection in a broiler flock in Northern Germany. *BMC Vet Res* 10:311. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0311-7>
35. Dolka B, Czopowicz M, Dolka I, Szeleszczuk P (2022) Chicken embryo lethality assay for determining the lethal dose, tissue distribution and pathogenicity of clinical *Enterococcus cecorum* isolates from poultry. *Sci Rep* 12:10675. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14900-9>
36. Fertner ME, Olsen RH, Bisgaard M, Christensen H (2011) Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* among layer chickens during hatch. *Acta Vet Scand* 53:56. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-56>
37. Jung A, Metzner M, Ryll M (2017) Comparison of pathogenic and non-pathogenic *Enterococcus cecorum* strains from different animal species. *BMC Microbiol* 17:33. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0949-y>
38. McEwen SA, Collignon PJ (2018) Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum* 6:10.1128/microbiolspec.arba-0009–2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>
39. Danzeisen JL, Kim HB, Isaacson RE, Tu ZJ, Johnson TJ (2011) Modulations of the Chicken Cecal Microbiome and Metagenome in Response to Anticoccidial and Growth Promoter Treatment. *PLoS One* 6:e27949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027949>
40. Nilsson O, Vågsholm I, Bengtsson B (2013) Proof of concept for eradication of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from broiler farms. *Acta Vet Scand* 55:46. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-46>
41. Boulianne M, Arsenault J, Daignault D, Archambault M, Letellier A, Dutil L (2016) Drug use and antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolates from chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research* 80:49
42. Schreier J, Karasova D, Crhanova M, Rychlik I, Rautenschlein S, Jung A (2022) Influence of lincomycin-spectinomycin treatment on the outcome of *Enterococcus cecorum* infection and on the cecal microbiota in broilers. *Gut Pathog* 14:3. <https://doi.org/10.1186/s13099-021-00467-9>
43. Barreiro FR, Baraldi-Artoni SM, Pinto FR, Barbosa MMC, Barbosa JC, Amaral LA (2012) Influence of chlorine added to drinking water during the preslaughter feed

- withdrawal on microbiology and morphology of the broiler gastrointestinal tract. *Poultry Science* 91:2778–2784. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02455>
44. Castañeda CD, Dittoe DK, Wamsley KGS, McDaniel CD, Blanch A, Sandvang D, Kieess AS (2020) In ovo inoculation of an *Enterococcus faecium*–based product to enhance broiler hatchability, live performance, and intestinal morphology. *Poult Sci* 99:6163–6172. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.002>
 45. Lanza IP, Silva GR, Menezes LDM, Assis DCS, Figueiredo HCP, Lana AMQ, Lara LJC, Figueiredo TC, Souza MR, Cançado SV (2021) Research Note: Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from the eggshell of laying hens submitted to pharmacological treatment. *Poult Sci* 101:101606. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101606>
 46. Song D, Wang YW, Lu ZX, Wang WW, Miao HJ, Zhou H, Wang L, Li AK (2019) Effects of dietary supplementation of microencapsulated *Enterococcus faecalis* and the extract of *Camellia oleifera* seed on laying performance, egg quality, serum biochemical parameters, and cecal microflora diversity in laying hens. *Poultry Science* 98:2880–2887. <https://doi.org/10.3382/ps/pez033>
 47. Zhang L, Li J, Yun TT, Qi WT, Liang XX, Wang YW, Li AK (2015) Effects of pre-encapsulated and pro-encapsulated *Enterococcus faecalis* on growth performance, blood characteristics, and cecal microflora in broiler chickens. *Poultry Science* 94:2821–2830. <https://doi.org/10.3382/ps/pev262>
 48. Yoon S, Kim YB, Seo KW, Ha JS, Noh EB, Lee YJ (2020) Characteristics of linezolid-resistant *Enterococcus faecalis* isolates from broiler breeder farms. *Poultry Science* 99:6055–6061. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.087>
 49. Lees P, Concordet D, Aliabadi FS, Toutain P-L (2005) Drug Selection and Optimization of Dosage Schedules To Minimize Antimicrobial Resistance. In: *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 49–71
 50. Arias CA, Murray BE (2012) The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 10:266–278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2761>
 51. Marrett LE, Robb EJ, Frank RK (2000) Efficacy of neomycin sulfate water medication on the control of mortality associated with colibacillosis in growing turkeys. *Poultry Science* 79:12–17. <https://doi.org/10.1093/ps/79.1.12>
 52. 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>
 53. (2018) CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11. th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
 54. Laurentie J, Mourand G, Gripon P, Furlan S, Chauvin C, Jouy E, Serror P, Kempf I (2023) Determination of Epidemiological Cutoff Values for Antimicrobial Resistance of *Enterococcus cecorum*. *J Clin Microbiol* 61:e0144522. <https://doi.org/10.1128/jcm.01445-22>

55. MIC EUCAST. https://mic.eucast.org/search/?search%5Bmethod%5D=mic&search%5Bantibiotic%5D=-1&search%5Bspecies%5D=261&search%5Bdisk_content%5D=-1&search%5Blimit%5D=50. Accessed 29 Aug 2023
56. Bekele B, Ashenafi M (2010) Distribution of drug resistance among enterococci and Salmonella from poultry and cattle in Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* 42:857–864. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9499-0>
57. Semedo-Lemsaddek T, Bettencourt Cota J, Ribeiro T, Pimentel A, Tavares L, Bernardino F, Oliveira M (2021) Resistance and virulence distribution in enterococci isolated from broilers reared in two farming systems. *Ir Vet J* 74:22. <https://doi.org/10.1186/s13620-021-00201-6>
58. Ayeni FA, Odumosu BT, Oluseyi AE, Ruppitsch W (2016) Identification and prevalence of tetracycline resistance in enterococci isolated from poultry in Ilishan, Ogun State, Nigeria. *J Pharm Bioallied Sci* 8:69–73. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.171729>
59. Pesavento G, Calonico C, Ducci B, Magnanini A, Lo Nostro A (2014) Prevalence and antibiotic resistance of Enterococcus spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiol* 41:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.008>
60. Roy K, Islam MS, Paul A, Ievy S, Talukder M, Sobur MA, Ballah FM, Khan MSR, Rahman MT (2022) Molecular detection and antibiotyping of multi-drug resistant Enterococcus faecium from healthy broiler chickens in Bangladesh. *Vet Med Sci* 8:200–210. <https://doi.org/10.1002/vms3.669>
61. Schwaiger K, Schmied E-MV, Bauer J (2010) Comparative analysis on antibiotic resistance characteristics of Listeria spp. and Enterococcus spp. isolated from laying hens and eggs in conventional and organic keeping systems in Bavaria, Germany. *Zoonoses Public Health* 57:171–180. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01229.x>
62. Li J, Yang L, Huang X, Wen Y, Zhao Q, Huang X, Xia J, Huang Y, Cao S, Du S, Wu R, Zou L, Yan Q, Han X (2022) Molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors of Enterococcus faecalis from ducks at slaughterhouses. *Poultry Science* 101:101646. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101646>
63. Karunarathna R, Ahmed KA, Liu M, Yu C, Popowich S, Goonewardene K, Gunawardana T, Kurukulasuriya S, Gupta A, Ayalew LE, Willson P, Ngeleka M, Gomis S (2020) Non-viable chicken embryos: an overlooked niche harbouring a significant source of multidrug resistant bacteria in the poultry production. *Int J Vet Sci Med* 8:9–17. <https://doi.org/10.1080/23144599.2019.1698145>
64. Laurentie J, Mourand G, Gripon P, Furlan S, Chauvin C, Jouy E, Serror P, Kempf I (2023) Determination of Epidemiological Cutoff Values for Antimicrobial Resistance of Enterococcus cecorum. *J Clin Microbiol* 61:e0144522. <https://doi.org/10.1128/jcm.01445-22>
65. Pavia M, Nobile CGA, Salpietro L, Angelillo IF (2000) Vancomycin Resistance and Antibiotic Susceptibility of Enterococci in Raw Meat. *Journal of Food Protection* 63:912–915. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.7.912>

66. Noh EB, Kim YB, Seo KW, Son SH, Ha JS, Lee YJ (2020) Antimicrobial resistance monitoring of commensal *Enterococcus faecalis* in broiler breeders. *Poultry Science* 99:2675–2683. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.01.014>
67. Usui M, Ozawa S, Onozato H, Kuge R, Obata Y, Uemae T, Ngoc PT, Heriyanto A, Chalemchaikit T, Makita K, Muramatsu Y, Tamura Y (2014) Antimicrobial susceptibility of indicator bacteria isolated from chickens in Southeast Asian countries (Vietnam, Indonesia and Thailand). *J Vet Med Sci* 76:685–692. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0423>
68. Pantozzi FL, Ibar MP, Nievas VF, Vigo GB, Moredo FA, Giacoboni GI (2014) Wild-type minimal inhibitory concentration distributions in bacteria of animal origin in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 46:34–40. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70045-8](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70045-8)
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. Makarov DA, Ivanova OE, Pomazkova AV, Egoreva MA, Prasolova OV, Lenev SV, Gergel MA, Bukova NK, Karabanov SY (2022) Antimicrobial resistance of commensal *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from food-producing animals in Russia. *Vet World* 15:611–621. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.611-621>

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, dr. Kerek Ádám egyetemi tanársegédnek kutatásom ideje alatti kitartó támogatásáért és folyamatos iránymutatásáért. Köszönöm, hogy lehetővé tette számomra, a TDK munkám Gyógyszertani és Méregtani Tanszék Anti-mikrobiális rezisztencia kutatócsoportjának keretein belül való végzését.

Köszönöm Dr. Jerzsele Ákos tanszékvezető úrnak, amiért kutatásomat a Gyógyszertani és Méregtani Tanszéken befogadta és annak feltételeit biztosította.

Köszönetemet fejezem ki Pénzes Imréné Tünde, Balogh Katalin, Paliczné Kustán Bianka laboratóriumi asszisztenseknek, amiért a kutatás megvalósításának zökkenőmentességét biztosították. Hálával tartozom nem utolsó sorban dr. Kovács Lászlónak, akinek a segítségével a kutatás alapján szolgáló minták gyűjtése nem valósulhatott volna meg.

Hálás vagyok a Gondviselésnek, hogy végig kísért utamon.

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 Áron**, **negyedik** évfolyamos hallgató „*Hazai nagylétszámú házityúk állományokból izolált Enterococcus baktériumtörzsek ECOFF (Epidemiological cut-off value) értékének meghatározása*” 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 08. nap.

.....

Dr. Kerek Ádám
témavezető