

Bárdos Máté Sándor

Szennyvízben található antimikrobiális
rezisztenciagének bioinformatikai elemzése

2023

Szennyvízben található antimikrobiális rezisztenciagének bioinformatikai elemzése

jelige: „rezisztencia”

2023

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	3
2	SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
2.1	<i>Antibiotikum rezisztencia</i>	4
2.1.1	Az antibiotikumok felfedezése	4
2.1.2	Az antimikrobiális rezisztencia mechanizmusai és kialakulása	4
2.1.3	A szennyvíztisztítók szerepe az antimikrobiális rezisztenciában	8
2.1.3.1	A szennyvízzel történő öntözés okai és veszélyei	8
2.1.3.2	Patogén baktériumok antibiotikum rezisztenciája	10
2.1.3.3	Az antimikrobiális rezisztencia gének jelentősége a szennyvízben	13
2.1.3.4	Centralizált szennyvíztisztítók.....	14
2.1.3.5	Decentralizált szennyvíztisztítók.....	15
2.2	<i>Metagenomikai elemzés</i>	15
2.2.1	Taxonómiai profil	16
3	Célkitűzés és hipotézis	18
4	Anyag és módszer	19
4.1	<i>A vizsgált kisberendezés bemutatása</i>	19
4.2	<i>Mintagyűjtés és szekvenálás.....</i>	21
4.2.1	Mintagyűjtés	21
4.2.2	Bioinformatikai elemzés.....	21
4.2.3	Szekvenálási eredmények minőségi szűrése.....	22
4.2.4	Taxonómiai elemzés	22
4.2.5	Antimikrobiális rezisztencia gének elemzése	23
5	EREDMÉNYEK.....	24
5.1	<i>Szekvenálási eredmények.....</i>	24
5.1.1	Taxonómiai elemzés.....	24
5.1.1.1	Patogén baktériumok jelenléte	28
5.1.1.2	Alfa-diverzitás	32
5.1.2	Antimikrobiális rezisztenciagének.....	32
6	ÖSSZEGZÉS	35
7	IRODALOM JEGYZÉK.....	38
8	MELLÉKLETEK JEGYZÉKE	42

1 BEVEZETÉS

Korunk egyik legnagyobb globális problémája az egyre nagyobb méreteket öltő vízhiány. A víz, mint természeti erőforrás eloszlása nagyon egyenetlen, a felhasználhatósága korlátozott. Bár már régóta nyilvánvaló, hogy az erőforrások és alapanyagok nem állnak korlátlan mértékben rendelkezésre, a népességnövekedés közvetve és közvetlenül is a vízkészletek gyorsuló felhasználását idézi elő. A legnagyobb felhasználó a mezőgazdaság és az ipar. A mezőgazdasági termelés egyik alapvető feltétele a megfelelő vízellátottság, amit egyre inkább öntözéssel lehet csak elérni. Ezeken a kritikus területeken egyre sürgetőbbek a vízhasználat fenntarthatóságát célzó innovációk, melyekkel törekedni lehet a gazdaságos vízfelhasználásra, az elhasználódott víz megfelelő tisztítására és újra felhasználásra. Földünk szárazabb régióiban már régóta bevett eljárás, hogy a nehezen hozzáférhető, vagy korlátozott mennyiségben rendelkezésre álló édesvíz helyett, kezelt szennyvízzel történik az öntözés. Számos előnye van, hiszen a kezelt szennyvíz rengeteg tápanyagot tartalmaz, ami hasznos lehet a növényeknek számára, ami miatt lényegesen kevesebb trágya vagy műtrágya szükséges a termőföld tápanyagpótlásához. Előnyei ellenére nem hagyhatók figyelmen kívül a lehetséges kockázatok sem. Fertőző ágensek, fémek, biocidek, gyógyszermaradványok, és egyéb szennyező anyagok nagy mennyiségben előfordulhatnak a szennyvizekben, ezzel szelektív nyomást gyakorolva a mikrobákra, így segítve elő az antibiotikum rezisztencia kialakulását. A szennyvíztisztító telepek kiváló helyszínt biztosítanak a rezisztencia kialakulására, mivel a tisztítás legfontosabb lépéseit nagyszámú baktérium közösség végzi. Az öntözés során ez a folyamat a talajban is folytatódhat, ami problémát jelent, hiszen a globális éghajlatváltozás miatt a kezelt szennyvízzel való öntözés egyre nagyobb szerepet játszhat a vízhiány leküzdésében. A klinikai antibiotikum rezisztencia szintén hatalmas probléma, számtalan haláleset köthető antibiotikum rezisztens baktériumfertőzésekhez, ez a szám előreláthatólag emelkedni fog. Veszélyt hordoz magában, hogy a rezisztencia előbb alakul ki, mint ahogy új antibiotikumokat sikerülne felfedezni.

A szennyvíztisztító kisberendezések által tisztított víz egyik praktikus felhasználása szintén az öntözés. Egyre elterjedtebbek ezek a berendezések, és mivel relatív új technológiáról van szó ezért elengedhetetlen, hogy adatokkal rendelkezünk a decentralizált szennyvíztisztítás során jelen lévő, vagy megjelenő rezisztenciagénekről. Így közvetve arról is képet kapunk, hogy megfelelő alternatívát jelenthet-e a peremterületeken a kisberendezések használata.

2 SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

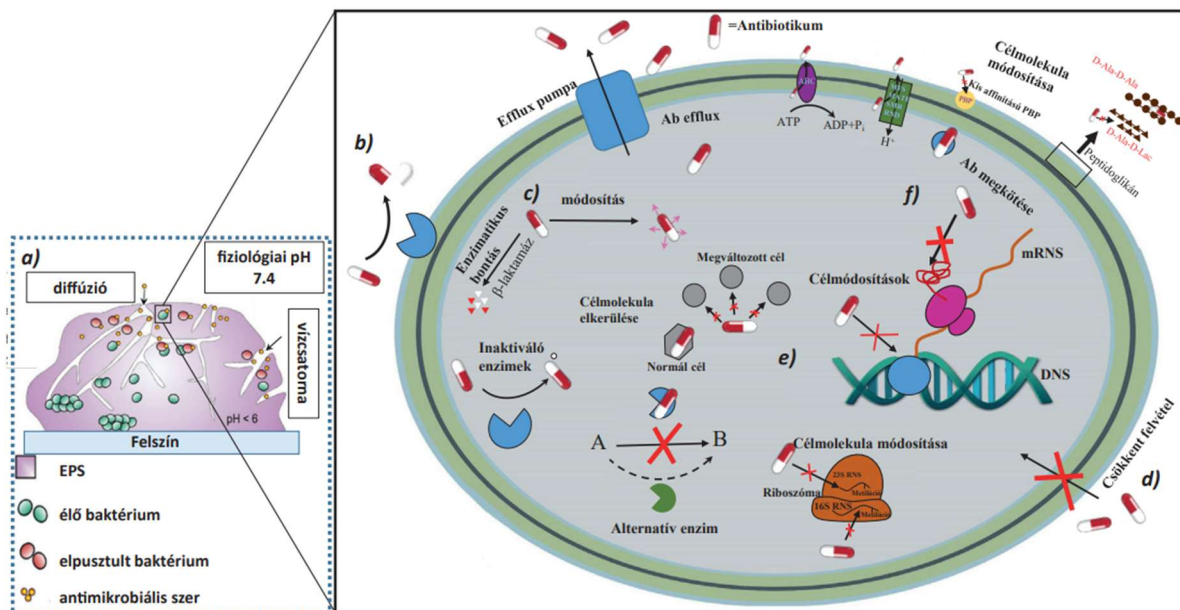
2.1 Antibiotikum rezisztencia

2.1.1 Az antibiotikumok felfedezése

1928-ban Alexander Fleming egy szerencsés véletlennek köszönhetően felfedezte az első antibiotikumot a penicillint. A penicillin a β -laktám antibiotikumok egy csoportja, amivel főleg Gram-pozitív baktériumok okozta fertőzéseket lehet kezelni. Előtte már számtalan esetben - az ókorban is - megfigyelték a penészgomba antibakteriális hatását, de Alexander Fleming volt, aki megfigyeléseire alapozva 12 éven keresztül igyekezett felkelteni a vegyészek érdeklődését a hatóanyag szintetizálása érdekében. Végül 1940-ben Howard Florey és Ernest Chain vezette oxfordi csapat publikált egy tanulmányt, amiben leírták a módszert, amivel elegendő mennyiségű penicillint szintetizáltak laboratóriumi vizsgálatokhoz. 1945-ben a protokolljuk alapján elkezdődött az első antibiotikum tömeggyártása. A penicillin felfedezése után számtalan életet mentett meg, forradalmasította a gyógyászatot, modern csodaszerként lehetett rá tekinteni. Gyors terjedése és túlzott használata miatt elkezdődött a verseny az új antibiotikumok felfedezése és az antibiotikum-rezisztens baktérium törzsek kialakulása között. A problémát az jelenti, hogy a rezisztencia gyorsabban alakul ki, és terjed el, mint ahogy az új hatóanyagokat kifejlesztik. A jelenlegi modellek alapján feltételezhetően, sürgős intézkedések nélkül, 2050-re 10 millió ember fog meghalni gyógyszerrezisztens fertőzések, vagy azok szövődményei miatt (Aminov 2010).

2.1.2 Az antimikrobiális rezisztencia mechanizmusai és kialakulása

Az antibiotikumok antibakteriális hatását általában öt mechanizmus egyikébe sorolhatjuk (1. ábra). Ezek a bakteriális sejtfalszintézis gátlása, a bakteriális fehérjeszintézis gátlása, a bakteriális nukleinsavszintézis gátlása, a bakteriális membránfunkciók gátlása és a metabolikus útvonalak gátlása (Kapoor, Saigal, és Elongavan 2017).



1. ábra Az antibiotikum rezisztencia mechanizmusai (Knisz Judit és mtsai. 2020)

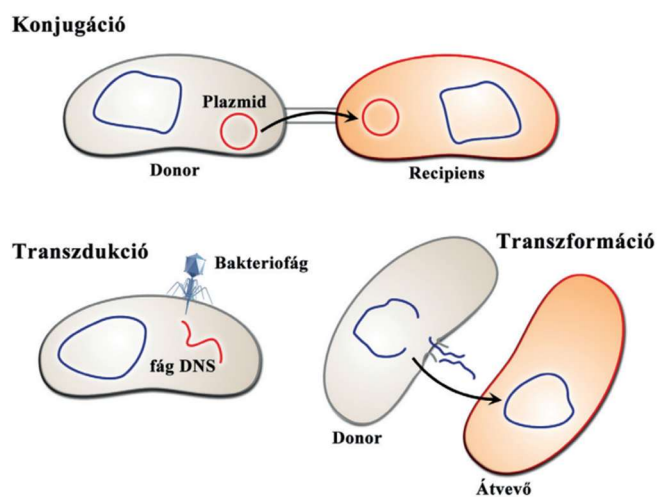
A rezisztencia alapvetően kétféle módon fordulhat elő. Egyrészt lehet a bakteriális genomban kódolt, természetes rezisztencia, ami független az antibiotikumok okozta szelekciótól. E rezisztencia nemzedékről-nemzedékre öröklődik, független az antropogén hatásoktól és a mikrobák a környezetükben lévő káros anyagok ellen fejlesztették ki. Ez egy ősi tulajdonság, ami megelőzte a klinikai antibiotikum használatot.

A természetes rezisztencia genetikailag kódolt, és főként a kromoszómák természetes rezisztenciagénjeivel kapcsolatos; nem vihető át más baktériumokba (Courvalin 2006). A legjobb példa erre az *Enterococcus*, *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* vancomycin rezisztenciája. A vankomicin gátolja a baktériumok növekedését a peptidoglikán szintézis gátlásával, amely a Gram-pozitív baktériumok egyik fő sejtfa-komponense (Jose és mtsai., 2015). A természetes rezisztencia kétféleképpen működhet: vagy a baktériumnak már vannak rezisztenciagénjei a genomjában, vagy hiányzik a megfelelő célpont az antibiotikumokhoz. A viszonylag konzervált rezisztencia gének átvihetők a következő generációba, így a természetes rezisztencia génjei előre megjósolhatók a baktériumok faja és homológiája alapján, nem pedig antibiotikum-érzékenységi vizsgálattal (Kapse és mtsai. 2019).

A szerzett rezisztencia viszont újonnan kialakult tulajdonság, átvihető egyik baktériumról a másikra, ami ennél fogva nagyobb és szélesebb körű kockázatot jelent, mint a természetes rezisztencia. Két fő mechanizmusát különböztetjük meg. Az egyik az, amikor génmutáció következik be, a másik pedig, amikor a baktériumok valamilyen módon a

környezetükből vagy más baktériumoktól veszik fel az exogén genetikai anyagokat (rezisztencia gének), ami végső soron a más, szorosan kapcsolódó antibiotikumokkal szembeni érzékenység csökkenéséhez vezet (Zheng és mtsai., 2017) (Singer és mtsai. 2016).

A rezisztenciát kialakító baktériumok nagyobb hatékonysággal védekeznek az antibiotikummal szemben - génmutációk alakulnak ki azzal a céllal, hogy valamilyen módon befolyásolják az antibiotikum hatását -, ezért a populációban átveszik a dominanciát. A rezisztenciát kódoló gén vagy gének megszerzését a baktériumok, mobil genetikai elemeken keresztül, a horizontális géntranszfernek nevezett folyamat segítségével veszik fel. Egyik mikrobából a másikba háromféleképpen (2.ábra) juthat a rezisztenciát hordozó génszakasz. Ezek a *transzformáció* (csupasz DNS szakasz felvétele a környezetből), *transzdukción* (bakteriofágok közvetítik), *konjugáción* (sejt-sejt kapcsolat, mobilis genetikai elemek átadása.)



2. ábra Horizontális géntranszfer mechanizmusok (Knisz Judit és mtsai. 2020)

A transzformáció lehetővé teszi a szabad plazmid DNS, valamint a szabad kromoszómális DNS felvételét, emiatt széles körben elfogadott, hogy a természetes transzformáció a mikrobák evolúciójának egyik fő mechanizmusa. Több mint 80 különböző fajt ismerünk melyek transzformációt használnak, ezek különböző törzsekből származnak, beleértve a fotolitotrófokat, kemolitotrófokat, heterotrófokat és metilotrófokat (Johnston és mtsai. 2014). A folyamat széles körben elterjedt a baktériumok fő törzsei között, ugyanakkor ugyanannak a nemzetségnek vagy akár fajnak a tagjai eltérhetnek e képességükben. Ez arra utal, hogy vagy van egy közös eredete a transzformációnak, amely vagy sokszor elveszett, vagy pedig többször egymástól függetlenül alakult ki (Johnsborg, Eldholm, és Håvarstein 2007).

A transzdukcióról csak a közelmúltban kezdtek el úgy vélekedni, hogy jelentős szerepet játszhat az antibiotikum-rezisztencia átvitelében potenciális kórokozók között. Az *Enterococcus gallinarum* és *Enterococcus faecalis*-el végzett *in vitro* kísérletek során bebizonyosodott a mechanizmus jelentősége (Mazaheri Nezhad Fard, Barton, és Heuzenroeder 2011). A bakteriofágokon keresztüli génátvitel korlátozott a transzformációhoz és konjugációhoz képest. A bakteriofágok olyan vírusok, amelyek megfertőzik a baktériumokat, és az általuk hordozott információ beépül a fertőzött baktérium genomjába, majd a saját maguk sokszorozása után kiszabadulnak (Fortier és Sekulovic 2013). A transzdukció akkor következik be, amikor egy bakteriofág, amely korábban egy másik baktériumsejtben replikálódott, a gazda genomjának (donorának) egy részét a fágfejbe csomagolja, és továbbítja e géneket egy másik (recipiens) baktériumsejtbe. Feltételezhető, hogy a transzdukció nem egy jól kidolgozott folyamat, hanem a bakteriofág DNS-nek a donor genomból történő kivágása során elkövetett hibák következménye. Tanulmányok kimutatták, hogy a természetben a fágreszecskekben bőségesen találhatók antibiotikum-rezisztencia gének (Muniesa, Colomer-Lluch, és Jofre 2013). Gyakorlatilag bármilyen DNS-szekvencia, beleértve az antibiotikum-rezisztenciát is, amely egy baktérium genomjában megtalálható, átvihető fág által (Schmieger és Schicklmaier 1999). Ez magában foglalhatja a kromoszómális szekvenciákat, és a mobil genetikai elemeket is, mint például a plazmidokat vagy a transzpozonokat (Mann és Slauch 1997). A viromok metagenomikus elemzése arra utal, hogy a bakteriofágokban különféle típusú és funkcionális bakteriális gének akár 50-60%-ban is megtalálhatók. Ennek eredményeként a bakteriofágok szerte a környezetben gének tárolójaként szolgálhatnak, és így antibiotikum rezisztenciagének közvetítésére is képesek lehetnek a baktériumok között (Dinsdale és mtsai. 2008).

A konjugáció, mint a legelterjedtebb horizontális géntranszfer olyan DNS-fragmensek átvitelét jelenti, amelyek nagyon kis mérettől, egészen nagy kromoszómáig terjedhetnek. A konjugáció eseményeinek általános sorrendje a sejt-sejt érintkezés, párosodási pár kialakulása, és végül a plazmid DNS átvitele. A konjugáció sejt-sejt érintkezést igényel, általában egy piluson vagy póruson keresztül, amely egy csatornát képez, amely lehetővé teszi a plazmidok átjutását egyik sejtől a másikba. Általában a plazmidok kovalensen zárt, körkörös DNS-molekulák, amelyek a gazda kromoszómájától függetlenül replikálódnak (Zechner és mtsai. 2000). A konjugáció szerepét a horizontális géntranszferben tovább bonyolítja, hogy a plazmidokon kívül más mobil genetikai elemek is átvihetők konjugációs gépezet segítségével. A konjugatív transzpozonok, kivágják magukat kovalensen zárt, körkörös DNS-ből, például

plazmidból vagy kromoszómából, és beépülnek ugyanabban a genomban egy másik helyre, vagy konjugációval átkerülnek, majd egy másik genomba integrálódnak. Ezek az elemek nem konjugatív plazmidokat vagy más DNS-szekvenciákat is mobilizálhatnak egy sejtben, és átvihetik azokat (Salyers és mtsai. 1995).

Továbbá meg kell említenünk a biofilmek képződését, mely legfontosabb eleme a baktériumok által kiválasztott extracelluláris kocsonyás mátrix, EPS. Az EPS egyfajta biológiai ragasztó, amely lehetővé teszi a bakteriális sejtek számára, hogy összekapcsolódjanak és más mikroorganizmusokkal - vírusokkal, egysejtűekkel és algákkal - közösséget alkossanak így pedig megakadályozza az antibiotikumok behatolását a biofilm mélyebb rétegeibe. Beépülhetnek továbbá szerves anyagok, és szervetlen vegyületek, amik nem csak a stabilitást növelik, de táplálékul is szolgálnak. A biofilm képzés fizikai védelemnek tekinthető, mivel az EPS diffúziós gátat képez, amely megnehezíti az antibiotikumok és fertőtlenítő szerek behatolását a mélyebb rétegekbe. Ebből adódik, hogy a minimálisan-gátló koncentráció (MIC) nagyságrendekkel magasabb, mint a szabadon úszó mikrobák esetében (Wales és Davies 2015). A biofilmekben lévő baktériumok között heterogenitás van, és ennek eredményeként néhány baktérium metabolikus inaktivitást mutathat. Ez a jelenség a biofilm belső rétegeiben jellemző, ahol a tápanyagok és az oxigén korlátozottan érhetőek el. Ezen belül a baktériumok lassabban vagy akár teljesen inaktívvá válhatnak az anyagcseréjük terén. Ez az egyik oka annak, hogy a biofilmekben lévő baktériumok ellenállóbbak az antibiotikumokkal szemben, és a metabolikus inaktivitás a biofilmek antibiotikum rezisztenciájának egyik összetevője lehet.

2.1.3 A szennyvíztisztítók szerepe az antimikrobiális rezisztenciában

2.1.3.1 A szennyvízzel történő öntözés okai és veszélyei

A földi vízkészletek töredéke alkalmas emberi felhasználásra. A teljes mennyiség kevesebb mint 3%-a édesvíz, és csupán csak 1% az, ami gazdaságosan hozzáférhetőnek tekinthető (Mancosu és mtsai. 2015). A víz nélkülözhetetlen erőforrás, és nem tud lépést tartani az exponenciálisan növekvő népesség igényeivel. 1950-es évek óta a felhasználás megháromszorozódott, miközben a készletek jelentősen csökkentek. Az egész világon megfigyelhető jelenség a talajvízszint csökkenése és fokozódó elszennyeződése. A jelenlegi tendencia globális vízhiánnyal fenyeget és következésképpen élelmiszer válsággal is, mivel a teljes fogyasztás 80-90%-át a mezőgazdaság használja fel. A mezőgazdasági rendszerek a

mostani formájukban nem képesek a növekvő népesség élelmezésére, ezzel rákényszerítve a gazdaság terjedését a marginális és leromlott területek felé, ami a költségek jelentős emelkedésével jár. A világ száraz és félszáraz régióban a helyzet már napjainkban is kritikus, az élelmiszer termelés legfőbb akadálya, hogy nincs az öntözéshez elegendő mennyiségű víz (Hussain és mtsai. 2019).

Általánosságban elmondható, hogy az emberi tevékenységek és felhasználás módja miatt a szennyezett víz megtisztítása, a korlátozott hozzáférés és a környezetvédelem miatt is rendkívül fontos. A fenntartható felhasználásnak az egyik legjelentősebb módja, a kezelt szennyvíz újra felhasználása, a kezelt szennyvízzel való öntözés. Az ötlet nem újkeletű a világon, hiszen ahol nem áll rendelkezésre elegendő édesvíz - például Afrikában -, bevett eljárásnak számít. Ezzel az öntözési formával több probléma is megoldható egyszerre. Első sorban csökkenti a vízkivételt a természetes forrásokból, ezzel csökkentve a vízkészletekre nehezedő nyomást. A befogadókba is kevesebb szennyvíz kerül, ezért a vízi ökoszisztémákat kisebb mértékben fenyegeti a szennyezés vagy a szennyvíz tápanyagtartalma miatt bekövetkező eutrofizáció. Praktikus a mezőgazdasági felhasználása, a magas táp és szervesanyag tartalom miatt kevesebb műtrágyára van szükség, emiatt gazdaságilag is kifizetődő. A növények növekedéséhez elengedhetetlen nitrogént, foszfort, vasat, mangánt, káliumot, kalciumot, magnéziumot is tartalmaz más elemekkel együtt. A kezelt szennyvíz minden pozitív tulajdonsága ellenére nem elhanyagolhatók a használatából adódó kockázatok sem. Megfigyelhető a talaj pH-érték csökkenése és a sók felhalmozódása. A szennyvíztisztítás módszerétől függően tartalmaz mikroorganizmusokat, pl. protozoákat, baktériumokat és vírusokat is. Fokozott figyelmet igényel a gyógyszermaradványok jelenléte is. Az emberi szervezet a bevitt gyógyszereket csak részben metabolizálja, nagy részük változatlan formában ürül ki, ezzel okozva terhelést. Ezek a kockázatok csökkenthetők különböző fertőtlenítő eljárásokkal, mint klórozás, UV-sugárzás vagy ózonnal történő kezelés, melyek mind a fertőző ágensek számát le tudják redukálni, illetve egyes gyógyszermaradványok ellen is sikeresnek bizonyultak (Hey és mtsai. 2012), (Martínez, Pérez-Parra, és Suay 2011). Aggodalomra ad okot továbbá a nehézfémek felhalmozódása is. Több tanulmány (Gupta és mtsai. 2010), (Wang és mtsai. 2003) is foglalkozott már a kadmium, nikkel, króm, ólom és más nehézfémek akkumulációjával azokban a növényekben, amiket kezelt szennyvízzel öntöztek. Szintén klinikai kockázatot jelent a perzisztens szerves szennyeződések széles körű jelenléte, mint a policiklikus aromás szénhidrogének, poliklórozott bifenilek, és szerves klór tartalmú peszticidek. (Sun és mtsai. 2009), (Y. Chen, Wang, és Wang 2005). Más tanulmányok arra az

eredményre jutottak, hogy a PPCP-k (*Pharmaceutical and personal care products* [PPCPs]) csoportja - ami több ezer vegyianyagot foglal magában, a gyógyszermaradványoktól a testápolási termékeken keresztül az illatszerekig - endokrin rendszer károsító hatásúak lehetnek és szintén felhalmozódhatnak a talajban, ami a növényeken keresztül a táplálékláncon át visszajuthat az emberig (Xu és mtsai. 2009), (F. Chen és mtsai. 2011).

A szennyező anyagok előfordulása nagyon változatos, például más-más szennyezőket tartalmaznak az ipari szennyvizek és mást a háztartási- vagy klinikai szennyvizek. Bár több tisztítási technológia van használatban, általában öt fő lépésből állnak:

- az előkezelés (fizikai és mechanikai);
- az elsődleges kezelés (fizikai-kémiai és vegyi);
- a másodlagos kezelés vagy tisztítás (kémiai és biológiai);
- a harmadlagos vagy utókezelés (fizikai és vegyi); végül
- a képződött iszap kezelése.

A hagyományos szennyvízkezelés fizikai, kémiai és biológiai folyamatok kombinációjából áll, melyek célja a szilárd anyagok, köztük a kolloidok, szerves anyagok, tápanyagok, oldható szennyeződések (fémek, szerves anyagok stb.) eltávolítása a szennyezett vízből, hogy a befogadóba az előírt minőségi előírásoknak megfelelően kerüljön vissza a tisztított szennyvíz (Crini és Lichtfouse 2019).

2.1.3.2 Patogén baktériumok antibiotikum rezisztenciája

Az antibiotikum rezisztencia növekedésére való tekintettel a WHO közzétette az ESKAPE betűszóval jelölt kórokozók listáját (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* és az *Enterobacter* fajok például az *Escherichia coli*). Ezek a fajok elsőbbségi státuszt élveznek, mivel nagy veszélyt jelentenek az emberre. A gyógyszerrezisztencia visszaszorításának kulcsfontosságú lépése ezen baktériumok rezisztencia mechanizmusainak megértése (Mancuso és mtsai. 2021).

Az Országos Epidemiológiai Központ (OEK) Bakteriológiai osztálya által vezetett mikrobiológiai surveillance rendszer 32 hazai laboratóriumból gyűjt adatokat (Nemzeti Bakteriológiai Surveillance Adatfeldolgozó Csoport. A magyarországi mikrobiológiai surveillance antibiotikum rezisztencia eredményei. Országos Epidemiológiai Központ, 2017;

www.oek.hu). Mindezek alapján is további megerősítést nyert, hogy a lentebb felsorolt patogének és ezzel egyidőben a mintákban azonos időben megtalálható antibiotikum rezisztencia gének monitorozásával hatványozottan érdemes foglalkozni.

Az enterococcusok Gram-pozitív coccusok, fakultatív anaerob gasztrointesztinális kommenzálisok, amelyek számos stresszes és ellenséges környezetben képesek fennmaradni. Bár több, mint 50 különböző *Enterococcus sp.* fajt írtak le, az emberben csak két faj, az *Enterococcus faecalis* és az *E. faecium* okozza a legtöbb enterococcus fertőzést (García-Solache és Rice 2019). Az *E. faecalis* a legpatogénebb faj, bár az *E. faecium* ellenállóbb számos antimikrobiális szerrel szemben, és különösen immunhiányos gazdaszervezetekben ez utóbbi súlyos morbiditást és mortalitást okozhat. Általánosságban elmondható, hogy ezek a mikroorganizmusok jellemzően ártalmatlanok egészséges egyénekben, míg komoly problémát jelent immunhiányos betegeknél és kórházi fertőzések során (például katéterrel összefüggő húgyúti fertőzések, endocarditis és bakteremia). Az enterococcusok egyre ellenállóbbá válnak az antimikrobiális szerekkel szemben (Jabbari Shiadeh és mtsai. 2019). Az OEK a cerebrospinalis folyadékból, hemokultúrából izolált multirezisztens kórokozók közé sorolja a vancomycin rezisztens *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* (VRE) fajt, továbbá különleges rezisztenciával rendelkező baktériumok (bármilyen mintatípusból) csoportjához a linezolid, daptomycin, vagy tigecyclin antibiotikumok valamelyikére rezisztens *E. faecalis*, *E. faecium*-ot, mely komoly aggodalomra ad okot. Az OEK által, a monitor rendszerben 2017. évben jelentett *Enterococcus spp.* izolátumok antibiotikum érzékenységeinek eredménye az 1. Mellékletben található.

A Gram-pozitív meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA), amely megtalálható az emberi bőrön, és fertőzéseket okozhat a test különböző részein. Az MRSA rezisztenciát fejlesztett ki több antibiotikumokkal szemben, így az MRSA által okozott fertőzések kezelése nehezebbé válik. Fontos megjegyezni, hogy míg az MRSA jelentős figyelmet kap rezisztenciája miatt, minden *Staphylococcus sp.* fertőzés, még azok is, amelyek nem antibiotikum-rezisztensek, jelentős egészségügyi kockázatot jelenthetnek, ha nem kezelik megfelelően („Meet the 6 Pathogens directly attributable to 73% of 1.27 million deaths | AMR” é. n.). Az OEK a különleges rezisztenciával rendelkező baktériumok (bármilyen mintatípusból) közé sorolja a glikopeptidekkel szemben rezisztens *S. aureus* (GRSA, VRSA) (VISA) törzsét, linezolid, quinupristin–dalfopristin, daptomycin vagy tigecyclin nem-érzékeny (rezisztens vagy mérsékelten érzékeny) *S. aureus* valamint a területen szerzett MRSA (CA-MRSA), illetve zoonotikus MRSA (LA-MRSA) gyanú esetében (MRSA) törzsét. A monitor rendszerben 2017.

évben jelentett *Staphylococcus aureus* és MRSA izolátum antibiotikum érzékenységének eredménye az 2. és 3. Mellékletben található.

A *Klebsiella pneumoniae*, közismert nevén Klebsiella, egy Gram-negatív baktérium, amely gyakori az egészségügyi intézményekben (Santajit és Indrawattana 2016). Emberben különböző testtájakon okoz fertőzést, például az orron, a szemben, a szájon, a tüdőben, a húgyutakon vagy a véráramon keresztül jut be a szervezetbe. A *K. pneumoniae* jelentős kockázatot jelent, különösen a károsodott immunrendszerű egyének esetében, például idősebb felnőtteknél vagy a HIV/AIDS-ben szenvedőknél. Mivel levegőben nem terjed, ezért csak személyes kontakt útján fertőz (Eghbalpoor és mtsai. 2019). Az OEK a cerebrospinalis folyadékból, hemokultúrából izolált törzsek közé sorolja a szerzett 3. generációs cefalosporin rezisztenciával rendelkező *Enterobacteriaceae* izolátumok közül a *K. pneumoniae* ESBL-termelő és AmpC-termelő (MKLE) törzseit, valamint a különleges rezisztenciával rendelkező baktériumok (bármilyen mintatípusból) közé az AmpC-termelő *K. pneumoniae* (ESBL-termelés mellett is) (MKLE), karbapenemáz-termelő *K. pneumoniae* (CRKL), karbapenemázt nem termelő, de karbapenemekkel (imipenem és/vagy meropenem) szemben nem-érzékeny *K. pneumoniae* (CRKL). A monitor rendszerben 2017. évben jelentett *K. pneumoniae* izolátum antibiotikum érzékenységének eredménye a 4. Mellékletben található.

Az *Acinetobacter baumannii* Gram-negatív baktérium, amelyet gyakran emlegetnek az „iraki baktérium” néven, mivel az iraki háború alatt a katonák sebfertőzésével járt együtt, világszerte aggodalomra okot adó bakteriális kórokozó. A baktérium súlyos betegségeket okoz, beleértve a tüdőgyulladást és a véráram-fertőzéseket, különösen az egészségügyi intézményekben. Számos antibiotikummal szembeni nagyfokú rezisztenciája arra készítette az Egészségügyi Világszervezetet, hogy az új antibiotikumok kutatásának és fejlesztésének kritikus prioritásai közé sorolja. Az *A. baumannii* fertőzés kockázatának csökkentése érdekében alapvető fontosságú a jó higiénia betartása: rendszeres kézmosás szappannal és vízzel – különösen, ha olyan felületekkel vagy tárgyakkal érintkezik, amelyek potenciálisan fertőzöttek lehetnek. Ezen túlmenően, kerülni kell a szoros érintkezést betegekkal, hogy csökkenjen a fertőző betegségeknek való kitettség („Meet the 6 Pathogens directly attributable to 73% of 1.27 million deaths | AMR”). Az OEK a cerebrospinalis folyadékból, hemokultúrából izolált törzsek közé sorolja a karbapenemekkel (imipenem, meropenem) szemben rezisztens *A. baumannii* (MACI) törzset, valamint a különleges rezisztenciával rendelkező baktériumok (bármilyen mintatípusból) közé a colistin rezisztens *A. baumannii* törzset. A monitor rendszerben 2017. évben jelentett *A. baumannii* izolátum antibiotikum érzékenységének eredménye a 5. Mellékletben található.

A *Pseudomonas aeruginosa* egy Gram-negatív baktérium, amely súlyos betegségeket, például tüdőgyulladást, agyhártyagyulladást és véráramfertőzést okozhat. Különösen veszélyes a legyengült immunrendszerű emberekre, például a műtét után lábadozókra. A baktériumok gyakran megtalálhatók a kórházakban és más egészségügyi intézményekben, és szennyezett felületeken és berendezéseken keresztül, vagy fertőzött személyekkel való érintkezés útján terjedhetnek („Meet the 6 Pathogens directly attributable to 73% of 1.27 million deaths | AMR” é. n.). Az OEK a cerebrospinalis folyadékból, hemokultúrából izolált törzsek közé sorolja a multirezisztens *Pseudomonas aeruginosa* törzsét [a felsorolt antipseudomonas hatású szerek közül kettőre vagy kevesebbre érzékeny: piperacillin/tazobactam, ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem, ciprofloxacín, gentamicin, tobramycin, amikacin) (MPAE)], valamint a különleges rezisztenciával rendelkező baktériumok (bármilyen mintatípusból) közé ceftazidim, cefepim nem-érzékeny és karbapenem rezisztens, karbapenemáz-termelő (pl. Hodge-teszt pozitív) és colistin rezisztens *Pseudomonas aeruginosa* törzsét. A monitor rendszerben 2017. évben jelentett *Pseudomonas aeruginosa* izolátum antibiotikum érzékenységeinek eredménye a 6. Mellékletben található.

Az *Escherichia coli* Gram-negatív baktérium, amelyről ismert, hogy számos egészségügyi problémát okoz, a hasmenéstől és a húgyúti fertőzésektől a súlyosabb állapotokig, például agyhártyagyulladásig és szepsziséig. A baktérium általában emberi vagy állati hulladékkal szennyezett élelmiszerben vagy vízben van jelen. („Meet the 6 Pathogens directly attributable to 73% of 1.27 million deaths | AMR”). Az OEK a cerebrospinalis folyadékból, hemokultúrából izolált törzsek közé sorolja a szerzett 3. generációs cefalosporin rezisztenciával rendelkező *Enterobacteriaceae* izolátumok közül ESBL-termelő *Escherichia coli* (MECO). A monitor rendszerben 2017. évben jelentett *Escherichia coli* izolátum antibiotikum érzékenységeinek eredménye a 7. Mellékletben található.

2.1.3.3 Az antimikrobiális rezisztencia gének jelentősége a szennyvízben

A szennyvízben található szennyezőanyagok szelekciós nyomása, a biológiai tisztítási lépések miatt felszaporodó baktériumközösség, és a keletkezett iszapban található baktériumközösségek miatt a szennyvíztelepek kiváló környezetet biztosítanak az antibiotikum rezisztenciagének kialakulásának, illetve a kölcsönhatások miatt azok átadásának is. A

befogadó szintjéhez képest magasabb a rezisztencia gének száma, ezért okkal feltételezhető, hogy a szennyvíztisztító telepek potenciális gócpontjai lehetnek az antibiotikum rezisztencia terjedésének (Auerbach, Seyfried, és McMahon 2007).

A kórházi osztályokról, különösen az intenzív osztályokról származó kórokozók bekerülnek a városi szennyvíztisztító telepekbe, ahol tovább terjedhetnek és elterjedhetnek a környezetben. A kórházi szennyvízben az antibiotikum-rezisztenciával rendelkező baktériumok mennyisége jelentősen magasabb, mint a nem kórházi szennyvízben. Továbbá, a kórházak gyakran a karbapenem-rezisztens kórokozók fő forrásai a környezetben.

2.1.3.4 Centralizált szennyvíztisztítók

Egy tanulmányban tíz különböző európai ország (Franciaország, Olaszország, Norvégia, Portugália, Németország, Hollandia, Ciprus, Törökország, Ausztria és az Egyesült Királyság) tizenhat szennyvíztelepén tíz különböző antibiotikum-rezisztencia determinánst vizsgáltak melyek releváns indikátorai a környezeti rezisztenciának. A cél az volt, hogy Európa szerte, átfogó képet kapjanak a szennyvíztisztító telepek és a környezetre gyakorolt hatásairól. Olyan antibiotikumokkal (például: béta-laktámok, szulfonamidok, tetraciklinek) szembeni ellenállást biztosító géneket választottak, amik széles körben előfordulnak a városi szennyvízben és a vízi környezetben is. Tizenegy hónap különbséggel két mintavételezés történt, ahol az első mintavételezéskor a telepekről három egymást követő napon vettek mintát, a második mintavételezés során a telepekről és a befogadókából a kibocsátási pont előtt és után vettek mintát, a víztest mindkét oldaláról. Összesen kilenc rezisztencia gént - blaTEM, blaOXS-48, blaCTX-m-15, blaCTX-m-32, blaKPC-3, sul1, tetM, mcr-1, 16S rRNS-t kódoló gének, és az intl1 (első osztályú integron integráz gén) - gén mennyiségi meghatározását végezték el qPCR technika segítségével. A szennyvíztisztító telepek a befogadó víztestre gyakorolt hatását a kibocsátási pont alatt mért ARG koncentrációval lehet jellemezni, de figyelembe kell venni a minta minőségét, mivel a teljes elkeveredés nem ment végbe, alsóbb szakasról pedig nem lehetett mintát venni mert a vizsgált keresztmetszet ABR szintjét befolyásolhatja egyéb kibocsátó, illetve ülepedés, vagy a természetes növényzet. Az eredményeket vizsgálták az adott telepre jutó kórházi ágyak száma, biológiai kezelés, szennyvíz KOI értéke, földrajzi elhelyezkedés, üzemméret alapján. Az antibiotikum rezisztencia gének abszolút mennyiségét szignifikánsan csak a telepen használt biológiai lépések száma befolyásolta. Mind az intl1, a

blaTEM, a 16S, blaOXA-58, tetM és a sul1 gén szignifikánsan csökkent a kezelés alatt azokon a telepeken, ahol első lépésként nagy terhelésű szén eltávolítást kombináltak egy későbbi alacsony terhelésű második biológiai lépéssel, nitrogén eltávolítással. Sem a földrajzi elhelyezkedés sem a korhízi ágyak száma vagy a KOI érték nem okozott kimutatható eltérést.

Összeségében elmondható, hogy a szennyvíztisztítók ARG terhelést okoznak. A leggyakrabban a sul1 és az intl1 volt, ami antropogén hatást jelez, bár elmondható, hogy városi környezetben annyira elterjedt, hogy nagy számban jelen van a felszíni vizekben is. A ciprusi telepen általánosságban kevesebb ABR gén volt jelen, feltételezhetően az alkalmazott membrán technológiának köszönhetően (Cacace és mtsai. 2019).

2.1.3.5 Decentralizált szennyvíztisztítók

A szennyvíztisztító kisberendezések egyre elterjedtebbek, mivel telepítésük egyszerűbb és olcsóbb azokon a területeken, ahol a csatornázottság hiánya, illetve földrajzi adottságok miatt a hálózatra kötés nem lehetséges vagy nem gazdaságos. Mivel a technológia viszonylag új, előfordulhatnak kezelési, karbantartási és tervezési hibák is. Egy Belgiumban elvégzett felmérésben, 23 vizsgált kisberendezésből csak 48% felelt meg a helyi követelményeknek. A tulajdonosok nagy többsége sem rutinszerű ellenőrzést, sem pedig karbantartást nem végez a berendezésén. Bizonyítást nyert továbbá, hogy a jobban elterjedt eleven iszapos rendszerek kevésbé teljesítenek jól, mint a biofilmes alternatívák. Tervezési hibák jellemzően kimosást okoztak. Feltételezhető, hogy a kisberendezések fejlődésével ezek a problémák mérséklődnek és a szigorodó szabályozás ellenére megfelelő alternatívát jelentenek a rosszul csatornázott perem területeken (Moelants és mtsai. 2008).

2.2 Metagenomikai elemzés

A szennyvíz metagenomikai elemzése egy olyan komplex és informatív megközelítés, amely segít feltárni az egyes minták mikrobiális összetételét és genetikai potenciálját. A metagenomikai elemzés során a szennyvízből származó összes mikroorganizmus DNS-ét izolálják és szekvenálják, majd az így kapott adatokat elemzik és így számos információ nyerhető, mint például a mikrobiális közösségek feltárása, a taxonómiai profil meghatározása, valamint az antibiotikum-rezisztencia gének azonosítása.

2.2.1 Taxonómiai profil

A metagenomika olyan technológiai megközelítést jelent, amely lehetővé teszi a mikrobiális közösségek összetételének és funkciójának tanulmányozását az eredeti élőhelyükön anélkül, hogy a mikroorganizmusokat külön-külön kellene izolálni és tenyészteni és így átfogó betekintést nyújthat ezen közösségeken belüli kölcsönhatásokba.

A hagyományos mikrobiológiai módszerek csak azokat a mikroorganizmusokat azonosítják, amelyek tenyésztésre alkalmasak a laboratóriumi körülmények között, így nem feltétlenül mutatják be a teljes mikrobiális közösséget. A metagenomikai vizsgálatok az összes jelenlévő mikroorganizmust azonosítani képesek, beleértve a nem tenyészthetőket is vagy a ritkább és kevésbé ismert fajokat is. További előnye a módszernek, hogy a mikrobiológiai tenyésztések hosszú időt vehetnek igénybe, mivel a mikroorganizmusoknak fel kell nőniük a laboratóriumi körülmények között. A metagenomikai vizsgálatok azonban gyorsabban eredményezhetik az információkat, mivel közvetlenül az örökítő anyagot, például a DNS-t vizsgálják és nem igényelnek előzetes ismereteket a mikroorganizmusokról, mivel nem szükségesek tenyésztéshez vagy kiválasztáshoz. Az metagenomikai adatok taxonómiai elemzésének azonban vannak hátrányai is. Ezek az elemzések általában a mikroorganizmusok azonosítására és taxonómiai besorolására összpontosítanak, de kevesebb információt nyújtanak a mikrobiális közösségek funkcionális aktivitásáról. Az elemzések bizonyos lépései számítógépes algoritmusokra épülnek melyek az örökítőanyag szekvenciáinak azonosítását teszik lehetővé, azonban előfordulhatnak hibák vagy pontatlanságok az azonosításban – pl. a profilok a hasonlóságokra épülnek, és nem minden esetben képesek pontosan megkülönböztetni az egyes mikroorganizmusokat -, továbbá a taxonómiai profilok korlátozottan alkalmasak egyes kórokozók, potenciálisan veszélyes, vagy hasonló funkcionális géneket hordozó mikroorganizmusok azonosítására, mivel ezek a mikroorganizmusok gyakran kis mennyiségben fordulnak elő egy mintában és könnyen „elnyomhatja” őket a közösség többi tagja. A legfontosabb azonban, hogy mindezek figyelembevételével válasszuk meg az alkalmazandó bioinformatikai programokat és azok beállításait, hogy a kapott eredmények a lehető legbiztosabb információkat szolgáltatassák.

2.2.2 Antimikrobiális rezisztencia gének meghatározása

A metagenomikai adatok nemcsak a mikroorganizmusok azonosítására szolgálnak, hanem lehetővé teszik a közösségek funkcionális potenciáljának feltárását is. Ez lehetővé teszi a mikrobiális közösségek szerepének és ökológiai funkciójának jobb megértését.

Az antibiotikum rezisztens baktériumok és gének terjedése az emberi egészségre veszélyt jelent, mivel az antibiotikumok hatástalanok lehetnek a rezisztens mikrobákkal szemben. Amennyiben ilyen mikrobák jutnak a szennyvízrendszerbe, és nem megfelelően kezelik őket, akkor azok szennyezhetik a vízbázist vagy a talajt és így az emberek is ki vannak téve az antibiotikum rezisztencia terjedés veszélyének. A vízbázis és a talajt szennyezése az ökoszisztémákban is problémákat okozhat, mivel az antibiotikum rezisztens mikrobák túlélési előnyhöz juthatnak a természetben, ami befolyásolhatja a mikrobiális közösségek ökológiai egyensúlyát. A szennyvízben végzett antibiotikum rezisztencia gének kimutatása segíthet az antibiotikum rezisztencia terjedésének figyelemmel kísérésében. Ez lehetővé teszi az egészségügyi intézmények és a környezetvédelmi hatóságok számára, hogy jobban megértsék az antibiotikum rezisztencia terjedését, és ezáltal hatékonyabb intézkedéseket hozzanak a fenyegetés kezelésére. Fontos szempont, hogy az antimikrobiális rezisztencia gének hasznos információkat szolgáltatnak a szennyvíztisztítási folyamatok hatékonyságáról. Ezek a gének megmutathatják, hogy mennyire sikerül eltávolítani az antibiotikumokat és az antibiotikum rezisztens mikrobákat a szennyvízből, és segíthetnek a szennyvízkezelési rendszerek fejlesztésében.

2.2.2.1 CARD adatbázis

A klinikai és környezeti forrásokból származó gének elemzése egyre nagyobb betekintést nyújtanak ezekbe antimikrobiális rezisztencia géneket hordozó rezervoárokba, és előrejelző képességet kínálnak az antibiotikum-rezisztencia kialakulásához és epidemiológiájához (McArthur és mtsai. 2013).

Az antibiotikumok kutatása, illetve az új antibiotikum rezisztencia elemek nyomon követése 2013-ig nem használta ki kellőképpen a genombányászatban rejlő lehetőségeket. Nem történt olyan bioinformatikai eszközfejlesztés, ami segíti a kórokozók genom adatainak kinyerését, és kevés eszköz állt rendelkezésre az antibiotikum rezisztencia genetikájának tanulmányozására (McArthur és mtsai. 2013). ezért létrehozták a CARD-ot. A CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) integrálja a különböző molekuláris és szekvencia adatokat, egyedülálló rendezőelvet teremt meg az Antibiotic Resistance Ontology (ARO) formájában, és gyorsan azonosítja a feltételezett antibiotikum rezisztencia géneket új,

még nem leírt genomszekvenciákban is. A rezisztencia gének kereséséhez használhatjuk a Resistance Gene Identifier (RGI) alkalmazást, mely homológián és SNP-modelleken alapuló fehérje- vagy nukleotid adatokból megjósolható az antibiotikum-rezisztómák referenciaadatait használja. Az RGI-elemzések elvégezhetők a CARD webhelyen, az RGI-portálon, és más platformokon is (Linux, Mac), ami megkönnyíti az adatbázis elérését. A CARD referencia szekvenciák és a szignifikancia határértékei folyamatos ellenőrzés alatt állnak – ahogy a CARD kurálás fejlődik, az RGI eredményei is fejlődnek -.

Az RGI a genomot vagy a proteomszekvenciákat Perfect, Strict és Loose megközelítéssel hasonlítja össze az általunk beküldött szekvenciákkal. A Perfect algoritmust leggyakrabban klinikai diagnosztikára alkalmazzák, mivel a CARD-ban kurált referenciaszekvenciákkal tökéletes egyezéseket észlel. Ezzel szemben a Strict algoritmus az ismert AMR-gének korábban ismeretlen változatait észleli, beleértve a kulcsmutációk másodlagos szűrését is, a CARD által kiválasztott hasonlósági határértékekkel rendelkező észlelési modellek segítségével annak megállapítására, hogy az észlelt változat valószínűleg egy funkcionális AMR-gén. A Loose algoritmus az észlelési modell határértékein kívül működik, hogy új, kialakulóban lévő fenyegetéseket és az AMR-gének távolabbi homológjait észlelje, de katalogizálja a homológ szekvenciákat és a hamis részleges egyezéseket is, amelyeknek esetleg nincs szerepük az AMR-ben. A fenotípusos szűréssel kombinálva a Loose algoritmus nagy segítség lehet a kutatók számára, az új AMR-gének keresésében („GitHub - arpcard/rgi: Resistance Gene Identifier (RGI). Software to predict resistomes from protein or nucleotide data, including metagenomics data, based on homology and SNP models.”).

3 Célkitűzés és hipotézis

Az antibiotikumok jelenléte, az antibiotikum rezisztencia gének és a rezisztens baktériumok nem megfelelő eltávolítása a szennyvízkezelő rendszerekből, legyen az centralizált- vagy decentralizált szennyvíztisztító, potenciális veszélyt jelent a környezetre és az emberi egészségre nézve. Ezért az ARB-k, ARG-k és vírusok hatékonyabb eltávolítását célzó új fertőtlenítési technikák és megoldások kulcsfontosságúak a kórházi szennyvíz-mátrixokban és további kutatások és figyelem szükséges az ezekre a problémákra való válasz kidolgozásához.

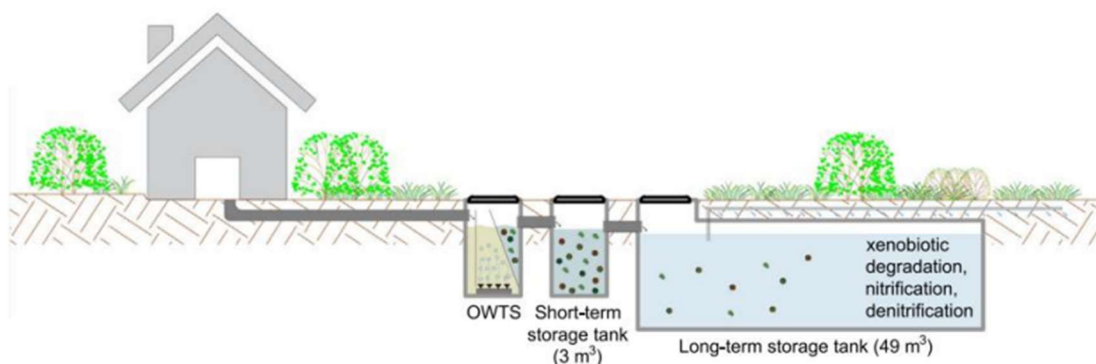
Jelen dolgozatban arra kerestem a választ, hogy a szennyvíztisztító telepekhez hasonlóan az egyedi kisberendezésekben is találhatóak-e patogén baktériumok, illetve antibiotikum rezisztencia gének és ezek jelenléte összefüggésbe hozható-e egymással?

A hipotéziseim:

- A szennyvíztisztító kisberendezésekben hasonlóan a centralizált szennyvíztisztítókhoz, detektálhatók patogén baktériumok.
- A kevesebb szennyező anyag és a kevésbé heterogén bakteriális közösség miatt a szennyvíztisztító kisberendezésekben nem, vagy alig lesz detektálható antibiotikum-rezisztencia gén.

4 Anyag és módszer

4.1 A vizsgált kisberendezés bemutatása

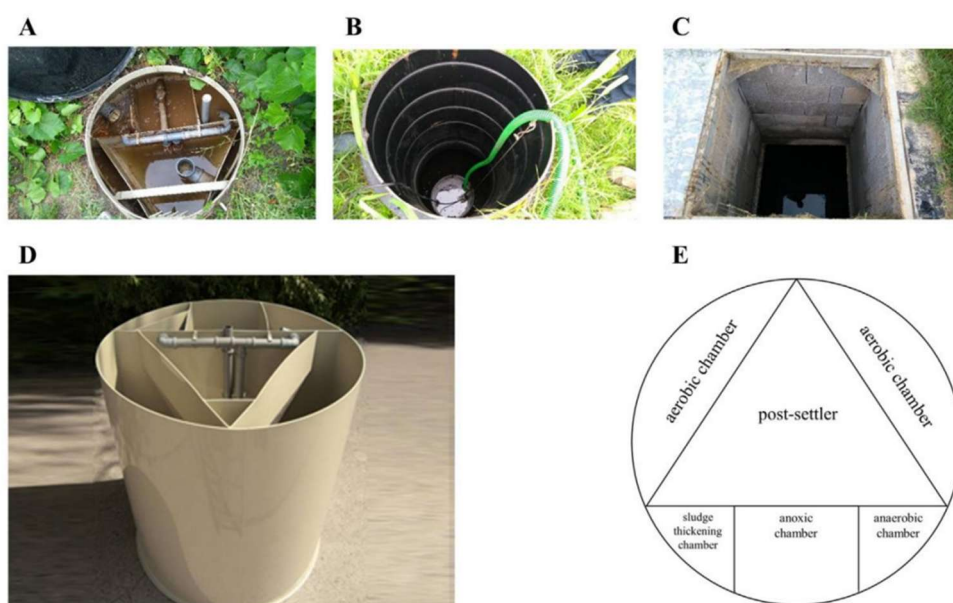


3. ábra Ökotech-Home Kft. kisberendezésének sematikus ábrája (Knisz és mtsai. 2021)

A vizsgált kisberendezés az Öko-Home Kft. terméke (3. ábra). Általánosságban a Öko-Home Kft. szennyvíztisztító berendezései a föld alá kerülnek telepítésre mintegy 15 cm vastagságú szerelő beton ágyon. Így a tartály teteje 5 cm-rel haladja meg a talajszintet. A tisztított szennyvíz tárolás után kerül a szikkasztómezőre. Az elszikkasztás GRAF szikkasztóelemek segítségével történik. A föld alatt egy alagút rendszert alakítanak ki, ezen keresztül tud a víz elszivárogni. A szikkasztóelem: 3 alagútelemre, két végzáró elemre, és egy geotextíliára tagolható. Az Öko-Home Kft. a berendezéseinél iszapzsákos technológiát alkalmaz. A kezelés során keletkező fölösiszap az elősűrítés után, egy iszapzsákba kerül. Mechanikai szűrőegységként elválasztja az iszapot, a vizet pedig vissza lehet vezetni a

rendszerbe. Költséghatékony megoldás mivel az iszap kezeléséhez nincs szükség „szippantásra”, komposztálható és 1-1,5 év után felhasználható. Ezt a műveletet a tulajdonos is végre hajthatja („Ökotech-Home Kft. – Biológiai szennyvíztisztító berendezések gyártása, telepítése.”).

A kis berendezés, amiből a vizsgált minta származik is egy olyan településen lévő családi háznál került telepítésre, ahol szennyvízelvezetés nincs megoldva. Részen környezettudatossági, részben gazdasági megfontolás miatt választották ezt a lehetőséget, mivel a kezelt szennyvizet öntözésre fel tudják használni. Emiatt a rövid tartózkodási idejű 3 m³ tartályt kiegészíti, egy 49 m³ -es hosszú tartózkodási idejű tartály is, hogy a téli időszakban keletkezett kezelt szennyvizet el tudják tárolni.



1. ábra: A vizsgáldóhely és a szennyvíz tisztító tó egység. A. Kezelési egység. B. 3 m³ -es rövid távú tárolóedény. C. 49 m³ -es tartós tárolási konténer. D. Szennyvíz tisztító tó egység. E. Az egység vázlata. A tisztított szennyvíz a tisztító tó egység utóülepítő jéből (A) egy rövid távú tárolóba (B), majd egy hosszú távú tárolóba (C) folyik.

4. ábra Szennyvíztisztító egység. A: Kezelési egység, B: 3m³ tartály, C: 49m³ konténer, D: tisztító egység, E: Vázlat (Knisz és mtsai. 2021)

Az épületből a szennyvíz egy szitán folyik keresztül, ami az egységbe kerülés előtt felfogja a nagyobb anyagokat, ezek később a buborékolatás hatása felbomlanak. Innen kerül be az anaerob kamrákba, meg történik az erjedés és a denitrifikáció. Az eleveniszap folyamatosan kering a két kamra között. A kamra alsó részén a szennyvíz az iszappal együtt az anoxikus kamra aljába kerül majd két billenő nyílás és egy átvezető cső segítségével az aerob kamra aljába folyik. A levegőztetett szennyvíz az aerob kamra tetején át az utóülepítőbe folyik. A tisztított szennyvíz a kezelési folyamat után egy áramlásszabályozott csövön kerül a

befogadóba, amely lehet infiltráló egység, felszínivíz, vagy tároló tartály. A fölösiszapot egy szivattyú az iszapsűrítő kamrába továbbítja. (Knisz és mtsai. 2021).

4.2 Mintagyűjtés és szekvenálás

4.2.1 Mintagyűjtés

A nemzeti szabályozás szerint a kisberendezésekből származó szennyvíz mintavételéhez minősített mintavételre van szükség (Ministry of Environmental Protection and Water Management, 2004) ezért 2019 júniusában ennek megfelelően minősített mintavételre került sor. A mintavétel során egy teleszkópos rúdhoz rögzített rozsdamentes acél mintavevő készüléket használtak. A mintavevő készüléket ddH₂O-val öblítették, megszáritották és etanollal fertőtlenítették a mintavételi pontok között. A mintavevő segítségével a tartályokban lévő vizet kevergetéssel homogenizálták, majd három-öt perces időközönként öt markolómintát vettek. A mintavételeket összevonták, és az összevont mintákat használták fel a további elemzésekhez. A mintavétel sorrendje a következő volt: hosszú távú tároló tartály (PC minta), rövid távú tároló tartály (PB mintavételi pont) és a kezelőegység (PA minta). A hosszú távú tárolótartályból csak a tartály egyetlen nyílásánál lehetett mintát venni, azaz ~ 1,5 m-re a rövid távú tárolótartály beömlőnyílásától. Az egyesített mintákat a mikrobiális közösségek elemzésére, a terepi vizsgálatokra és az analitikai vizsgálatokra használták fel. A vízmintákat műanyag és üvegpalackokban szállították, és 4 °C-ra lehűtéssel, illetve lefagyasztással kerültek eltárolásra a felhasználásig (Knisz és mtsai. 2021).

4.2.2 Bioinformatikai elemzés

A DNS kivonás és a szekvenálás Knisz és mtsai. 2021-es cikkükben leírt módszerek alapján történt és a Seqomics Kft. végezte. A páros-végű szekvenálás az Illumina NextSeq szekvenálóval történt. Csoportunkhoz a fastq fájlok az alábbi, három mintavételi ponthoz tartozó forward és reverse szekvenciák érkeztek.

- P1A_S30_L001_R1_001 és P1A_S30_L001_R2_001
- P1B_S30_L001_R1_001 és P1B_S30_L001_R2_001
- P1C_S30_L001_R1_001 és P1C_S30_L001_R2_001

A fájlok elnevezésében a mintavételi pontot jelentik a P1A, P1B és P1C jelölések, illetve az R1 a forward leolvasásokat, az R2 a reverse leolvasásokat. A fájlokat a könnyebb kezelhetőség miatt átneveztük, a régi és az új nevezéktant az 1. Táblázatban mutatjuk be.

1. táblázat Minták elnevezései

Eredeti elnevezés	Új elnevezés
P1A_S30_L001*	3A_2019
P1B_S30_L001*	3B_2019
P1C_S30_L001*	3C_2019

* helyettesítő karakter

A fastq fájlok elemzésének egy részét a Galaxy Europe online bioinformatikai platformon, a <https://usegalaxy.eu/> oldalon végeztük, míg egyes lépések Linux rendszeren, terminálban történtek.

4.2.3 Szekvenálási eredmények minőségi szűrése

A nyers fastaq file-okat feltöltöttük az oldal felületére, majd a FastQC (Galaxy Version 0.74+galaxy0) programmal ellenőriztük a szekvenciák minőségét. A FastQC-hez alapbeállításokat használtunk.

A szekvenciák trimmelése és minőségi szűrése a BBTools: BBduk decontamination using kmers (Galaxy Version 39.01+galaxy0) programmal végeztük el és a „NEBNext_UltraII_DNA_adaptors.fasta” fájlban található szekvencia fájl alapján szűrtük az adaptereket (trim reads to remove bases matching reference kmers? YES; --ktrim=r; --minlength=36; --k=19; --rkomp: YES; --maskmiddle:YES; --minkmerhits=1; --minkmerfraction=0.0; --mincovfraction=0.0; --hammingdist=1; --qhdist=0; --editdistance=0).

4.2.4 Taxonómiai elemzés

A BBduk által szűrt szekvenciák páros olvasásain végeztük el a taxonómia besorolást a Kraken2 (Galaxy Version 2.1.1+galaxy1) programmal (Wood és Salzberg 2014) (--paired; --use-names; --confidence=0; --minimum-base-quality=0; --minimum-hit-groups=2; --report: YES; --db k2_pluspf_20210517). Adatbázisnak a kraken2 PlusPF (2021.05.17.) adatbázisát

használtuk, mely tartalmazta az archeák, baktériumok, vírusok, plazmidok, humán⁰, UniVec_Core szekvenciák mellett a protozoák és gombák referencia szekvenciáit is (Lu és Salzberg 2018).

A kraken2 taxonómiai besorolásokat végzett és az így kapott report fájlokkal a Bracken (Bayesian Reestimation of Abundance with Kraken) (Galaxy Version 2.8+galaxy0) programot futtattuk (PlusPF_20210517 adatbázis; level: species; --out report: Yes). A Bracken a Kraken2 által elvégzett taxonómiai besorolások után egy rendkívül pontos metagenomikai osztályozási algoritmust használ, hogy megbecsülje a mintában jelenlévő egyes fajokból származó leolvasások számát, a relatív abundanciát. A Kraken2-vel kombinálva a Bracken pontos faj- és nemzetségszintű abundancia becsléseket ad még akkor is, ha egy minta két, vagy több közel azonos fajt tartalmaz (Lu és mtsai. 2017).

A Bracken eredményfájlján a Kraken-biom, (Create BIOM-format tables from kraken output) (Galaxy Version 1.2.0+galaxy1) programmal készítettünk biom fájlokat a további munkafolyamatokhoz. A Kraken-biom esetében alapbeállításokkal történt a report fájlok biom fájlra konvertálása. Az így kapott biom fájlokkal készültek R programmal (v4.2.0) a plotok.

4.2.5 Antimikrobiális rezisztencia gének elemzése

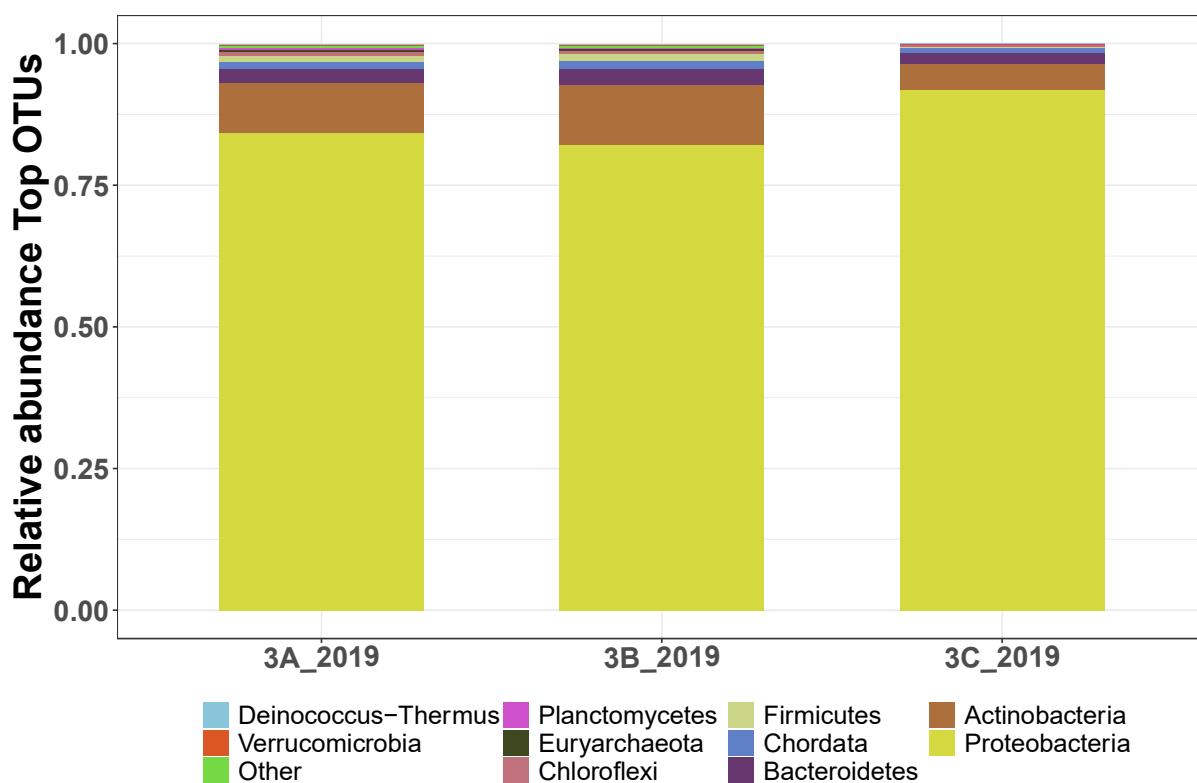
Bár az online CARD RGI elérhető ingyenesen mindenki számára, jelen dolgozatban mégis a terminálban futtatható, parancssori verziót használtuk, mert így pontosabb és könnyebben ismételhető eredményeket kapunk, illetve a módszer később további szekvenciák esetében is könnyen használható. A fentiekben ismertetett BBduk program futtatását követően a Megahit (v.1.2.9) programmal contig-okat készítettünk a szűrt, páros read fájlokkal (--min-count 2; --k-list 27,37,47,57,67,77,87; --bubble-level 2; --merge-level 20,0.95; --prune-level 2; --prune-depth 2; --disconnect-ratio 0.1; --low-local-ratio 0.2; --cleaning-rounds 5; --min-contig-len 1000). Ezt követte a CARD RGI (v6.0.1) rgi main parancsa (--local --clean -a DIAMOND --low_quality --debug). Az így kapott .json fájlok már az online felületen (CARD Web portal - RGI 6.0.1 <https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) is ábrázolhatóak, de heatmap-eket készítettünk a rgi heatmap (v6.0.2) (-cat drug_class; -clus samples).

5 EREDMÉNYEK

5.1 Szekvenálási eredmények

5.1.1 *Taxonómiai elemzés*

A kapott eredmények közül a tíz leggyakrabban előforduló taxonómiai csoportokat ábrázolja az 4. ábra, melyek közül a Chordata törzs az Eukaryota doménbe tartozik, míg az Euryarchaeota törzs a Archaea doménbe. A további nyolc taxon a Baktérium doménbe tartozik, így már ebből is látszik, hogy baktériumokból volt a legtöbb a mintákban.



5. ábra A leggyakrabban előforduló törzsek a 3A_2019, a 3B_2019 és a 3C_2019-es mintákban. Az ábra a mindhárom mintában előforduló törzsek közül a leggyakoribb tízet ábrázolja.

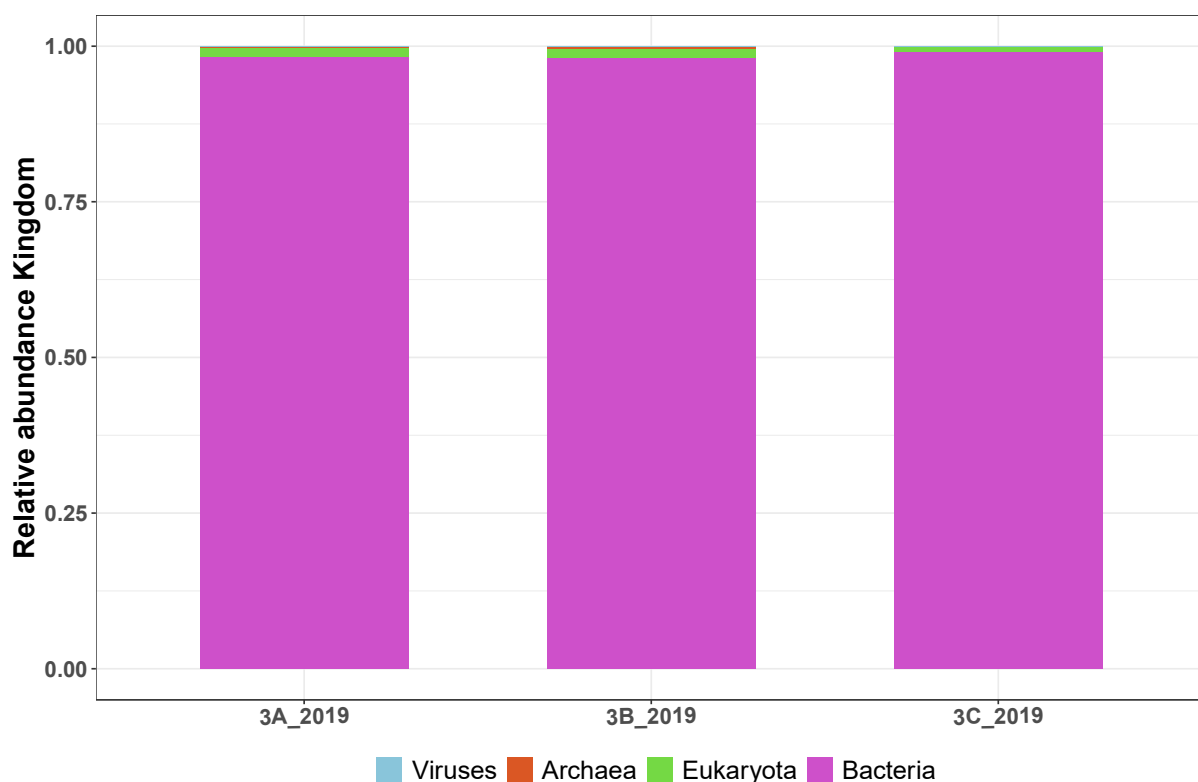
A leggyakoribb taxonómiai csoportok közül a Proteobacteria törzs tagjai voltak a legtöbbben, ezt követi az Actinobacteria törzs és a Bacteroidetes törzs tagjai.

A szennyvíz kezelése során a Proteobacteria és Actinobacteria csoportjai gyakran jelen vannak. Ezek a baktériumok részt vesznek a biológiai szennyvíztisztításban, ahol segítenek lebontani a szerves anyagokat és eltávolítani a szennyezőanyagokat a vízből. Például a

Proteobacteria közé tartozó nitrogén-képző baktériumok nélkülözhetetlenek az ammóniából nitritekre és nitratekre történő átalakítás során a biológiai szennyvíztisztítás folyamatában (Fan és mtsai. 2020) (Agunbiade, Pohl, és Ashafa 2016).

Azonban a Proteobacteria törzs nem csak a tisztító folyamatban játszik fontos szerepet, hanem olyan patogén fajokat is tartalmaz, amelyek kórokozók lehetnek az emberre és az állatokra. Ezek a kórokozó baktériumok, például a *Salmonella sp.* és a *Escherichia coli*, amelyek a szennyvízben való jelenlétük miatt egészségügyi kockázatot jelenthetnek.

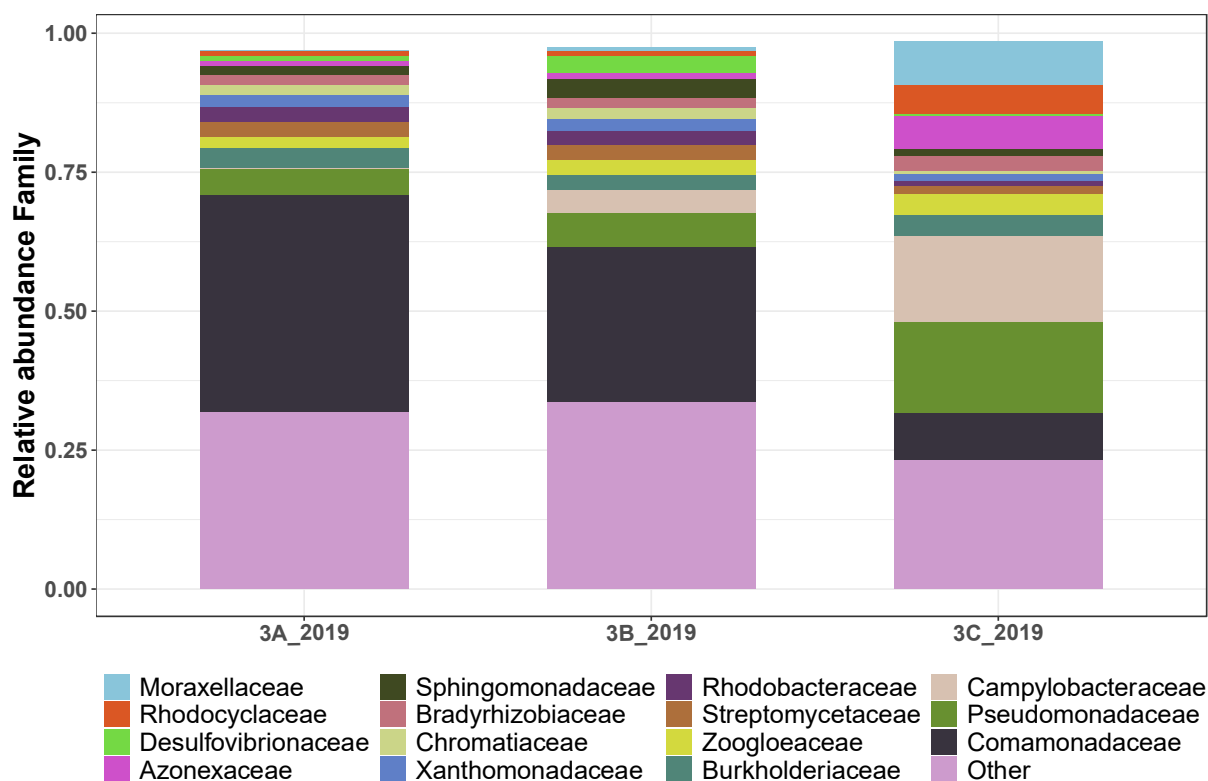
A Bacteroidetes törzs tagjai rendkívül alkalmazkodóképesek és sokféle környezeti feltételhez alkalmazkodhatnak, ami azt jelenti, hogy a szennyvíz kezelésének különböző lépéseiben és környezeti feltételek mellett is jelen lehetnek és aktívan részt vehetnek a szerves anyagok lebontásában. (Zhang és mtsai. 2019)



6. ábra A taxonómiai országok előfordulása a 3A_2019, a 3B_2019 és a 3C_2019-es mintákban. Az ábra a mindhárom mintában előforduló országokat ábrázolja.

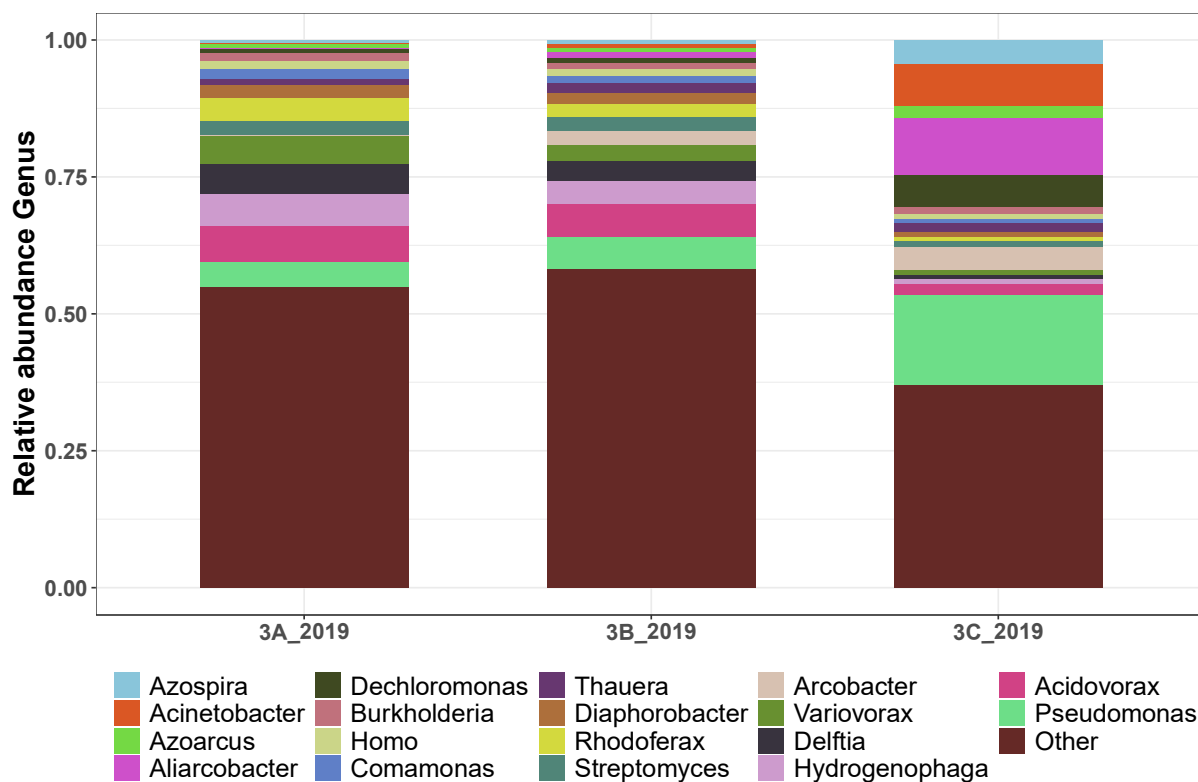
A leggyakrabban előforduló törzsek eredményeit támasztja alá a 5. ábra, mely az országok eloszlását mutatja. A Baktériumok országába tartozó taxon tagjai képviselik magukat a legnagyobb arányban ebben a három mintában, míg az Eukarióták és az Arhceák és a Vírusok országába tartozó taxonok tagjai elenyésző mennyiségben fordulnak elő a mintákban.

A taxonómiai családok eloszlását a mintákban a 6. ábra szemlélteti. A család szinten elemezve az eredményeinket azt tapasztaltuk, hogy Comamonadaceae család tagjai a 3A_2019-es mintában volt a legtöbb, ami érthető, hiszen ez a szennyvíz utóülepítő tartálya és itt jellemzően még anaerob baktériumok fordulnak elő, majd a 3B_2019-es mintában, mely a rövid tározó, már valamivel kevesebb, hisz itt aerob baktériumok jelenléte a domináns, míg a 3C_2019-es mintában, amely a hosszú tározó már jóval kevesebb a mennyiségük az előző két mintához képest. A Comamonadaceae család tagjai a Proteobacteria törzsbe tartoznak és széles körben elterjedtek a környezetben, ideértve a szennyvizet is. Ezek a baktériumok fontos szerepet játszanak a természetes környezetben és az ipari szennyvíztisztító rendszerekben is. A Campylobacteraceae család tagjai pedig pont fordított arányban szerepelnek a mintáknál. A 3A_2019-es mintánál volt a legkevesebb, majd a 3B_2019-ben több és a 3C_2019-ben a legtöbb. A Desulfovibrionaceae család tagjai a szulfát-redukáló baktériumok közé tartoznak, melyek képesek az anaerob környezetben a szulfátokat más vegyületekre redukálni. Ezek a baktériumok fontos szerepet játszanak a kénkörforgásban és az anaerob környezetben élnek, mint például a talajban, mocsarakban, a tengerfenéken vagy akár szennyvízben is (Zhou és mtsai. 2021) (Galushko és Kuever 2020). Jelen minták esetében a 3B_2019-es mintánál találtuk meg a legnagyobb mennyiségben, de elenyésző százalékban a másik két mintánál is jelen volt.



7. ábra A taxonómiai családok relatív abundanciája a 3A_2019, a 3B_2019 és a 3C_2019-es mintákban. Az ábra a mindhárom mintában előforduló családokat ábrázolja.

A Moraxellaceae családhoz tartozó baktériumok aerob (oxigént igénylő) Gram-negatív baktériumok, és sok fajuk fontos szerepet játszik a biokémiai folyamatokban, például a szerves anyagok lebontásában és az anyagcserében (Shchegolkova és mtsai. 2016). A három mintánk esetében a 3C_2019-es mintában volt a legtöbb, ugyanígy az Rhodocyclaceae család tagjainak előfordulása is ezen minta esetében volt a legmagasabb, mely a hasonló környezeti tényezőkhöz való alkalmazkodásuknak tulajdonítunk.



8. ábra A nemzetség relatív abundanciája a 3A_2019, a 3B_2019 és a 3C_2019-es mintákban. Az ábra a mindhárom mintában előforduló nemzetséget ábrázolja.

Nemzetség szinten (7. Ábra) hasonló arányokat tapasztalhatunk, mint az előzőek során és itt már megerősítést nyer az a feltételezésünk is, hogy az utóülepítő, a 3A_2019-es minta és a rövid tározó, a 3B_2019-es minta esetében sokkal inkább jellemző az, hogy hasonló a mikrobiális közösséget felépítő taxonómiai csoportok jelenléte, mint a harmadik minta, a hosszú tározó esetében, mely a 3C_2019. A három minta esetében az a 18 nemzetség látható a 7. Ábrán, ami mindhárom minta esetében előfordult. A Homo nemzetség jelenlétéből a szennyvízben jelenlévő humán DNS kontaminációra lehet következtetni, ami nem meglepő, hisz lakossági szennyvízmintákat vizsgáltunk. A Pseudomonas nemzetség tagjai a 3A_2019-es mintától növekszik a 3B_2019-es rövid tározóban és a legnagyobb mennyiségben a hosszú tározóban, 3C_2019-es mintában találtuk meg. Ezzel szemben az Acidovorax és a Hydrogenophaga

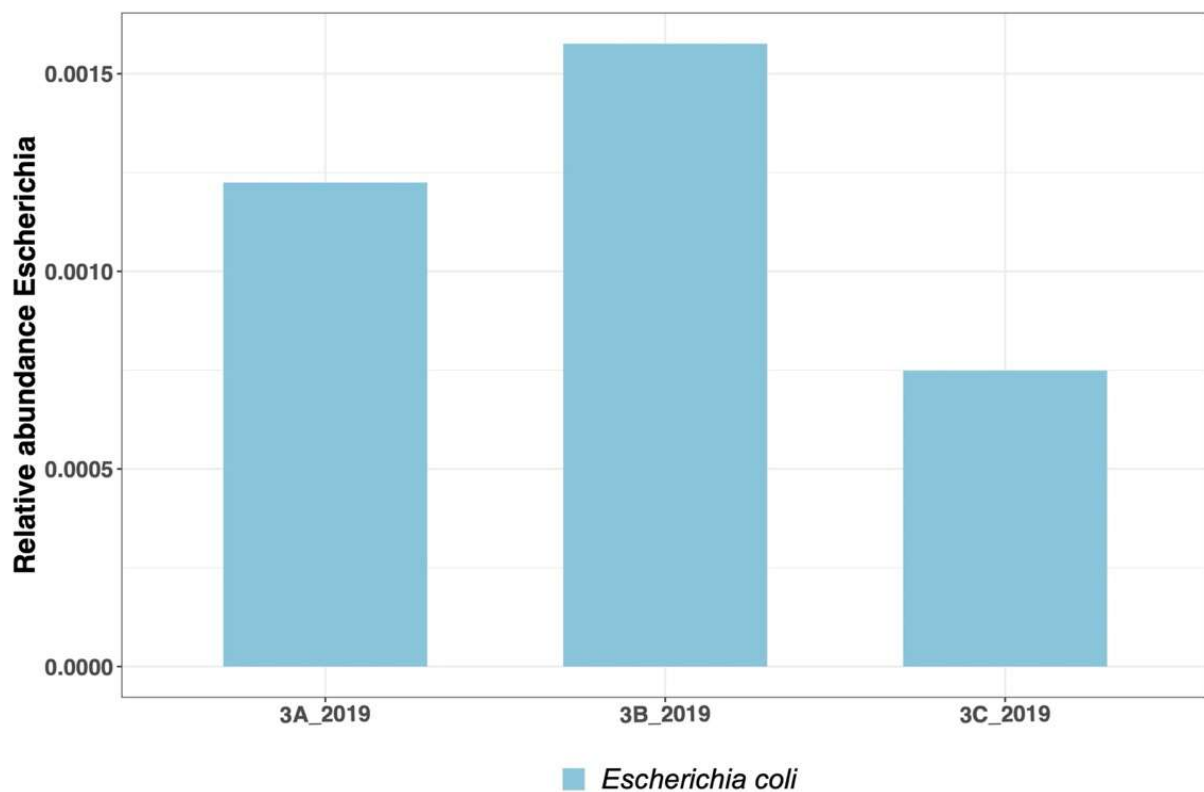
nemzettség tagjai a 3A_2019-es mintában volt a legtöbb, majd a 3B_2019-es mintában kevesebb és a 3C_2019-es mintában a legkevesebb. Az *Azospira*, *Acinetobacter*, *Azoarcus* és az *Aliarcobacter* nemzetség tagjai jelentősen magasabb arányban képviseltették magukat a 3C_2019-es mintában, mint a 3A_2019 és a 3B_2019-es minta esetében, mely alapján arra következtetünk, hogy a hosszútávú tározókban más környezeti feltételek uralkodhatnak, mint az utóülepítő vagy a rövid tározó esetében (például eltérő pH-szint, hőmérséklet vagy oxigénszint változások, melyek befolyásolhatják ezeknek a baktériumoknak a populációját és növekedését (Crini és Lichtfouse 2019)

5.1.1.1 Patogén baktériumok jelenléte

A szennyvízminták metagenom szekvenálásának taxonómiai eredményei közül talán a legjelentősebb a patogén baktériumok jelenlétének vizsgálata, az ESKAPE patogének előfordulása.

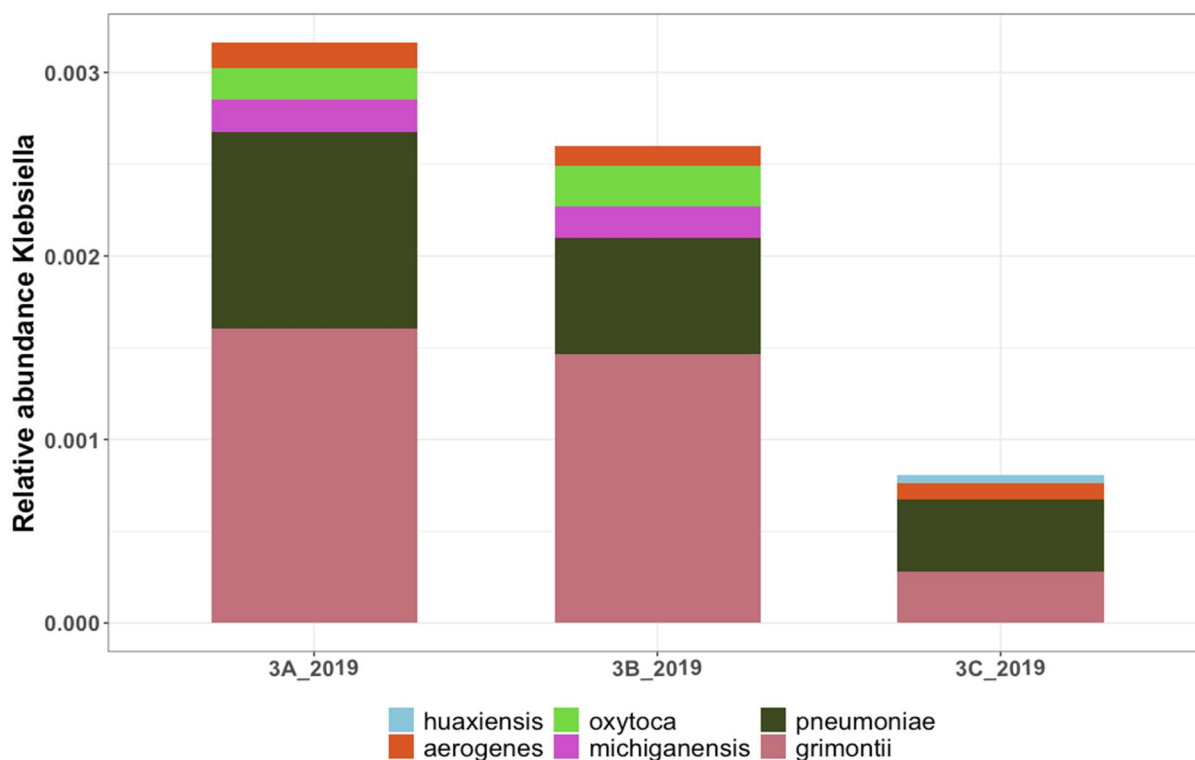
Az *Escherichia coli*, a *Staphylococcus aureus*, a *Klebsiella pneumoniae*, a *Streptococcus pneumoniae*, az *Acinetobacter baumannii* és a *Pseudomonas aeruginosa* patogén baktériumok közül az *E. coli*, a *K. pneumoniae*, az *A. baumannii* és a *P. aeruginosa* volt kimutatható a mintáinkban. Ezek a fajok viszont mind a három mintában megtalálhatóak voltak, ahogy a 8-11. Ábrán láthatóak.

A 8. Ábrán látható, hogy az *E. coli* relatív abundanciája a 3B_2019-es mintában a legnagyobb, míg a 3C_2019-es minta esetében a legkisebb.



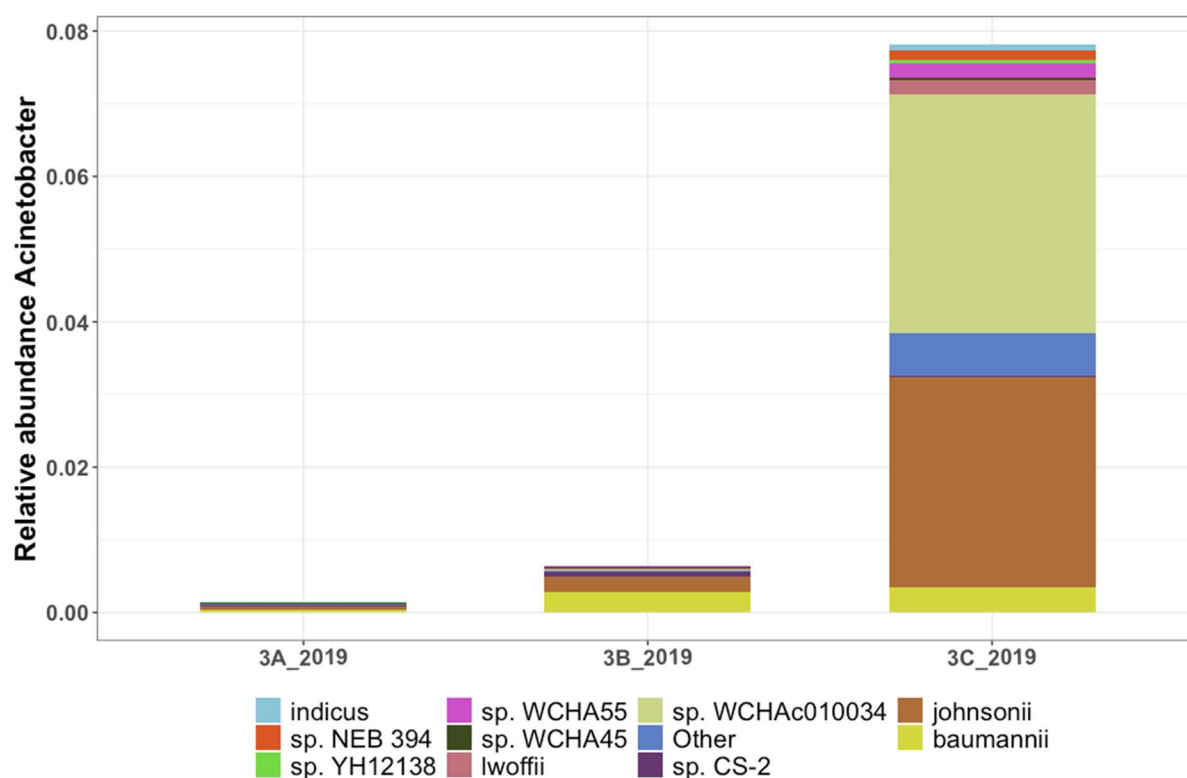
9. ábra A *Escherichia coli* relatív abundanciája a 3A_2019, a 3B_2019 és a 3C_2019-es mintákban.

A 9. Ábrán a *Klebsiella sp.* relatív abundanciája látható. Hat *Klebsiella* fajt sikerült kimutatnunk, köztük a *K. pneumoniae* patogén baktériumot is mely a 3A_2019-es mintában volt a legtöbb és folyamatos csökkenést tapasztaltunk a 3C_2019-es minta felé, ahol megjelent a *K. huaxiensis* faj is, mely az előző két tartályban még nem volt jelen. A *K. michiganensis* és a *K. oxytoca* viszont nem volt jelen a 3C_2019-es mintában, ellenben a 3A_2019 és a 3B_2019-es mintával.



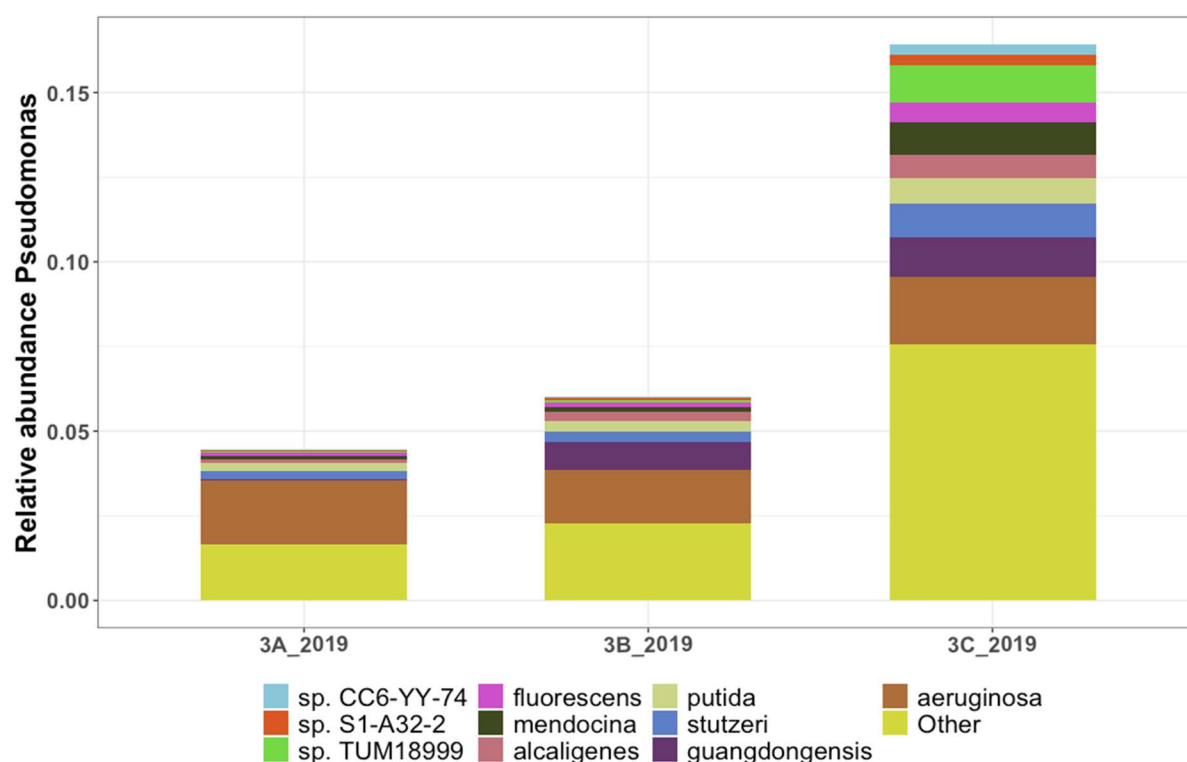
10. ábra Ábra A *Klebsiella* fajok relatív abundanciája a 3A_2019, a 3B_2019 és a 3C_2019-es mintákban.

A 10. Ábrán az *Acinetobacter* fajok láthatóak, melyből 11 volt megtalálható a három mintánk esetében. A fajok számában és a mennyiségük tekintetében is kimagaslóan sok volt a hosszú tározóban, a 3C_2019-es mintában, míg az előző két szennyvízminta esetében elenyésző mennyiségben voltak jelen. Az *A. baumannii* viszont mindhárom mintában megtalálható volt, de a minták között ebben a tekintetben nem találtunk jelentős eltérést.



11. ábra Az *Acinetobacter* fajok relatív abundanciája a 3A_2019, a 3B_2019 és a 3C_2019-es mintákban.

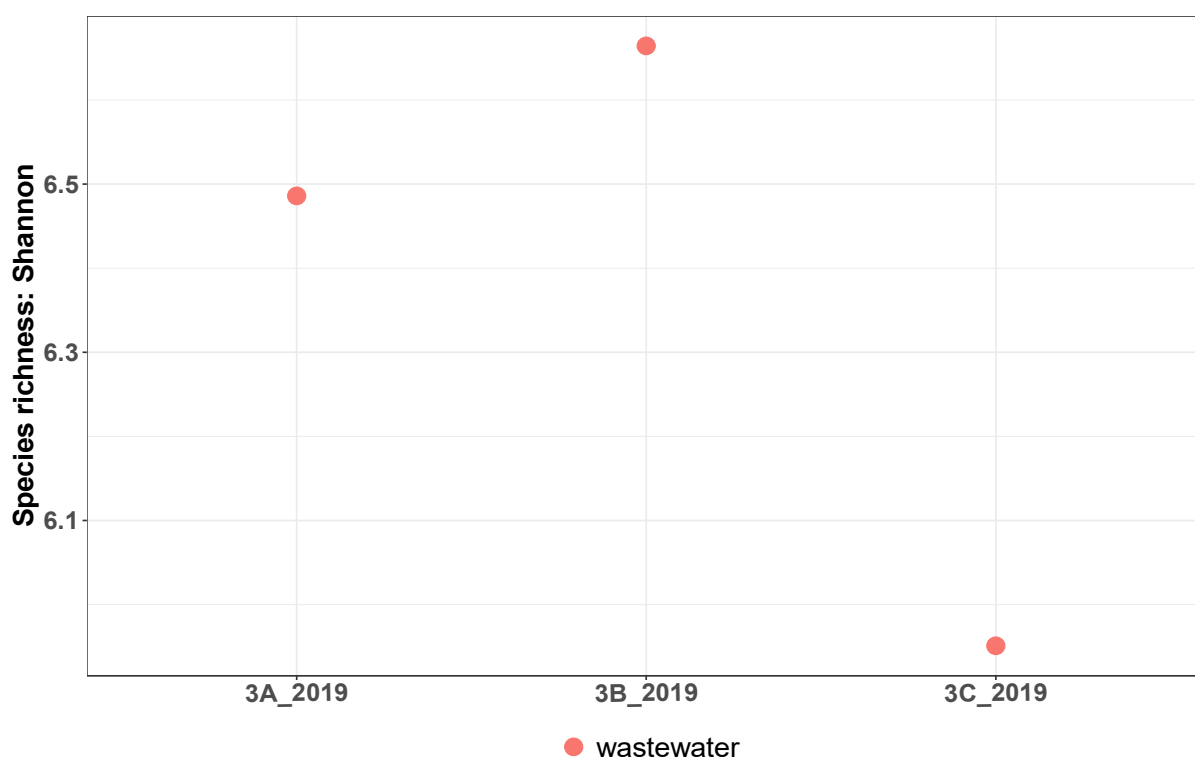
A *Pseudomonas* fajok relatív abundanciáját a 8. Ábrán láthatjuk és itt is, hasonlóan az *Acinetobacter* fajokhoz, a 3C_2019-es mintában volt a legtöbb *A. sp* és a mennyiségüket tekintve is közel háromszor több *Pseudomonas* volt a hosszú tározóban, mint az előző két tartály esetében.



12. ábra A *Pseudomonas* fajok relatív abundanciája a 3A_2019, a 3B_2019 és a 3C_2019-es mintákban.

5.1.1.2 Alfa-diverzitás

A Shannon diverzitási index (12. Ábra) az adott mintavételi helyen található fajok sokféleségének vagy diverzitásának mérésére szolgáló statisztikai mutató (Torsvik és mtsai. 1990). A három mintavételi pont esetében az alábbi értékeket kaptuk 3A_2019= 6.486; 3B_2019=6.664; 3C_2019= 5.951, mely alapján arra következtetünk, hogy bár kis különbségeket tapasztaltunk, a 3B_2019-es minta esetében volt a legmagasabb a fajgazdagság a 3C_2019-es minta esetében pedig a legkisebb.



13. ábra A Shannon diverzitási index értékei a 3A_2019, a 3B_2019 és a 3C_2019-es szennyvízmintákban.

5.1.2 Antimikrobiális rezisztenciagének

Vizsgálataink alapján azt kaptuk, hogy e három szennyvízmintából mindössze egy esetben, a 3C_2019-es mintában volt kimutatható antimikrobiális rezisztencia gén (2. táblázat). Ebben az egy mintában viszont a „protein homolog model” egy esetben talált tökéletes egyezést a referenciához képest, ezt pedig az *aadA27-es* gén volt. További két gén esetében (*rsmA*, *adeF*) a talált gén hossza egyezett a referencia adatbázisban talált gén hosszával, azonban némi eltérés volt a génben.

2. táblázat Antimikrobiális rezisztencia gének a 3C_2019-es mintában

RGI criteria	ARO Term	Detection Criteria	AMR gene family	Drug class	Resistance mechanism	% Identity of Matching Region	% Length of Reference Sequence
Perfect	aadA27	protein homolog model	ANT(3")	aminoglycoside antibiotic	antibiotic inactivation	100,00	100,00
Strict	rsmA	protein homolog model	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	fluoroquinolone antibiotic, diaminopyrimidine antibiotic, phenicol antibiotic	antibiotic efflux	98,33	100,00
Strict	adeF	protein homolog model	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	fluoroquinolone antibiotic, tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	84,01	100,76

Az *aadA27* (ARO:3004682) vagy *ant(3")-1* gének a sztreptomycin 3"-adenilil-transzferázt kódolják, amely egy adenilációs módosítás révén közvetíti a sztreptomycin és spektinomycin elleni kombinált rezisztenciát. Az *aadA* gének számos Gram-negatív baktérium plazmid- és kromoszómális DNS-én, valamint egyes Gram-pozitív baktériumokban találhatók (Courvalin és Flandt, 1980; Hollingshead és Vapnek, 1985; Clark és munkatársai, 1999; Sandvang, 1999). Az *aadA* gén újonnan kimutatott változatainak száma tovább növekszik. A publikált adatok alapján e génnek legismertebb változatai az 1. és 2. osztályú integronokon belül található kazetták (Kadlec és Schwarz, 2008; Stokes és Gillings, 2011; Tang et al., 2011; Chaisatit és mtsai, 2012; Kurakov és mtsai. 2016).

Az NCBI MicroBIGG-E oldalán kerestük az *aadA27*-es gént (3. táblázat) és azt kaptuk, hogy a *Proteus mirabilis*, a *K. pneumoniae*, *A. baumannii* és a *Staphylococcus aureus* fajokban találták meg, melyből mi az *A. baumannii* fajt találtuk meg a mintáinkban és ráadásul a legtöbb mennyiségben pont a 3C_2019-es mintában, ahol a rezisztencia gén is megtalálható volt.

3. táblázat Az NCBI MicroBIGG-E oldalán az *aadA27*-es gén keresésének találat

#Scientific name	Protein	BioSample	Isolate	Contig	Start	Stop	Strand	Element symbol
<i>Proteus mirabilis</i>	HCR3211675.1	SAMN31357685	PDT001474458.1	DAJSMF010000001.1	82329	83117	+	<i>aadA27</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	WP_050041693.1	SAMN32166585	PDT001549680.1	NZ_JAPWSS010000001.1	3376624	3377412	+	<i>aadA27</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	WP_050041693.1	SAMN32166588	PDT001549683.1	NZ_JAPWST010000001.1	3381232	3382020	+	<i>aadA27</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	WP_050041693.1	SAMN28928610	PDT001672057.1	NZ_JAMSAT010000014.1	39676	40464	-	<i>aadA27</i>
<i>Klebsiella varicola</i>	WP_253182442.1	SAMN04378133	PDT000124743.1	NZ_LQMR010000025.1	635	1114	+	<i>aadA27</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_264237828.1	SAMN31359322	PDT001471018.1	NZ_JAOZJO010000048.1	1981	2769	+	<i>aadA27</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	WP_264237828.1	SAMN31359167	PDT001473324.1	NZ_JAPCYM010000048.1	1981	2769	+	<i>aadA27</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	HCR3215184.1	SAMN31357685	PDT001474458.1	DAJSMF010000432.1	69309	70097	+	<i>aadA27</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	HDC7781022.1	SAMEA3929418	PDT001547221.1	DALSAL010000019.1	446	1234	+	<i>aadA27</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	HDC7781231.1	SAMEA3929418	PDT001547221.1	DALSAL010000031.1	474	1262	+	<i>aadA27</i>

Az *adeF* gén (ARO:3000777) egy efflux pumpa gén. Az *A. baumannii* belső és szerzett rezisztenciájához is efflux pumpák járulnak hozzá így alakítva ki rezisztenciát az antibiotikumok és fertőtlenítőszeres széles skálájával szemben. Ennek oka az efflux pumpa gének fokozott expressziója az antibiotikumok okozta szelektív nyomásra. Az AdeFGH expresszióját a LysR típusú transzkripció szabályozó (LTTR) szabályozza, és MDR-t biztosít, ha hatékonyan expresszálódik. Az AdeFGH-t a klinikai izolátumok körülbelül 90%-ában találták meg, és magas expressziója felelős a kloramfenikollal, klindamicinnel, fluorokinolonokkal és trimetoprimmal szembeni rezisztencia kialakulásáért (Kaviani és mtsai. 2020). Az NCBI MicroBIGG-E oldalán kerestük az *adeF* gént de nem kaptunk találatot.

Az *rsmA* gén (ARO:3000777) az *Escherichia coli*-ban található *csrA* gén homológja. A *Pseudomonas aeruginosa* virulenciáját szabályozza, emellett a MexEF-OprN túlzott expressziójára gyakorolt negatív hatása miatt rezisztenciát biztosít különböző antibiotikumokkal szemben. Megnövekedett a rezisztencia az amikacinnal, a nalidixsavval és a tri-metoprimmel és ceftazidimmal szemben (a MexEF-OprN ismert szubsztrátjai), valamint az aminoglikozid gentamicinnel, a MexXY-OprM specifikus szubsztrátja. A kloramfenikollal és a tetraciklinnel szembeni rezisztencia szintje összehasonlíthatóak voltak, és az *rsmA* mutáns csökkent rezisztenciát mutatott a polimixin B-vel és a kolisztinnel szemben (Mulcahy és mtsai. 2006). Az NCBI MicroBIGG-E oldalán kerestük az *rsmA* gént de nem kaptunk találatot.

6 ÖSSZEGZÉS

Az antibiotikum rezisztencia gének kimutatása a szennyvízben fontos az emberi egészség, a környezet és a közegészség szempontjából. A megfelelő intézkedések megtétele és a rezisztencia terjedésének monitorozása segíthet megelőzni az antibiotikum rezisztencia problémájának súlyosbodását és a közegészségre gyakorolt káros hatásait.

A baktériumok természetes, illetve szerzett antibiotikum rezisztenciával rendelkezhetnek. A szerzett rezisztencia létrejöhet génmutáció, illetve a rezisztenciát kódoló gén megszerzésével a horizontális géntranszfernek hívott folyamat eredményeként. A horizontális géntranszfer során a mobil genetikai elemek átadása történhet transzformáció, transzdukción vagy konjugáción által. A biofilmek is ellenállnak az antibiotikumoknak és fertőtlenítő szereknek, mivel az EPS diffúziós gátként megnehezíti a hatóanyagok mélyebb rétegbe való behatolását, így akár nagyságrendekkel megnövelve a minimálisan-gátló koncentrációt.

A szennyvízben megtalálható antibiotikumok és más szennyezők szelekciós nyomása, illetve a nagyszámú mikrobiális közösség miatt a telepek megfelelő környezetet biztosítanak a rezisztenciagének kialakulásának és terjedésének. A szennyvíztisztító telepek AMR géneket juttatnak a befogadókba, ezzel növelve az antibiotikum rezisztencia terhelését.

Hasonló folyamatok a kisberendezésekben is jelen vannak, a kutatások alapján a karbantartás hiánya miatt a helyi követelményeknek csak 48%-uk felel meg. Bizonyítást nyert hogy az eleveniszapos technológiák nem teljesítenek olyan jól mint a biofilmes alternatívák.

Mivel egyre komolyabb probléma az antibiotikum rezisztencia ezért a WHO közzétette az ESKAPE betűszó alatt a legfontosabb kórokozók listáját (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* és az *Enterobacter* fajok például az *Escherichia coli*). Magyarországon az Országos Epidemiológiai Központ (OEK) Bakteriológiai osztálya által vezetett mikrobiológiai Surveillance 32 hazai laborból gyűjt adatokat, melyek szintén megerősítik az említett patogének nyomkövetésének fontosságát.

A dolgozatomban vizsgált kisberendezés az Öko-Home Kft. terméke. A kisberendezésből a nemzetközi szabályozásnak megfelelően történt a mintavétel, szállítás és tárolás. Az DNS kivonás és szekvenálás után kaptam fastaq fájlokat a bioinformatikai elemzésekhez. A szennyvíz metagenomikai elemzése egy komplex és informatív megközelítés. Segítségével feltárható a minták mikrobiális összetétele. A hagyományos módszerekkel csak a

tenyésztethető mikroorganizmusokat lehet azonosítani, míg a metogenomikai eszközökkel a teljes mikrobiális közösség azonosítható.

Az első hipotézisem az volt, hogy a szennyvíztisztító kisberendezésekben hasonlóan a centralizált szennyvíztisztítókhöz, detektálhatók patogén baktériumok. Az ESKAPE-ből az *E. coli*, a *K. pneumoniae*, az *A. baumannii* és a *P. aeruginosa* kimutatható a mintáinkban.

A második hipotézisem, hogy a kevesebb szennyező anyag és a kevésbé heterogén bakteriális közösség miatt a szennyvíztisztító kisberendezésekben nem, vagy alig lesz detektálható antibiotikum-rezisztencia gén. A vizsgálataink azt mutatják, hogy a mintáinkból csak a 3C_2019 mintában volt kimutatható antibiotikum rezisztencia gén. Az *aadA27*-es szekvenciánk tökéletesen egyezett a CARD adatbázisban tárolt szekvenciával, további két gén esetében (*rsmA*, *adeF*) a talált gén hossza egyezett a referencia adatbázisban talált gén hosszával, azonban némi eltérés volt a génben. Az észlelési modell alapján nem zárható ki a jelenlétük.

Az *aadA27*-gént a NCBI MicroBIGG-E oldalán keresve azt kaptuk, hogy a *Proteus mirabilis*, a *K. pneumoniae*, *A. baumannii* és a *Staphylococcus aureus* fajokban találták meg. A mintáinkban ezek közül az *A. baumannii* fajt találtuk meg, legnagyobb számban a 3C_2019 mintában volt kimutatható, ahol az *aadA27*-gént is detektáltuk.

A szakirodalom alapján a rezisztencia terjedésének kockázata nagy mértékben csökkenthető a megfelelő karbantartás, a fertőtlenítő eljárások (UV, ózon) alkalmazásával. A legjobb eredményt a membrán technológia tudta elérni, ennek alkalmazása minimálisra csökkenti a kórokozók, illetve rezisztencia gének környezetbe jutását, ami előre vetíti hogy a szennyvíztisztó telepek korszerűsítése elengedhetetlen a jövőben.

A kutatás a Víztudományi és Vízbiztonsági Nemzeti Labor RRF-2.3.1-22-2022-00008 keretében készült.

- Agunbiade, Mayowa O., Carolina H. Pohl, és Anofi O. T. Ashafa. 2016. „A Review of the Application of Bioflocualnts in Wastewater Treatment”. *Polish Journal of Environmental Studies* 25 (4): 1381–89. <https://doi.org/10.15244/pjoes/61063>.
- Aminov, Rustam I. 2010. „A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future”. *Frontiers in Microbiology* 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>.
- Auerbach, Eric A., Erin E. Seyfried, és Katherine D. McMahon. 2007. „Tetracycline Resistance Genes in Activated Sludge Wastewater Treatment Plants”. *Water Research* 41 (5): 1143–51. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.045>.
- Cacace, Damiano, Despo Fatta-Kassinos, Celia M. Manaia, Eddie Cytryn, Norbert Kreuzinger, Luigi Rizzo, Popi Karaolia, és mtsai. 2019. „Antibiotic Resistance Genes in Treated Wastewater and in the Receiving Water Bodies: A Pan-European Survey of Urban Settings”. *Water Research* 162 (október): 320–30. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.06.039>.
- Chen, Feng, Guang-Guo Ying, Ling-Xiao Kong, Li Wang, Jian-Liang Zhao, Li-Jun Zhou, és Li-Juan Zhang. 2011. „Distribution and Accumulation of Endocrine-Disrupting Chemicals and Pharmaceuticals in Wastewater Irrigated Soils in Hebei, China”. *Environmental Pollution* 159 (6): 1490–98. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.03.016>.
- Chen, Ying, Chunxia Wang, és Zijian Wang. 2005. „Residues and Source Identification of Persistent Organic Pollutants in Farmland Soils Irrigated by Effluents from Biological Treatment Plants”. *Environment International* 31 (6): 778–83. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.05.024>.
- Courvalin, Patrice. 2006. „Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci”. *Clinical Infectious Diseases* 42 (Supplement_1): S25–34. <https://doi.org/10.1086/491711>.
- Crini, Grégorio, és Eric Lichtfouse. 2019. „Advantages and Disadvantages of Techniques Used for Wastewater Treatment”. *Environmental Chemistry Letters* 17 (1): 145–55. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0785-9>.
- Dinsdale, Elizabeth A., Robert A. Edwards, Dana Hall, Florent Angly, Mya Breitbart, Jennifer M. Brulc, Mike Furlan, és mtsai. 2008. „Functional Metagenomic Profiling of Nine Biomes”. *Nature* 452 (7187): 629–32. <https://doi.org/10.1038/nature06810>.
- Eghbalpoor, Fatemeh, Mehri Habibi, Omid Azizi, Mohammad Reza Asadi Karam, és Saeid Bouzari. 2019. „Antibiotic resistance, virulence and genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* in community- and hospital-acquired urinary tract infections in Iran”. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 66 (3): 349–66. <https://doi.org/10.1556/030.66.2019.006>.
- Fan, Nian-Si, Yu-Hui Bai, Jing Wu, Quan Zhang, Jin-Jin Fu, Wan-Ling Zhou, Bao-Cheng Huang, és Ren-Cun Jin. 2020. „A two-stage anammox process for the advanced treatment of high-strength ammonium wastewater: Microbial community and nitrogen transformation”. *Journal of Cleaner Production* 261 (július): 121148. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121148>.
- Fortier, Louis-Charles, és Ognjen Sekulovic. 2013. „Importance of Prophages to Evolution and Virulence of Bacterial Pathogens”. *Virulence* 4 (5): 354–65. <https://doi.org/10.4161/viru.24498>.
- Galushko, Alexander, és Jan Kuever. 2020. „Desulfovibrionaceae”. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–13. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00199.pub2>.
- García-Solache, Mónica, és Louis B. Rice. 2019. „The Enterococcus: A Model of

Adaptability to Its Environment". *Clinical Microbiology Reviews* 32 (2): e00058-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>.

Gupta, S., S. Satpati, S. Nayek, és D. Garai. 2010. „Effect of Wastewater Irrigation on Vegetables in Relation to Bioaccumulation of Heavy Metals and Biochemical Changes". *Environmental Monitoring and Assessment* 165 (1–4): 169–77. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-0936-3>.

Hey, G., A. Ledin, J. La Cour Jansen, és H. R. Andersen. 2012. „Removal of Pharmaceuticals in Biologically Treated Wastewater by Chlorine Dioxide or Peracetic Acid". *Environmental Technology* 33 (9): 1041–47. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.606282>.

Hussain, M. Iftikhar, Adele Muscolo, Muhammad Farooq, és Waqar Ahmad. 2019. „Sustainable Use and Management of Non-Conventional Water Resources for Rehabilitation of Marginal Lands in Arid and Semiarid Environments". *Agricultural Water Management* 221 (július): 462–76. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.04.014>.

Jabbari Shiadeh, Seyedeh Marzieh, Ali Pormohammad, Ali Hashemi, és Parnian Lak. 2019. „Global Prevalence of Antibiotic Resistance in Blood-Isolated Enterococcus Faecalis and Enterococcus Faecium: A Systematic Review and Meta-Analysis". *Infection and Drug Resistance* Volume 12 (szeptember): 2713–25. <https://doi.org/10.2147/IDR.S206084>.

Johnsborg, Ola, Vegard Eldholm, és Leiv Sigve Håvarstein. 2007. „Natural Genetic Transformation: Prevalence, Mechanisms and Function". *Research in Microbiology* 158 (10): 767–78. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.09.004>.

Johnston, Calum, Bernard Martin, Gwennaele Fichant, Patrice Polard, és Jean-Pierre Claverys. 2014. „Bacterial Transformation: Distribution, Shared Mechanisms and Divergent Control". *Nature Reviews Microbiology* 12 (3): 181–96. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>.

Kapoor, Garima, Saurabh Saigal, és Ashok Elongavan. 2017. „Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics: A Guide for Clinicians". *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* 33 (3): 300. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15.

Kapse, N. G., A. S. Engineer, V. Gowdaman, S. Wagh, és P. K. Dhakephalkar. 2019. „Functional annotation of the genome unravels probiotic potential of Bacillus coagulans HS243". *Genomics* 111 (4): 921–29. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.05.022>.

Kaviani, Rasoul, Iman Pouladi, Mohammad Niakan, és Reza Mirnejad. 2020. „Molecular Detection of Adefg Efflux Pump Genes and their Contribution to Antibiotic Resistance in Acinetobacter baumannii Clinical Isolates". *Reports of Biochemistry & Molecular Biology* 8 (4): 413–18.

Knisz, J., P. Shetty, R. Wirth, G. Maróti, T. Karches, I. Dalkó, M. Bálint, E. Vadkerti, és T. Bíró. 2021. „Genome-Level Insights into the Operation of an on-Site Biological Wastewater Treatment Unit Reveal the Importance of Storage Time". *Science of The Total Environment* 766 (április): 144425. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144425>.

Lu, Jennifer, Florian P. Breitwieser, Peter Thielen, és Steven L. Salzberg. 2017. „Bracken: Estimating Species Abundance in Metagenomics Data". *PeerJ Computer Science* 3 (január): e104. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.104>.

Lu, Jennifer, és Steven L. Salzberg. 2018. „Removing Contaminants from Databases of Draft Genomes". Szerkesztette Fengzhu Sun. *PLOS Computational Biology* 14 (6): e1006277. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006277>.

Mancosu, Noemi, Richard Snyder, Gavriil Kyriakakis, és Donatella Spano. 2015. „Water Scarcity and Future Challenges for Food Production". *Water* 7 (12): 975–92. <https://doi.org/10.3390/w7030975>.

Mancuso, Giuseppe, Angelina Midiri, Elisabetta Gerace, és Carmelo Biondo. 2021. „Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens". *Pathogens* 10 (10): 1310. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>.

Mann, Brandon A, és James M Slauch. 1997. „Transduction of Low-Copy Number Plasmids

by Bacteriophage P22". *Genetics* 146 (2): 447–56. <https://doi.org/10.1093/genetics/146.2.447>.

Martínez, Sonia B., Jerónimo Pérez-Parra, és Ricardo Suay. 2011. „Use of Ozone in Wastewater Treatment to Produce Water Suitable for Irrigation". *Water Resources Management* 25 (9): 2109–24. <https://doi.org/10.1007/s11269-011-9798-x>.

Mazaheri Nezhad Fard, R., M.D. Barton, és M.W. Heuzenroeder. 2011. „Bacteriophage-Mediated Transduction of Antibiotic Resistance in Enterococci: Transduction in *Enterococcus* Spp." *Letters in Applied Microbiology* 52 (6): 559–64. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03043.x>.

McArthur, Andrew G., Nicholas Wagglechner, Fazmin Nizam, Austin Yan, Marisa A. Azad, Alison J. Baylay, Kirandeep Bhullar, és mtsai. 2013. „The Comprehensive Antibiotic Resistance Database". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (7): 3348–57. <https://doi.org/10.1128/aac.00419-13>.

„Meet the 6 Pathogens directly attributable to 73% of 1.27 million deaths | AMR". é. n. Elérés 2023. október 19. <https://antimicrobialresistancefighters.org/blog/meet-the-6-pathogens-directly-attributable-to-73-of-1-27-million-deaths>.

Ministry of Environmental Protection and Water Management. 2004. „Decree No. 28 of 2004 (XII. 25.) KvVM of the Ministry of Environmental Protection and Water Management concerning emission standards of water-pollutant substances and laying down rules of application. | UNEP Law and Environment Assistance Platform". 2004. <https://leap.unep.org/countries/hu/national-legislation/decreed-no-28-2004-xii-25-kvvm-ministry-environmental-protection>.

Moelants, N., G. Janssen, I. Smets, és J. Van Impe. 2008. „Field Performance Assessment of Onsite Individual Wastewater Treatment Systems". *Water Science and Technology* 58 (1): 1–6. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.325>.

Mulcahy, Heidi, Julie O’Callaghan, Eoin P. O’Grady, Claire Adams, és Fergal O’Gara. 2006. „The Posttranscriptional Regulator RsmA Plays a Role in the Interaction between *Pseudomonas Aeruginosa* and Human Airway Epithelial Cells by Positively Regulating the Type III Secretion System". *Infection and Immunity* 74 (5): 3012–15. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.5.3012-3015.2006>.

Muniesa, Maite, Marta Colomer-Lluch, és Juan Jofre. 2013. „Could Bacteriophages Transfer Antibiotic Resistance Genes from Environmental Bacteria to Human-Body Associated Bacterial Populations?" *Mobile Genetic Elements* 3 (4): e25847. <https://doi.org/10.4161/mge.25847>.

„Ökotech-Home Kft. – Biológiai szennyvíztisztító berendezések gyártása, telepítése." é. n. Elérés 2023. március 20. <https://okotechhome.hu/>.

Salyers, A A, N B Shoemaker, A M Stevens, és L Y Li. 1995. „Conjugative Transposons: An Unusual and Diverse Set of Integrated Gene Transfer Elements". *MICROBIOL. REV.* 59.

Santajit, Sirijan, és Nitaya Indrawattana. 2016. „Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens". *BioMed Research International* 2016: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>.

Schmieger, Horst, és Petra Schicklmaier. 1999. „Transduction of Multiple Drug Resistance of *Salmonella Enterica* Serovar *Typhimurium* DT104". *FEMS Microbiology Letters* 170 (1): 251–56. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13381.x>.

Shchegolkova, Nataliya M., George S. Krasnov, Anastasia A. Belova, Alexey A. Dmitriev, Sergey L. Kharitonov, Kseniya M. Klimina, Nataliya V. Melnikova, és Anna V. Kudryavtseva. 2016. „Microbial Community Structure of Activated Sludge in Treatment Plants with Different Wastewater Compositions". *Frontiers in Microbiology* 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00090>.

Sun, Ke, Ye Zhao, Bo Gao, Xitao Liu, Zheyun Zhang, és Baoshan Xing. 2009. „Organochlorine Pesticides and Polybrominated Diphenyl Ethers in Irrigated Soils of Beijing,

China: Levels, Inventory and Fate”. *Chemosphere* 77 (9): 1199–1205.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.016>.

Torsvik, V, K Salte, R Sørheim, és J Goksøyr. 1990. „Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria”. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (3): 776–81. <https://doi.org/10.1128/aem.56.3.776-781.1990>.

Wales, Andrew, és Robert Davies. 2015. „Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens”. *Antibiotics* 4 (4): 567–604.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics4040567>.

Wang, Qing-Ren, Yan-Shan Cui, Xiu-Mei Liu, Yi-Ting Dong, és Peter Christie. 2003. „Soil Contamination and Plant Uptake of Heavy Metals at Polluted Sites in China”. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 38 (5): 823–38. <https://doi.org/10.1081/ESE-120018594>.

Wood, Derrick E, és Steven L Salzberg. 2014. „Kraken: Ultrafast Metagenomic Sequence Classification Using Exact Alignments”. *Genome Biology* 15 (3): R46.
<https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>.

Xu, Jian, Laosheng Wu, Weiping Chen, Pingping Jiang, és Andrew Chia-Shing Chang. 2009. „Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs), and Endocrine Disrupting Compounds (EDCs) in Runoff from a Potato Field Irrigated with Treated Wastewater in Southern California”. *Journal of Health Science* 55 (2): 306–10.
<https://doi.org/10.1248/jhs.55.306>.

Zechner, E. L., F. De La Cruz, R. Eisenbrandt, A. M. Grahm, G. Koraimann, E. Lanka, G. Muth, W. Pansegrau, C. M. Thomas, és B. M. Wilkins. 2000. „Conjugative-DNA transfer processes”. *The horizontal gene pool. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands*, 87–174.

Zhang, Lei, Zhen Shen, Wangkai Fang, és Guang Gao. 2019. „Composition of bacterial communities in municipal wastewater treatment plant”. *Science of The Total Environment* 689 (november): 1181–91. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.432>.

Zhou, Lijie, Pingxiang Ou, Bikai Zhao, Wenyu Zhang, Ke Yu, Kang Xie, és Wei-Qin Zhuang. 2021. „Assimilatory and dissimilatory sulfate reduction in the bacterial diversity of biofoulant from a full-scale biofilm-membrane bioreactor for textile wastewater treatment”. *Science of The Total Environment* 772 (június): 145464.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145464>.

8 MELLÉKLETEK JEGYZÉKE

1. melléklet: Az OEK által, a monitor rendszerben 2017. évben jelentett *Enterococcus spp.* izolátumok antibiotikum érzékenysége
2. melléklet: Az OEK által, a monitor rendszerben 2017. évben jelentett *Staphylococcus aureus* izolátumok antibiotikum érzékenysége
3. melléklet: Az OEK által, a monitor rendszerben 2017. évben jelentett MRSA izolátumok antibiotikum érzékenysége
4. melléklet: Az OEK által, a monitor rendszerben 2017. évben jelentett *K. pneumoniae* izolátumok antibiotikum érzékenysége
5. melléklet: Az OEK által, a monitor rendszerben 2017. évben jelentett *A. baumannii* izolátumok antibiotikum érzékenysége
6. melléklet: Az OEK által, a monitor rendszerben 2017. évben jelentett *Pseudomonas aeruginosa* izolátumok antibiotikum érzékenysége
7. melléklet: Az OEK által, a monitor rendszerben 2017. évben jelentett *Escherichia coli* izolátumok antibiotikum érzékenysége
8. melléklet: Mikrobiológiai referencia laboratóriumba küldendő mikrobiológiai vizsgálati minták, izolált kórokozók II. és IV. pont Multirezisztens kórokozók jegyzéke

A monitor rendszerben 2017. évben jelentett *Enterococcus* spp. izolátumok antibiotikum érzékenysége

Antibiotikum	Ampicillin	Gentamicin (High level)	Streptomycin (High level)	Vancomycin	Teicoplanin	Linezolid	Tigecyclin
--------------	------------	----------------------------	------------------------------	------------	-------------	-----------	------------

Enterococcus faecalis

Érzékeny (%)	98,9	68,3	62,8	99,8	99,5	99,8	99,9
Mérsékelt (%)	0,0	-	-	0,0	0,0	0,0	0,0
Rezisztens (%)	1,1	31,7	37,2	0,2	0,5	0,2	0,1
Törzs (beteg)	32170	35683	9375	34215	11021	6976	10990

Enterococcus faecium

Érzékeny (%)	2,1	43,0	34,7	71,5	61,7	99,8	99,3
Mérsékelt (%)	0,0	-	-	0,0	-	0,0	0,3
Rezisztens (%)	97,9	57,0	65,3	28,5	38,3	0,2	0,4
Törzs (beteg)	2988	3741	1490	3781	1847	1824	2010

2. melléklet

A monitor rendszerben 2017. évben jelentett *Staphylococcus aureus* izolátumok antibiotikum érzékenysége

Antibiotikum	Penicillin	Oxacillin	Ciprofloxacin	Moxifloxacin	Gentamicin	Tobramycin	Amikacin	Erythromycin	Clindamycin	Vancomycin	Teicoplanin	Rifampicin	Tetracyclin	Quinupristin\ndalfopristin	Linezolid	Mupirocin	Sumetrolim	Tigecyclin	Fuzidinsav
--------------	------------	-----------	---------------	--------------	------------	------------	----------	--------------	-------------	------------	-------------	------------	-------------	----------------------------	-----------	-----------	------------	------------	------------

Járóbeteg mintákból izolált törzsek

Érzékeny (%)	13,8	88,5	91,5	92,0	98,9	95,6	95,3	75,0	75,9	100,0	100,0	99,3	93,2	93,8	99,9	99,3	99,3	100,0	99,7
Mérsékelt (%)	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	6,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rezisztens (%)	86,2	11,5	8,5	7,9	1,1	4,4	4,7	25,0	24,0	0,0	0,0	0,7	6,8	0,0	0,1	0,7	0,7	0,0	0,3
Törzs (beteg)	11530	24755	22221	20039	25873	10523	6752	24418	25784	9158	6798	12515	16557	339	4982	9201	25684	12398	2634

Fekvőbeteg mintákból izolált törzsek

Érzékeny (%)	10,4	76,2	76,0	77,9	98,2	95,0	95,5	71,4	71,3	100,0	100,0	98,5	93,0	86,9	99,9	99,3	99,2	100,0	99,6
Mérsékelt (%)	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	12,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rezisztens (%)	89,6	23,8	23,9	22,0	1,8	5,0	4,5	28,5	28,6	0,0	0,0	1,4	7,0	1,1	0,1	0,7	0,8	0,0	0,4
Törzs (beteg)	12269	18873	16722	14402	19852	11985	9197	17894	19715	9071	5364	11890	15115	852	4960	7915	19385	11544	2136

3. melléklet

A monitor rendszerben 2017. évben jelentett MRSA izolátumok antibiotikum érzékenysége

Antibiotikum	Ciprofloxacín	Moxifloxacín	Gentamicin	Tobramycin	Amikacin	Erythromycin	Clindamycin	Vancomycin	Teicoplanin	Rifampicin	Tetracyclin	Quinupristin/ dalbopristin	Linezolid	Mupirocin	Sumetrolim	Tigecyclin	Fuzidinsav
--------------	---------------	--------------	------------	------------	----------	--------------	-------------	------------	-------------	------------	-------------	-------------------------------	-----------	-----------	------------	------------	------------

Járóbeteg mintákból izolált törzsek

Érzékeny (%)	48,0	51,0	95,6	82,0	76,3	19,6	20,3	100,0	99,9	97,7	88,5	100,0	99,8	98,7	98,8	100,0	98,4
Mérsékelt (%)	0,0	0,1	0,0	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Rezisztens (%)	52,0	48,9	4,4	18,0	23,3	80,4	79,7	0,0	0,1	2,2	11,5	0,0	0,2	1,2	1,2	0,0	1,6
Törzs (beteg)	2486	2311	2830	1434	765	2728	2804	1850	1220	2516	2602	278	657	1955	2825	2366	447

Fekvőbeteg mintákból izolált törzsek

Érzékeny (%)	14,6	17,7	94,8	84,4	86,6	25,0	24,2	100,0	99,9	95,9	91,5	99,7	99,9	99,0	98,5	100,0	99,2
Mérsékelt (%)	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Rezisztens (%)	85,4	82,0	5,2	15,6	13,4	74,9	75,8	0,0	0,1	4,0	8,5	0,2	0,1	1,0	1,5	0,0	0,8
Törzs (beteg)	3831	3130	4438	2629	2013	4089	4409	3276	1632	3682	3766	600	1816	2613	4356	3172	829

4. melléklet

A monitor rendszerben 2017. évben jelentett *Klebsiella* spp. izolátumok antibiotikum érzékenysége

Antibiotikum	Amoxicillin/ clav.sav	Piperacillin/ tazobactam	Imipenem	Meropenem	Ertapenem	Cefuroxim	Cefotaxim	Ceftriaxon	Ceftazidim	Cefepim	Ciprofloxacim	Levofloxacim	Gentamicin	Tobramycin	Amikacin	Sumetrolim
--------------	--------------------------	-----------------------------	----------	-----------	-----------	-----------	-----------	------------	------------	---------	---------------	--------------	------------	------------	----------	------------

Klebsiella pneumoniae

Érzékeny (%)	68,4	63,5	99,5	99,4	99,2	70,9	74,4	71,6	71,1	68,2	71,7	75,0	85,2	71,0	71,1	70,8
Mérsékelt (%)	-	6,2	0,2	0,3	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,1	0,3	18,7	0,1
Rezisztens (%)	31,6	30,3	0,3	0,3	0,6	29,1	25,5	28,4	28,8	31,5	27,8	24,3	14,7	28,7	10,2	29,1
Törzs (beteg)	17747	8545	11841	11334	13877	16971	9838	15030	15882	8193	17322	8097	17196	10366	9645	17070

Klebsiella egyéb

Érzékeny (%)	89,4	91,3	100,0	99,9	99,9	91,3	92,8	92,9	93,3	94,3	92,4	92,5	96,3	95,3	94,8	90,6
Mérsékelt (%)	-	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,3	3,8	0,0
Rezisztens (%)	10,6	8,0	0,0	0,1	0,1	8,7	7,1	7,1	6,6	5,5	7,4	7,3	3,6	4,4	1,4	9,4
Törzs (beteg)	6617	3452	4046	3949	5333	6189	4620	5837	5973	3308	6406	4289	6493	3819	3438	6372

A monitor rendszerben 2017. évben jelentett *Acinetobacter* spp. izolátumok antibiotikum érzékenysége

Antibiotikum	Imipenem	Meropenem	Ciprofloxacín	Levofloxacín	Gentamicin	Tobramycin	Amikacin	Sumetrolim
--------------	----------	-----------	---------------	--------------	------------	------------	----------	------------

<i>Acinetobacter baumannii</i>								
Érzékeny (%)	32,2	28,2	18,4	21,1	28,4	62,4	46,2	21,2
Mérsékelt (%)	0,9	3,2	0,0	0,1	-	-	0,0	0,3
Rezisztens (%)	66,9	68,6	81,6	78,8	71,6	37,6	53,8	78,5
Törzs (beteg)	3288	3328	3308	2164	3320	3281	3083	2274

<i>Egyéb Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i> complex-be tartozó specíesek (<i>A. pittii</i>, <i>A. nosocomialis</i>, <i>A. calcoaceticus</i>)								
Érzékeny (%)	88,2	86,4	78,3	82,7	83,9	86,0	84,9	71,3
Mérsékelt (%)	0,5	1,3	-	0,8	0,0	-	0,0	1,2
Rezisztens (%)	11,3	12,3	21,7	16,5	16,1	14,0	15,1	27,5
Törzs (beteg)	450	448	451	260	453	451	443	411

<i>Acinetobacter egyéb</i>								
Érzékeny (%)	94,1	91,8	83,8	84,2	88,2	88,2	87,4	82,5
Mérsékelt (%)	0,7	2,0	-	0,6	-	-	1,9	0,4
Rezisztens (%)	5,2	6,2	16,2	15,2	11,8	11,8	10,7	17,1
Törzs (beteg)	1244	1299	1097	890	1320	1289	1055	1134

6. melléklet

A monitor rendszerben 2017. évben jelentett *Pseudomonas aeruginosa* izolátumok antibiotikum érzékenysége

Antibiotikum	Piperacillin/ tazobactam	Imipenem	Meropenem	Ceftazidim	Cefepim	Ciprofloxacin	Gentamicin	Tobramycin	Amikacin
Érzékeny (%)	80,6	73,4	73,7	82,3	85,9	78,3	85,5	87,3	89,1
Mérsékelt (%)	-	1,7	3,7	-	-	0,6	-	-	4,7
Rezisztens (%)	19,4	24,9	22,6	17,7	14,1	21,1	14,5	12,7	6,2
Törzs (beteg)	18159	18099	18042	18238	17743	17927	18271	18102	17379

7. melléklet

A monitor rendszerben 2017. évben jelentett *Escherichia coli* izolátumok antibiotikum érzékenysége

Antibiotikum	Ampicillin	Amoxicillin/ clav.sav	Piperacillin/ Tazobactam	Imipenem	Meropenem	Ertapenem	Cefuroxim	Cefotaxim	Ceftriaxon	Ceftazidim	Cefepim	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Gentamicin	Tobramycin	Amikacin	Sumetrolim	Tigecyclin
Érzékeny (%)	50,2	77,2	79,4	100,0	100,0	99,9	89,0	89,2	90,4	89,5	88,2	79,8	79,6	94,0	90,6	91,1	75,5	99,8
Mérsékelt (%)	0,0	-	7,1	0,0	0,0	0,1	-	0,1	0,0	0,5	1,0	0,3	0,2	0,3	0,4	5,9	0,1	0,1
Rezisztens (%)	49,8	22,8	13,5	0,0	0,0	0,0	11,0	10,7	9,6	10,0	10,8	19,9	20,2	5,7	9,0	3,0	24,4	0,1
Törzs (beteg)	79537	84074	30220	33721	35740	59174	80558	45328	70076	68039	28629	82256	39576	80283	32008	27816	82419	10744

8. melléklet

18/1998. (VI.3.) NM rendeletéhez (21/2012. (IV.4.) NEMFI rendelet 3. melléklete alapján) 6. számú melléklet: Mikrobiológiai referencia laboratóriumba küldendő mikrobiológiai vizsgálati minták, izolált kórokozók II. és IV. pont Multirezisztens kórokozók jegyzéke (zárójelben a Nemzeti Nozokomiális Surveillance Rendszer-ben található MRK rövidítés látható):

Izolált baktérium törzsek:

1) cerebrospinalisfolyadékból, hemokultúrából

Gram-pozitív baktériumok:

methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA)

vancomycin rezisztens *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* (VRE)

Gram-negatív baktériumok:

Szerzett 3. generációs cefalosporin rezisztenciával rendelkező *Enterobacteriaceae* izolátumok közül:

- ESBL-termelő *Klebsiella pneumoniae* (MKLE)
- ESBL-termelő *Escherichia coli* (MECO)
- ESBL-termelő *Enterobacter cloacae* (MENB)
- AmpC-termelő *Klebsiella pneumoniae* (MKLE)

Multirezisztens *Pseudomonas aeruginosa* (A felsorolt antipseudomonas hatású szerek közül kettőre vagy kevesebbre érzékeny: piperacillin/tazobactam, ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem, ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin) (MPAE)

Karbapenemekkel (imipenem, meropenem) szemben rezisztens *Acinetobacter baumannii* (MACI) Karbapenemekkel (imipenem, meropenem) szemben nem-érzékeny *Enterobacteriaceae* (kivéve csak

imipenem nem-érzékeny *Proteaceae*) (CRE és CRKL)

Trimethoprim-sulfamethoxazollal szemben rezisztens *Stenotrophomonas maltophilia* (MSTM)

2) különleges rezisztenciával rendelkező baktériumok (bármilyen mintatípusból)

Gram-pozitív baktériumok:

Staphylococcus aureus:

- glikopeptidekkel szemben rezisztens *S. aureus* (GRSA, VRSA) (VISA)
- linezolid, quinupristin–dalfopristin, daptomycin vagy tigecyclin nem-érzékeny (rezisztens

vagy mérsékelten érzékeny) *S. aureus*

- területen szerzett MRSA (CA-MRSA)¹, illetve zoonotikus MRSA (LA-MRSA)² gyanú esetében (MRSA)

Enterococcus faecalis, *E. faecium*:

- rezisztens a következő antibiotikumok valamelyikére: linezolid, daptomycin, vagy tigecyclin
- Vancomycin rezisztens *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* (VRE)

Gram-negatív baktériumok:

Enterobacteriaceae:

- AmpC-termelő *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-termelés mellett is) (MKLE)
- ESBL-termelő *Salmonella enterica*, ESBL-termelő *Shigella* spp.
- karbapenemáz-termelő *K. pneumoniae*³ (CRKL)
- karbapenemáz-termelésre gyanús, Hodge-teszt pozitív egyéb Enterobacteriaceae³ (CRE)
- karbapenemázt nem termelő, de karbapenemekkel (imipenem és/vagy meropenem) szemben nem-érzékeny *K. pneumoniae* (CRKL)
- colistin rezisztens Enterobacteriaceae (kivéve *Serratia* sp., Proteaceae)

Pseudomonas aeruginosa:

- ceftazidim, cefepim nem-érzékeny ÉS karbapenem rezisztens
- karbapenemáz-termelő (pl. Hodge-teszt pozitív)
- colistin rezisztens *Acinetobacter* sp.:

¹Magyarországon izolált közösségben szerzett CA-MRSA gyanús izolátumok mikrobiológiai sajátosságai; Mikrobiológiai körlevél, VIII. évfolyam, 4. szám: Újabb PVL-pozitív MRSA klónok megjelenése hazánkban; Epiinfo, 15. évf. 13. heti száma: Multirezisztens, területen szerzett MRSA (CA-MRSA) törzsek gyakoribb előfordulása napjainkban (letölthető elektronikus változatban a www.oek.hu honlapról)

²LA-MRSA-ról további információ: Mikrobiológiai körlevél, X. évfolyam, 4. szám: Zoonotikus CA-MRSA törzsek megjelenése Magyarországon (letölthető elektronikus változatban a www.oek.hu honlapról)

³Epiinfo, 18. évf. 47. szám: Az OEK ajánlása a karbapenemáz-termelő Enterobacteriaceae törzsek azonosítására és terjedésük megelőzésére az egészségügyi intézményekben (letölthető elektronikus változatban a www.oek.hu honlapról)