

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Vadmadarak szerepe az antibiotikum  
rezisztencia terjedésében**

Nagy József Bálint

Témavezető: Dr. Kardos Gábor



**DEBRECENI EGYETEM**  
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2024

# **Vadmadarak szerepe az antibiotikum rezisztencia terjedésében**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
a Gyógyszerészeti Tudományok tudományágban\*

Írta: Nagy József Bálint okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája mikrobiológia programja keretében

Témavezető: Dr. Kardos Gábor, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Knop Renáta, PhD  
Prof. Dr. Urbán Edit, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikó, PhD  
tagok: Dr. Dr. Knop Renáta, PhD  
Prof. Dr. Urbán Edit, az MTA doktora  
Dr. Fehér Enikő, PhD  
Dr. Ujhelyi Zoltán, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem, ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület, 2024. május 30.  
13 óra

## Bevezetés

Az Enterobacterales családba tartozó baktériumok a nozokomiális és közösségben szerzett fertőzések gyakori kórokozói. E fertőzések kezelése gyakran 3. generációs cefalosporinokkal történik, de a kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) -termelő törzsek világméretű elterjedése csökkentette e szerek hatékonyságát, így gyakran olyan utolsó vonalbeli szereket alkalmaznak, mint a karbapenemek, ennek következményeként pedig a karbapenem rezisztens Enterobacterales (CRE) törzsek előfordulása ugrásszerűen megnövekedett. Az antibiotikum rezisztencia azonban nem csak az embereket érinti. Az „Egy egészség” elv alapján az emberek, az állatok és a környezet egészsége összefügg, és szoros körforgásban van egymással, ez a megközelítés pedig az antibiotikum rezisztencia terjedésére is igaz, amire jó példa az *mcr* gén megjelenése a kolisztin alkalmazás hatására. Az *Escherichia coli* jó példa az Egy egészség elv szempontjából, mivel az emberi és állati bél mikrobiom tagja illetve a környezetben is sokáig képes életben maradni. A különböző környezeti, emberi illetve állati eredetű törzsek a horizontális géntranszfer (HGT) segítségével átadhatnak egymásnak mobilis genetikai elemeket (MGE), tehát az Egy egészség elvnek megfelelően járványtani kapcsolatban állnak. A

zoonotikus vagy környezeti rezervoárok fontos forrásaiként szolgálhatnak újonnan megjelenő rezisztencia géneknek, mint például a *Kluyvera* fajok a *bla<sub>CTX-M</sub>* géneknek vagy a *Shewanella* fajok a *bla<sub>OXA-48</sub>* géncsaládnak. Az egészségügy és az állattenyésztés általi óriási mértékű antibiotikum felhasználás oda vezetett, hogy a környezet antibiotikumokkal, rezisztencia génekkel és rezisztens humán patogén baktériumokkal szennyezetté vált. Azok a vadállatok, amelyek szeméttelpek, szennyvízzel szennyezett felszíni vizek vagy állattartó telepek közelében élnek megfertőződhetnek rezisztens baktériumokkal, így a rezisztencia gének hordozóivá válhatnak. Ha ez megtörténik, felmerül annak a lehetősége, hogy ezek az állatok -különösen a nagy mobilitású fajok- akár az egész világon keresztül terjesszék a rezisztenciát, ami magyarázná a rezisztencia jelenlétét az emberei tevékenységtől illetve antibiotikum felhasználástól távol eső földrajzi területeken. A mindenevő, húsevő és antropofil életmódot folytató vadállatok vannak leginkább kitéve a rezisztens törzsekkel való megfertőződés veszélyének. A varjak és sirályok gyakran megtalálhatóak a városokban, az ürülékük pedig folyamatosan szennyezi a különböző városi területeket, vándorló és kóborló viselkedésüknek köszönhetően ezek a madarak rezervoárként és hosszú-távú vektorokként is szolgálhatnak a rezisztens törzsek és a rezisztencia gének számára egyaránt.

## Célkitűzés

Kutatásunk fő célja különböző, Magyarországon telelő vándorló illetve kóborló madarak által hordozott ESBL-termelő és/vagy karbapenem rezisztens Enterobacterales epidemiológiájának vizsgálata volt az Egy egészség elv tükrében, amihez a madaraktól származó törzseket hasonlítottuk össze lokális humán és/vagy környezeti törzsekkel. és az alábbiakat tűztük ki célul:

Megvizsgálni a téli időszakban a Debreceni Egyetem Klinikai Központ, Nagyerdei Campus területének fáin gyülekező vetési varjakban az ESBL-termelő Enterobacterales és a humán tünetmentesen hordozott ESBL-termelő *E. coli* prevalenciáját.

Jellemezni a madaraktól, a klinika betegeiből származó illetve a tünetmentesen hordozott humán eredetű ESBL-termelő *E. coli* izolátumokat és összehasonlítani őket egymással a lehetséges járványtani kapcsolatok feltárására.

Megvizsgálni a CRE prevalenciáját a Duna budapesti szakaszán nagy számban előforduló dankasirályokban illetve meghatározni a CRE jelenlétét a Dunában.

Jellemezni a gyűjtött sirály, dunai és a Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központ Nemzeti Referencia Laboratóriumából származó karbapenem rezisztens

*E. coli* (CREc) törzseket majd összehasonlítani azokat egymással.

Egy olyan komplex munkát létrehozni, ami egyrészt hiánypótlóan vizsgálja hazánkban a vadmadarak által hordozott antibiotikum rezisztens baktériumok járványtanát, másrészt egyszerre vizsgálja és hasonlítja össze különböző forrásokból származó antibiotikum rezisztens baktériumok epidemiológiáját az Egy egészség elv megközelítés összefüggésében.

## **Anyagok és módszerek**

### **Minták és baktérium törzsek**

2016. október és 2017. március között vetési varjakból 112 mintát, 2455 széklettenyésztésre küldött humán széklet mintát és 42 invazív humán klinikai mintából származó ESBL-termelő *E. coli* izolátumot gyűjtöttünk összehasonlítás céljából. 2019. és 2020. január és március között 122 és 105 mintát gyűjtöttünk dankasirályokból. Mindkét madárfaj esetében a mintavételezés az intézményi irányelveknek megfelelően, a helyi és nemzeti előírások betartásával a legkevésbé invazív módon történt. A Dunából 2019-ben és 2020-ban is 12-12-t, hatot-hatot a Budapest feletti és hatot-hatot a Budapest utáni szakaszokból. Ehhez kaptunk még 21, a Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központba küldött és/vagy ott gyűjtött humán CREc izolátumot összehasonlításra.

A madaraktól vett és a széklettenyésztésre küldött mintákat 2 mg/l cefotaximmal kiegészített eozin-metilénkék táptalajokra szélesztettük. A vízi mintákat Colilert-18/Quanti-Tray teszttel (IDEXX Laboratories, Westbrook, USA) dolgoztuk fel, ami 10mg/l cefotaximmal volt kiegészítve. A baktériumok faj szintű azonosítása mátrix asszociált lézer deszorpciós/ionizációs (MALDI-TOF) (Bruker, Bremen, Germany)

tömegspektrométerrel történt. Minden Gram-negatív bélbaktériumot tovább vizsgáltunk korongdiffúziós módszerrel a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) aktuális évi ajánlása alapján a következő antibiotikumokra: ertapenem, meropenem, imipenem, cefotaxim, ceftazidim, cefepim, amoxicillin-klavulánsav, ceftazidim-avibaktám, ciprofloxacín, amikacin, gentamicin, tobramycin, foszfomicin, tigeciklin és co-trimoxazol. Az izolátumok kolisztin iránti érzékenységének meghatározását leves-hígításos módszerrel (MERLIN Diagnostika GmbH, Németország) végeztük. Az ESBL-termelést kettős korong teszttel, a karbapenem rezisztencia típusokat MASTDISCS Combi Carba Plus teszttel (Mast Group Ltd, UK) határoztuk meg.

### **Rezisztencia gének kimutatása**

Az ESBL fenotípusú törzsekben a *bla<sub>SHV</sub>* és *bla<sub>CTX-M-1,-2,-8,-9</sub>* alcsoport gének jelenlétét Pitout és mtsai által leírt polimeráz lánreakció (PCR) módszerekkel vizsgáltuk. Az amplikonokat QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével tisztítottuk ki a gyártó utasításait követve és szekvenálással (Macrogen, Amszterdam, Hollandia) vizsgáltuk. A szekvenciákat CLC Main Workbench (CLC Bio, Aarhus, Dánia) segítségével elemeztük. A karbapenemáz-

termelő törzsek esetében a *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> és *bla*<sub>OXA-48-szerű</sub> gének jelenlétét Poirel és mtsai által leírt multiplex PCR-ekkel vizsgáltuk. Az *mcr-1-5* gének vizsgálatát Rebelo és mtsai által kifejlesztett multiplex PCR-el végeztük.

### **Tipizálás**

Az *E. coli* izolátumok filocsoportjainak meghatározására a Clermont és mtsai által kifejlesztett multiplex PCR-t használtuk. A pandémiás ST131 klón és kládjainak kimutatására a Matsumura és mtsai által kidolgozott primereket használtuk. Az enterovirulens *E. coli* patotípusainak meghatározására Persson és mtsai által kifejlesztett multiplex PCR-t alkalmaztunk.

### **Pulzáló-mezejű gél elektroforézis (PFGE)**

A varjú, széklet és klinikai izolátumok közötti epidemiológiai kapcsolatok feltárása PFGE-vel történt. A makrorestrikciót XbaI (Fermentas, Vilnius, Lithuania) enzimmel végeztük 1%-os SeaKem Gold agarózban (Lonza). A kapott mintázatokat Fingerprinting II szoftver (Bio-Rad) segítségével elemeztük.

### **Teljes genom szekvenálás (WGS)**

A PFGE alapján 20 izolátumot választottunk WGS-ra, a varjak által nagy számban hordozott pulzotípusokból illetve a varjú és

humán törzseket egyaránt tartalmazó pulzotípusokból. A CRE törzsek közül csak a szerzett karbapenem rezisztenciát hordozókat vizsgáltuk tovább WGS-sal. A genomi DNS-t DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Németország) segítségével nyertük ki a gyártó utasításait követve. A WGS-okat Nextera XT DNA Library Preparation Kit-et használva Illumina NextSeq500 platformon 150bp single-end vagy Illumina MiSeq platformon 150-bp paired-end szekvenálással hajtottuk végre. A kapott FASTQ fájlokat *de novo* szereltük össze Velvet (v1.0.0.) segítségével. A nyers readok a PRJNA693168 és a PRJNA807502 BioProject azonosítók alatt elérhetőek a Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (NCBI) adatbázisában. A kapott szekvenciák elemzéséhez core-genom multilókusz szekvencia tipizálást (cgMLST) végeztünk a SeqSphere+ szoftver segítségével (Ridom, Münster, Germany) az ‘*E. coli* cgMLST’ verzió 1.0 sémának megfelelően. A rezisztencia gének, plazmid replikon típusok és virulencia gének azonosítását a Center for Genomic Epidemiology oldalán elérhető ResFinder (v4.1), PlasmidFinder (v2.1) és VirulenceFinder (v2.0) adatbázisok segítségével végeztük. A karbapenem rezisztencia gént hordozó kontigokat a PROKKA (v1.13) szoftverrel annotáltuk, majd a Clinker segítségével létrehozott ábrák alapján vizsgáltuk a karbapenemáz gének közvetlen genetikai környezetét.

## Eredmények

### **A varjú eredetű ESBL-termelő *E. coli* izolátumok prevalenciája és jellemzői**

A vizsgált varjak 33%-a hordozott ESBL-termelő *E. coli*-t, a domináns ESBL gén pedig a *bla*<sub>CTX-M-55</sub> és *bla*<sub>CTX-M-27</sub> voltak. A fluorokinolon és co-trimoxazol rezisztencia gyakori volt, miközben az összes izolátum érzékeny volt a vizsgált aminoglikozidokkal szemben, 40%-uk érzékeny volt az összes vizsgált nem béta-laktám típusú antibiotikumra, köztük az összes *bla*<sub>CTX-M-15</sub> hordozó. Kettő CTX-M-27-termelő *E. coli* izolátum a pandémiás ST131 klónhoz tartozott, azon belül a C1-M27 alkládba. Az izolátumok 21%-a az intimint kódoló *eae* gént hordozta és ezek mindegyike CTX-M-27-termelő volt.

### **A székletből származó tünetmentesen hordozott ESBL-termelő *E. coli* izolátumok prevalenciája és jellemzői**

A tünetmentesen hordozott ESBL-termelő *E. coli* aránya 1,7% volt. A *bla*<sub>CTX-M-15</sub> és *bla*<sub>CTX-M-27</sub> gének fordultak elő legtöbbször. Az izolátumok körében gyakori volt a fluorokinolon, co-trimoxazol, amikacin, gentamicin és tobramycin elleni rezisztencia egyaránt. A törzsek 24%-a volt a három vizsgált nem béta-laktám antibiotikum csoportra

rezisztens, ezek közül nyolc CTX-M-15-termelő. Kettő, egy, egy és tíz tartozott az ST131 A, B, C2 és C1-M27 alkládjába.

### **A klinikai mintákból származó ESBL-termelő *E. coli* izolátumok jellemzői**

A leggyakoribb ESBL gének a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> *bla*<sub>CTX-M-27</sub> voltak, két izolátum a *bla*<sub>SHV-12</sub>-t hordozta. A korezisztencia szintek magasak voltak, az izolátumok 45%-a rezisztens volt fluorokinolonokra, co-trimoxazolra és aminoglikozidokra egyaránt, melyek a legtöbb esetben a CTX-M-15-termelők voltak. Az ST131-es izolátumok közül egy, kilenc és 16 a B, C2 és C1-M27 alkládokba tartozott.

### **A varjából, székletből és klinikai mintákból izolált ESBL-termelő *E. coli* törzsek összehasonlítása**

A varjú eredetű izolátumok esetében a *bla*<sub>CTX-M-55</sub>, míg mindkét humán gyűjteményben a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> volt volt a domináns ESBL gén, a második leggyakoribb pedig a *bla*<sub>CTX-M-27</sub> volt mindhárom minta populációban. A varjú-eredetű törzsek kisebb hányada volt rezisztens nem-béta-laktám típusú antibiotikumokra a humán törzsekhez viszonyítva. Azon izolátumok, melyek aminoglikozidokra, fluorokinolonokra és co-trimoxazolra is rezisztensek voltak általában *bla*<sub>CTX-M-1</sub> alcsoportba tartozó gént hordoztak, leggyakrabban *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-

öt a varjakat leszámítva, ahol a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> hordozók minden nem béta-laktámra érzékenyek voltak. A *bla*<sub>CTX-M-27</sub> hordozók rezisztensek voltak fluorokinolonokra és co-trimoxazolra, de aminoglikozidokra nem. A pandémiás ST131-es klón a varjakban és emberekben is egyaránt jelen volt és a C1-M27 volt a leggyakrabban előforduló alkklád. Az összes izolátum negatív volt az általunk vizsgált *mcr* génekre.

### **Az ESBL-termelő *E. coli* izolátumok molekuláris epidemiológiája**

A PFGE alapján néhány olyan klaszter fordult elő, ami humán és varjú izolátumokat is tartalmazott. Ezek közül a legnagyobb nyolc széklet, tíz klinikai és két varjú izolátumból állt és ezen izolátumok mindegyike az ST131-ba tartozott. A két varjú eredetű ST131-es izolátum PFGE profilja teljesen megegyezett a klinikai és tünetmentesen hordozott izolátumok profiljával. Egy kisebb klasztert is találtunk, amibe három klinikai, egy széklet és egy varjú izolátum tartozott, melyek mindegyike ST744-be tartozott. A humán eredetű ST744 izolátumok közeli rokonságban álltak egymással, viszont a varjú ST744-es izolátum távol állt ettől a klasztertől; a két ST131 C1-M27 varjú törzs teljesen megegyezett egymással (0 allél különbség) és közeli kapcsolatban álltak a vizsgált humán törzsekkel ( $\leq 7$  allél). Az ST744 varjú izolátum ötször annyi virulencia gént

hordozott, mint az a ST744-es klinikai és széklet izolátumok. Az ST24-es és ST162-es izolátumok is egyaránt nagyon hasonló genotípussal rendelkeztek és az allélok alapján számított távolság  $\leq 1$  volt mindkét ST-ba tartozó izolátumok esetében.

### **A 2019-ben és 2020-ban gyűjtött sirály eredetű CRE törzsek jellemzői**

A 2019-ben gyűjtött sirály minták 7,4%-ában találtunk CRE törzseket, ezek közül hat *E. coli*, egy *E. fergusonii* és két *Enterobacter cloacae* complex volt. A 2020-ban gyűjtött sirály minták esetében a CRE hordozási arány 6,7% volt, nyolc *E. coli*, egy *K. pneumoniae*, egy *Citrobacter* ssp. és egy *E. cloacae* complex fordult elő. Egy madárban több CRE izolátum is jelen volt. Az összes *Escherichia* izolátum metallo-béta-laktamáz (MBL)-termelő volt egy *E. coli* kivételével, ami a *bla<sub>OXA-181</sub>* gént hordozta. A leggyakoribb gén a *bla<sub>NDM-1</sub>* volt, a *bla<sub>VIM-4</sub>* minden esetben olyan izolátumokban fordult elő, ami *bla<sub>NDM-1</sub>*-et is hordozott. Az izolátumok több mint a fele hordozott valamilyen harmadik generációs cefalosporin rezisztencia gént, legtöbb esetben a *bla<sub>SHV-12</sub>*-t. Az OXA-181-termelő *E. coli* törzset leszámítva minden *Escherichia* izolátum rezisztens volt a karbapenemeken kívül az összes tesztelt béta-laktámra, fluorokinolonokra, aminoglikozidokra és co-trimoxazolra

egyaránt. Négy *E. coli* foszfomicinre is rezisztens volt és a *fosA3* vagy *fosL1* gének valamelyikét hordozták. Egy izolátum egy a *pmrB* régióban bekövetkezett mutációt (p.V161G) hordozott, azonban a kolisztinnel szembeni minimális gátló koncentráció (MIC) értéke 2 mg/l volt. Az *E. coli* izolátumok kilenc különböző ST-ba tartoztak: ST224 (2), ST226, ST372, ST744 (2), ST1437 (4), ST2772, ST8890, ST13079 és egy új ST. A 2019-es ST1437 izolátumok ugyanazzal a rezisztómmal és cgMLST profillal rendelkeztek, míg a 2020-ban gyűjtöttek rezisztencia mintázata hasonlított hozzájuk és 22-24 allél távolság volt közöttük. Az ST744-es izolátumok között nem volt kapcsolat. A két ST224-es izolátum 2019 és 2020-ból származott melyek hasonló rezisztencia mintázattal rendelkeztek és 24 allél távolság volt közöttük. Két *E. cloacae* complex izolátum karbapenem rezisztens, de nem karbapenemáz-termelő volt. A harmadik, amit a WGS után *E. kobei*-ként azonosítottunk az ST1001-be tartozott, a *bla<sub>VIM-1</sub>*-et hordozta és kolisztinre is rezisztens volt (MIC>64 mg/L), azonban nem találtunk olyan rezisztencia gént (*mcr-1-10*) vagy olyan ismert *PmrAB/PhoPQ* mutációt, ami ezt a fenotípust okozhatná. A *K. pneumoniae* izolátum az ST273-ba tartozott, foszfomicinre is rezisztens volt és a *fosA5* gént hordozta. A *Citrobacter* ssp.-t *C. braakii*-nak azonosítottuk, egy új ST-ba tartozott és az *mcr-9* gént hordozta, viszont a MIC értéke

kolisztinre 1 mg/L volt. A *K. pneumoniae* és a *C. braakii* is NDM-1-termelő volt.

### **A Dunából származó CRE izolátumok jellemzői**

Csak a 2020-ban a Budapest utáni szakaszából vett mintákban találtunk CRE törzset, hat mintából ötben összesen hét *E. coli*-t és egy *E. cloacae* komplexet. Az *E. cloacae* komplex nem karbapenemáz-termelő volt. Az összes *E. coli* MBL-típusú karbapenemázt hordozott, melyek közül három  $bla_{NDM-1}$ , három  $bla_{NDM-1} + bla_{VIM-4}$  és egy  $bla_{NDM-5}$  hordozót találtunk. Az összes izolátum rezisztens volt a vizsgált béta-laktámokra, fluorokinolonokra, co-trimoxazolra és aminoglikozidokra. A hét izolátumból hat ESBL vagy pAmpC gént is hordozott. Két izolátum továbbá foszfomicinre is rezisztens volt, melyek a *fosA3* illetve *fosA4* géneket hordozták. Mindegyik izolátum eltérő ST-ba tartozott (ST10, ST354, ST410, ST624, ST746, ST1303, ST1437).

### **Humán eredetű CREc izolátumok jellemzői**

A MBL-termelő (12/21) CRE törzsek fordultak elő leggyakrabban, genotípusok tekintetében pedig a következő géneket találtuk:  $bla_{NDM-1}$ ,  $bla_{VIM-4}$ ,  $bla_{OXA-48}$ ,  $bla_{NDM-5}$ ,  $bla_{KPC-3}$ ,  $bla_{OXA-244}$ ,  $bla_{NDM-7}$ ,  $bla_{OXA-181}$ . Két izolátum egyszerre hordozta a  $bla_{VIM-4}$  és  $bla_{OXA-48}$  géneket. Az izolátumok 71%-a, 76%-a,

71%-a, 38%-a és 76%-a volt rezisztens fluorokinolonokra, cotrimoxazolra, amikacinra, gentamicinre és tobramycinre. ESBL/pAmpC gének az izolátumok nagy részében voltak jelen és a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> volt a leggyakoribb. Egy izolátum az *mcr-9* gént hordozta, azonban a MIC értéke kolisztinre 0,125 mg/L volt. A vizsgált CREc izolátumok a következő ST-okba tartoztak: ST38, ST69, ST73, ST88, ST131, ST405, ST410, ST448, ST617, ST648, ST1011. Az ugyanabba a ST-ba tartozó izolátumok (ST38, ST69, ST73, ST405) nagyban hasonlítottak és közeli rokonságban is álltak egymással (15,8,1,1 allélnyi távolság) az ST131 izolátumok kivételével. A *bla*<sub>NDM-5</sub> hordozó ST410 izolátumok ugyanolyan rezisztommal rendelkeztek és nulla allél távolság volt közöttük.

### **A sirályokból, Dunából és emberekből származó CREc izolátumok összehasonlítása**

A *bla*<sub>NDM-1</sub> volt a leggyakoribb gén mindegyik minta csoportban. Míg a sirály és dunai izolátumokban a *bla*<sub>VIM-4</sub> kizárólag *bla*<sub>NDM-1</sub>-el együtt fordult elő, addig a humán izolátumokban *bla*<sub>OXA-48</sub>-al, vagy pedig egyedül volt jelen. Összességében az ESBL/pAmpC gének gyakran előfordultak; humán izolátumokban a *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, míg a sirály és dunai izolátumokban a *bla*<sub>SHV-12</sub> volt a leggyakoribb. Foszfomicin rezisztens izolátumok csak a Dunából és sirályokból származó

mintákban (2019 és 2020 is) fordultak elő és a *fosA3* volt a legtöbbször azonosított gén. Tigeciklin és kolisztin rezisztens izolátumok nem voltak jelen egyik mintacsoportban sem. A 42 *E. coli* izolátum 25 különböző ST-ba tartozott és alapjában véve eltérő ST-ú törzseket találtunk a sirályokban, Dunában és emberekben. Az ST1437 a Dunában és sirályokban is jelen volt, mindkét mintavételi időszakban; a 2019-ben gyűjtöttek azonosak voltak (nulla allél különbség, egyező rezisztencia mintázat), míg hozzájuk képest a 2020-ban gyűjtöttek és a dunai izolátum 22-24 allélnyi távolságokra voltak minimális eltérésekkel a rezisztencia profiljukban. NDM-5-termelő ST410 izolátumok emberekben és a Dunában is jelen voltak: a vízi izolátum 46 allél távolságra volt a humán izolátumoktól de hasonló rezisztencia profillal rendelkezett. A vizsgált izolátumokban bizonyos rezisztencia gének mindig ugyanazon a kontigon voltak megtalálhatóak, igaz volt ez a *bla<sub>NDM-1</sub>* és *aph(3')-VI* génekre a vízi és sirály izolátumokban illetve a *bla<sub>VIM-4</sub>* és *aac(6')-Ib-cr* génekre az összes *bla<sub>VIM-4</sub>* hordozó izolátumban. A *bla<sub>OXA-181</sub>* és *qnrS1* gének valamint az IncX3 replikonok szintén ugyanazon a kontigokon fordultak elő a humán és sirály izolátumokban is. A *bla<sub>NDM</sub>* gének közvetlen genetikai környezete alapvetően két féle volt: *dsbD-trpF-bleMBL- bla<sub>NDM-1/5/7</sub>* vagy *bla<sub>NDM-1</sub>-ISAba125-aph(3')-VIa*.

## Megbeszélés

A vizsgált varjakban a *bla*<sub>CTX-M-55</sub> és *bla*<sub>CTX-M-27</sub> gének fordultak elő leggyakrabban. A *bla*<sub>CTX-M-55</sub> Európában ritkán, míg Délkelet-Ázsiában nagyon gyakran előforduló gén emberekben és azt feltételezik, hogy haszonállatokban jelent meg először és terjedt tovább. A haszonállatok ürülékét gyakran használják szántóföldek trágyázására, az ott táplálékot kereső varjak így megfertőződhetnek *bla*<sub>CTX-M-55</sub> hordozó törzsekkel, ami jól mutatja az Egy egészség elv fontosságát a rezisztencia terjedésében is. Korábban a *bla*<sub>CTX-M-15</sub> és a *bla*<sub>CTX-M-14</sub> voltak a domináns ESBL gének Ázsiában, azonban a közelmúltban a *bla*<sub>CTX-M-55</sub> vált a leggyakoribb ESBL génné az emberi és állati törzsekben egyaránt, míg a *bla*<sub>CTX-M-27</sub> elkezdte felváltani a *bla*<sub>CTX-M-14</sub>-et. Jelen munkánkban a *bla*<sub>CTX-M-55</sub> IncN replikonokkal volt összefüggésben, ami irodalmi adatok alapján gyakran hordoz különböző ESBL géneket, de ritkán *bla*<sub>CTX-M-55</sub>-öt. Ez az új kapcsolat illetve az ST162-ben való megjelenése egy új utat nyithat a *bla*<sub>CTX-M-55</sub> terjedésének Ázsiában, valamint Ázsiából Európa felé a madárvonulással. Ezek alapján Ázsiában az ESBL gének járványtanában bekövetkezett változások okozhatták az általunk vizsgált varjakban talált ESBL gének eltérését a korábbi tanulmányok eredményeihez képest, ahol a *bla*<sub>CTX-M-1</sub> és *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gének domináltak.

Az összes ST24 törzs CTX-M-27-termelő volt, melyek mindegyike az *eae* gént hordozta, ami az enteropatogén *E. coli* (EPEC) egyik fő virulencia faktorát kódolja, de a *bfp* gén hiánya alapján ezek atipikus EPEC törzsek lehetnek, amelyek képesek lehetnek akár emberekben is fertőzések okozására. ESBL-termelő ST162 törzsek már korábban is előfordultak Európában telelő varjakban, viszont a mi eredményeinkhez képest jóval alacsonyabb prevalenciával, illetve nem *bla*<sub>CTX-M-55</sub> hordozókként. A varjú ST744 izolátum a virulencia génkészlete alapján pedig feltehetően egy madárpatógén *E. coli* (APEC) törzs, ami a fő kórokozója a madár kólibacillózis fertőzésnek világszerte, ezért a különböző APEC törzseket hordozó vad madarak komoly veszélyforrást jelenthetnek a baromfitenyésztésre, különös tekintettel arra, hogy ez a törzs rezisztens volt béta-laktámokra és fluorokinolonokra is. Ezek a jelenségek aggodalomra adnak okot, egyrészt a kommenzális multirezisztens törzsek emberi populációban való terjedésének, másrészt e törzsek által hordozott antibiotikum rezisztencia gének más, nem-kommenzális, patogén törzsek felé történő terjedésének lehetősége miatt.

A *bla*<sub>CTX-M-15</sub> maradt a domináns ESBL gén a humán izolátumokban, mellette a *bla*<sub>CTX-M-27</sub> vált a második leggyakoribb ESBL génné jelen tanulmányban, ez a változás

pedig Magyarországon más kórházakban is megfigyelhető volt. A CTX-M-15 termelő ST131 *E. coli* prevalenciája csökkent, míg a C1-M27 előfordulása ugrásszerűen megnőtt a humán izolátumokban a munkacsoportunk korábbi eredményeihez képest, ami feltételezhetően a *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-öt hordozó C2 alkklád C1-M27 alkkládra való lassú lecserélődésének a következménye.

Korábbi tanulmányok CRE-t már találtak a Duna szerbiai és romániai szakaszaiban 2013-ban és Ausztriában 2016-ban, de Magyarországon nem. Ezekben a tanulmányokban a fajeloszlás és a hordozott karbapenemáz gének nagyban eltértek a mi eredményeinktől. Más európai tavakban és folyókban *bla*<sub>NDM-1</sub>-et ritkán találtak, míg a *bla*<sub>NDM-1</sub> és *bla*<sub>VIM-4</sub> kombinációját, ami a mi tanulmányunkban gyakori volt, legjobb tudásunk szerint még nem írtak le. A vizsgált humán gyűjteményben is ugyanezek a karbapenemáz gének domináltak, viszont a *bla*<sub>NDM-1</sub> és *bla*<sub>VIM-4</sub> géneket egyszerre hordozó izolátum nem fordult elő.

A dankasirályokban talált CRE prevalenciája hasonló volt más sirály fajkon végzett tanulmányok eredményeihez, amiket olyan európai országokban végeztek, ahol a CRE előfordulása emberekben jóval magasabb. A sirályokban talált ST224 és ST744 is magas-kockázatú ExPEC klónok, amik emberekben és állatokban is sokféle fertőzést képesek okozni és jellemzően

valamilyen ESBL és/vagy karbapenemáz gént hordoznak. Az ST372 egy nemzetközi ExPEC klón, ami főleg kutyákban okoz húgyúti fertőzéseket, de emberekben is képes fertőzést okozni. A kutyák ürüléke gyakran szennyezi a városi környezetet és a sirályok fekális anyagokkal is táplálkoznak, ezért az ST372 jelenléte a sirályokban „Egy egészség” kapcsolat lehet vadállatok, társállatok és végső soron az emberek között. Az ST1437 törzsek a Dunában, a 2019-es és 2020-as sirály mintákban is előfordultak illetve rokoni kapcsolatban is álltak, ami azt sugallja, hogy az ST1437 stabilan jelen van a sirály populációban, vagy a közelmúltban válhattak hordozóivá, feltehetően egy a sirályok által gyakran látogatott forrásból. Az ST1437 *E. coli* egy ritkán leírt ST, ami talán kommenzális sertés törzs lehet tekintettel arra, hogy irodalmi adatok alapján csak ebből a gazdafajból jelentették eddig. Ezért az ST1437 jelenléte a sirályokban feltehetően sertésállomány eredetű, mivel a művelt területeket gyakran szórják sertés trágyával, ami párhuzamba állítható a *bla*<sub>CTX-M-55</sub> terjedésével a haszonállatokból a szántóföldeken keresztül a varjakig.

A talált karbapenemázok és kombinációik nagy hasonlósága, a hordozó ST-ok sokfélesége és a különböző forrásokból származó *bla*<sub>NDM-1</sub> gének genetikai környezetének nagy hasonlósága azt jelezheti, hogy a CRE járványtana hazánkban

főként a HGT által formálódik. A vizes élőhelyek optimális helyszíneként szolgálnak a HGT számára; a rezisztencia gének az üledékben felhalmozódhatnak és a felszíni vizeket látogató vadállatok megfertőződhetnek a kórházakból a felszíni vizekbe kerülő rezisztens törzsekkel. Magyarországon a *K. pneumoniae* a domináns CRE emberekben, ami korábban a *bla<sub>VIM-4</sub>*-et hordozta, azonban az elmúlt néhány évben a hordozott karbapenemázok diverzifikálódtak és megjelentek a *bla<sub>OXA-48</sub>*-szerű, *bla<sub>KPC</sub>* és *bla<sub>NDM</sub>* gének is, ami a CREc izolátumainkban is jól megfigyelhető volt. A klinikai CREc izolátumokban a *bla<sub>NDM-1</sub>* magas prevalenciája és a *bla<sub>NDM-1</sub>* gének közvetlen genetikai környezetének nagyfokú hasonlósága alapján feltehető, hogy a Dunában talált karbapenemázok egy része kórházi eredetű, ami a szennyvízzel juthat a Dunába (a Budapest feletti szakaszból vett minták negatívak voltak CRE-re).

A sirályok és varjak urbanizált, mindenevő, kóborló és vándorló viselkedésük miatt fontos helyi és hosszú-távú vektorként szolgálhatnak a törzsek, MGE-ek és gének számára összekapcsolva különböző földrajzi területeket egy komplex hálózattá, felhívva ezzel a figyelmet a madarak szerepére illetve az Egy egészség elv fontosságára az antibiotikum rezisztencia terjedésében.

## Összefoglalás

Az Egy egészség elv tekintetében az emberek és az állatok egészsége és a környezet szoros kölcsönhatásban áll egymással, ami az antibiotikum rezisztenciára is vonatkozik, ennek fényében pedig vadmadarak szerepét vizsgáltuk az antibiotikum rezisztencia terjedésében. A 2016. október és 2017. március között vizsgált vetési varjak 33%-ában, a rutin diagnosztikai vizsgálatra érkező humán székletminták 1,7%-ában találtunk ESBL-termelő *E. coli*-t. Az ESBL gének szekvenálásából kiderült, hogy a varjakban a *bla<sub>CTX-M-55</sub>* és *bla<sub>CTX-M-27</sub>* gének, míg a humán széklet és klinikai mintákban a *bla<sub>CTX-M-15</sub>* és *bla<sub>CTX-M-27</sub>* domináltak. A PFGE alapján a humán klinikai és széklet izolátumok jól elkülönültek a varjú izolátumoktól néhány kivétellel. Az ST131 a varjú, széklet és klinikai mintákban is előfordult, a domináns alklád a C1-M27 volt. A varjú eredetű ST131 C1-M27 izolátumok WGS és cgMLST alapján közeli kapcsolatban álltak a humán izolátumokkal. A varjakban ST24-be tartozó atipikus EPEC törzsek, *bla<sub>CTX-M-55</sub>* hordozó ST162 törzsek és APEC törzsek is előfordultak. A 2019 és 2020-ban mintázott dankasirályok 7,4%-a illetve 6,7%-a hordozott CRE törzset, a Duna esetében csak a 2020-as Budapest alatti szakaszból gyűjtött mintákban találtunk CRE-t. A domináns faj az *E. coli* volt, ezeket

hasonlítottuk össze humán carbapenem rezisztens *E. coli* CREc törzsekkel. A WGS eredménye alapján a *bla*<sub>NDM-1</sub> volt a domináns karbapenemáz gén, melyek közvetlen genetikai környezete minden esetben ugyanaz volt. A sirály és dunai izolátumokban a *bla*<sub>VIM-4</sub> csak *bla*<sub>NDM-1</sub>-gyel együtt volt jelen, míg a klinikai izolátumokban önmagában, vagy a *bla*<sub>OXA-48</sub>-cal együtt fordult elő. Alapvetően az emberi, vízi és sirály CREc izolátumok különböző ST-okba tartoztak. A klinikai izolátumok döntő többségét jellemzően humán patogén ST-ok adták, de a sirály és dunai törzsek között is találtunk fontos magas kockázatú klónokat (ST224, ST372, ST744 és ST10, ST354, ST410). A humán és sirály izolátumok között nem találtunk közvetlen kapcsolatot. A dunai és humán ST410 törzsek kapcsolatban álltak egymással. A 2019-ben gyűjtött ST1437 törzsek teljesen azonosak voltak míg a 2020-as sirály és dunai izolátumok között 22-24 allél allélnyi különbség volt. A mindenevő, urbanizált, kóborló és vándorló viselkedésük miatt ezek a sirályok és varjak fontos rezervoárok, helyi és hosszútávú vektorok a rezisztens törzsek, MGE-ek és rezisztencia gének számára, felhívva ezzel a figyelmet a vadmadarak szerepére illetve az Egy egészség elv fontosságára az antibiotikum rezisztencia terjedésében.



Nyilvántartási szám: DEENK/530/2023.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Nagy József Bálint  
Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10077875

### A PhD értekezés alapján szolgáló közlemények

1. **Nagy, J. B.**, Koleszár, B., Khayer, B., Róka, E., Laczkó, L., Ungvári, E., Kaszab, E., Bali, K., Bányai, K., Vargha, M., Lovas-Kiss, Á., Tóth, Á., Kardos, G.: Carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Black-headed gulls, the Danube, and human clinical samples: a One Health comparison of contemporary isolates.  
*Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 35, 257-261, 2023.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2023.10.002>  
IF: 4.6 (2022)
2. **Nagy, J. B.**, Balázs, B., Benmazouz, I., Gyüre, P., Kóvér, L., Kaszab, E., Bali, K., Lovas-Kiss, Á., Damjanova, I., Majoros, L., Tóth, Á., Bányai, K., Kardos, G.: Comparison of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates From Rooks (*Corvus frugilegus*) and Contemporary Human-Derived Strains: A One Health Perspective.  
*Front. Microbiol.* 12, 1-9, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.785411>  
IF: 5.2

### További közlemények

3. Balázs, B., Tóth, Z., **Nagy, J. B.**, Majoros, L., Tóth, Á., Kardos, G.: Faecal Carriage of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*: comparison to Clinical Isolates from the Same Period (2017-2019).  
*Pathogens*. 11 (9), 1-9, 2022.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens11091003>  
IF: 3.7





4. Tóth, H., Buchholz, G., Fésüs, A., Balázs, B., **Nagy, J. B.**, Majoros, L., Szarka, K., Kardos, G.:  
Evolution of the Gram-Negative Antibiotic Resistance Spiral over Time: a Time-Series  
Analysis.  
*Antibiotics-Basel*. 10 (6), 1-10, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics10060734>  
IF: 5.222
5. Balázs, B., **Nagy, J. B.**, Tóth, Z., Nagy, F., Károlyi, S., Turcsányi, I., Bisttyák, A., Kálmán, A.,  
Sárközi, R., Kardos, G.: Occurrence of *Escherichia coli* producing extended spectrum [beta]-  
lactamases in food-producing animals.  
*Acta Vet. Hung.* 69 (3), 1-5, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/004.2021.00036>  
IF: 0.959
6. Balázs, B., Tóth, Z., Nagy, F., Kovács, R. L., Tóth, H., **Nagy, J. B.**, Tóth, Á., Szarka, K., Majoros,  
L., Kardos, G.: The Role of Uniform Meropenem Usage in *Acinetobacter baumannii* Clone  
Replacement.  
*Antibiotics*. 10 (2), 1-12, 2021.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antibiotics10020127>  
IF: 5.222

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 24,903**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):  
9,8**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai  
ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján  
elvégezte.

Debrecen, 2023.12.05.

