

TDK DOLGOZAT

Román István László

2022

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



Állatgyógyászati probiotikumok metagenomikai vizsgálata brojlercsirkében

Készítette:

Román István László

IV. évf. ao. hallgató

Témavezető:

Dr. Kerek Ádám

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, PhD-hallgató

Budapest

2022

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés	4
2.	Irodalmi áttekintés.....	5
2.1.	Az antimikrobiális rezisztencia jelentősége	5
2.2.	Az antimikrobiális rezisztencia főbb mechanizmusai	5
2.3.	A probiotikumok jelentősége	6
2.4.	A bélmikrobiom és antimikrobiális rezisztencia génkészletének változása	8
2.5.	Egyes probiotikumok antibiotikum rezisztencia génhordozása	9
3.	Célkitűzések.....	15
4.	Anyag és módszer	16
4.1.	Az állatkísérlet körülményei	16
4.2.	A vizsgált készítmények és adagolásuk	17
4.3.	Az állatok testtömegének mérése és mintavétel.....	18
4.4.	A minták dúsítása	18
4.5.	Statisztikai módszer	18
4.6.	A fenotípusos kifejeződés vizsgálata.....	18
4.7.	Új generációs szekvenálás.....	19
4.8.	Bioinformatikai adatelemzés.....	20
5.	Eredmények	21
5.1.	Az állatok testtömeggyarapodása	21
5.2.	A testtömeggyarapodás statisztikai elemzése	22
5.3.	A készítmények szekvenálási eredményei	22
5.4.	A probiotikus törzsek fenotípusos vizsgálata.....	24
5.5.	A bélmikrobiom összetétele és antimikrobiális rezisztencia génhordozása	26
6.	Következtetések	29
7.	Összefoglalás	32
8.	Summary.....	33
9.	Irodalomjegyzék	34
10.	Köszönetnyilvánítás	41

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ARG	Antimikrobiális rezisztencia gén
DNS	Dezoxiribonukleinsav
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
MGE	Mobilis genetikai elem
MIC	Minimális gátló koncentráció (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
TSB	Trypton-szója leves (<i>Tryptic soy broth</i>)

1. BEVEZETÉS

Napjaink egyik komoly problémája az antimikrobiális rezisztencia terjedése. Az antibiotikum felhasználás csökkentése céljából és az antibiotikum kezelések bélmikrobiom egyensúly-felborulásának megelőzése érdekében széles körben elterjedt a probiotikumok használata, mind az állat- és a humánegészségügyben. A probiotikumok számos előnyös tulajdonsága mellett az éremnek két oldala van, hiszen a probiotikus baktérium törzsek is antimikrobiális rezisztencia gének (ARG-k) hordozói lehetnek, mint más baktériumok. Ha ezek a gének mobilis genetikai elemként (MGE) vannak kódolva akár plazmidon vagy fágon, akkor megteremthetik a horizontális géntranszfer lehetőségét; ezáltal nemcsak gazdasági haszonállataink bélmikrobiomjának adhatják át a rezisztencia kialakulásáért felelős géneket, hanem közvetett úton, haszonállataink termékei révén az ember számára is.

Az átadott ARG-k fenotípusos kifejeződése következtében az emberben kialakuló multirezisztencia számos hatóanyaggal szemben megnyilvánulhat, mely életet veszélyeztető fertőzés kialakulásához vezethet. Különösen fontos az ebből a megközelítésből keveset vizsgált probiotikumok lehetséges veszélyforrásként való feltérképezése, kiemelve az egyik legnagyobb gazdasági jelentőséggel bíró brojlercsirke ágazat területét; hiszen ez az egyik, egységnyi idő alatt legnagyobb mennyiségben terméket előállító iparág, mely termékek a legszélesebb körben jutnak el a fogyasztókig. A vágóvonalak gépesítése óhatatlanul a béltraktus sérülését okozva a hús bélsárral történő kontaminációjához vezethet; a baromfihús nem megfelelő hőkezelésének következtében pedig a mikrobákkal a rezisztencia gének is átadódhatnak az emberi bélmikrobiom részére.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az antimikrobiális rezisztencia jelentősége

A legóvatosabb becslések szerint is világszerte évente 700 000 ember halálát okozza az antimikrobiális rezisztencia kialakulása, mely 2050-re évi 10 millió före növekedhet, amennyiben továbbra is ilyen mértékben használjuk az antibiotikumokat [1]. Az antimikrobiális rezisztencia terjedése összefüggésbe hozható az antibiotikumok mezőgazdaságban, állattenyésztésben és iparban történő széles körű felhasználásával [2]. Az életmentő beavatkozások, mint a szervátültetések, nagyobb műtétek és fertőzések kezelésének sikere mind az emberek és állatok esetén az antibiotikumok hatékonyságától függ [3]. Az antibiotikumok használata során genetikai szelektív nyomást gyakorlunk olyan mutációk kialakulására, mely rezisztenciához vezethet. Különösen aggasztó, hogy a globális humán antibiotikum felhasználás 2000 és 2010 között 70%-kal nőtt [4].

2.2. Az antimikrobiális rezisztencia főbb mechanizmusai

“There is probably no chemotherapeutic drug to which in suitable circumstances the bacteria cannot react by in some way acquiring ‘fastness’ [resistance].” — Alexander Fleming, 1946 [5]. Ez a kemoterápia múltja, jelene és jövője, fogalmazhatunk így is az antimikrobiális rezisztenciáról, mint ahogy Sir Alexander Fleming 1946-ban megjelent művében már a kemoterápiás szerekek szembeni rezisztenciáról ír. Fleming 1928-ban egy véletlennek köszönhetően fedezte fel az első antibiotikumot, a penicillint. *Staphylococcus aureus* tenyésztete penészgombával fertőződött be, mely körül gátlási zóna alakult ki. Bár terápiás célra a penicillint csupán 1942-től kezdték el használni, a rezisztencia néhány éven belül megjelent [6]. Fleming hamar rájött, hogy valószínűleg nincs olyan kemoterápiás szer, amire előbb vagy utóbb ne reagálnának a baktériumok valamilyen evolúciós, koszelekciós lépéssel. A baktériumok antibiotikummal szembeni rezisztencia kialakulásának kulcsa a génekben kódolva rejlik.

Az antibiotikum rezisztencia kialakulásának egyik mechanizmusa a hatóanyag enzimatis úton történő lebontása vagy módosítása. Ez egyrészt vagy a kulcsfontosságú reaktív központ inaktivációja vagy egy szerkezetben történő változás során valósul meg, másrészt a kovalens kötések módosítása révén (pl. O-foszforiláció, O-ribosiláció, O-glikoziláció, O-nukleotidiláció, O- és N-acetiláció) akadályozott az antibiotikum és a célpont kapcsolódása [7]. Egy másik fontos mechanizmus az efflux pumpák által történő hatóanyag kipumpálása a sejtől [8]. Az antibiotikum célpont mutáció mechanizmusa általában rezisztenciát eredményező mutáció következménye, amely során a dezoxiribonukleinsavban

(DNS) bekövetkező pontmutációk miatt kisebb affinitással kötődik az antibiotikum, így a represszorok kikapcsolása az inaktiválódást vagy a pumpák génexpresszióját képes növeli [9–11]. Az antibiotikum kötőhely csere az antibiotikum célpontjának cseréje vagy helyettesítése, például olyan fehérjékkel, melyeknek ugyanaz a funkciója, de a szerkezete más. Ilyenek például a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsek kialakulásáért felelős *penicillin-binding protein 2* (PBP2) fehérjék, melyek egy laterális géntranszfer eredményeként jönnek létre, ennek következtében a sejtmembrán peptidoglikán szintézise nem szenved zavart [12–16]. Az antibiotikum célpontjának védelme a hatóanyag kötődésével szemben kialakított védekező mechanizmus [17]. Az antibiotikummal szembeni permeabilitás csökkenés során általában a porin csatornák számának megfogytatkozása révén alakul ki rezisztencia. Enzimek és egyéb fehérjék közvetlenül vagy közvetve is csökkenthetik a permeabilitást [18, 19]. Beszélhetünk továbbá bizonyos gén vagy géntermék hiányáról, például egy porin gén deléciója gátolja a hatóanyag sejtbe jutását [20–22].

2.3. A probiotikumok jelentősége

A probiotikum szót először 1974-ben használták, amely olyan szájon át alkalmazott hasznos mikroorganizmust jelent, ami megfelelő mennyiségben használva kedvező hatással bír az élő szervezetre [23]. Maga a szó használata eredetileg arra utalt, hogy a protozoák által termelt anyagok kedvező hatással bírnak más egysejtű élőlényekre [24]. Az antibiotikumok kezdetben hozamfokozás céljából történő használata hamar az antimikrobiális rezisztencia terjedéséhez vezetett, ami maga után vonta az ilyen célú alkalmazásuk megszüntetését. A probiotikumok olyan alternatív hozamfokozó szerként léptek az antibiotikumok helyébe, melyekkel igyekeznek kiváltani azok kedvező hatásait [25]. A használatukkal kapcsolatos tapasztalatok sokszor ellentmondásosak, éppen ezért a mai napig csupán kiegészítőként kerülnek kereskedelmi forgalomba [26, 27]. A leggyakrabban használt probiotikus törzsek a *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* és *Bifidobacterium* nemzetségekbe tartoznak [28, 29].

Előnyös tulajdonságaik közé tartozik az immunmoduláló hatás, hiszen a bélhámsejtek és az azokhoz kapcsolódó immunsejtek felismerik őket receptoraikon keresztül vagy azok adhéziója révén [30, 31]. Ezen kívül ún. bakteriocineket termelnek, melyek olyan alacsony molekulatömegű anyagok, amik gátolják egyes kórokozók elszaporodását. Ilyen anyag például a tejsav vagy a hidrogén-peroxid [32]. Az élő szervezetben az erőforrásokért való versengésre példa a vas, ami a *Lactobacillus* kivételével számos más baktérium számára nélkülözhetetlen [33]. A bélhámsejtekhez való tapadásukkal kiszorítják más kórokozók

megtapadását [34, 35]. Gátolják a patogén kórokozók invázióját a szervezetben különféle általuk termelt faktorok révén [36]. Képesek a patogén kórokozók toxintermelésének expresszióját is gátolni, ezáltal antitoxin hatást elérni [37], továbbá leírták a genotoxinok elleni védőhatásukat, mely feltételezi a daganatellenes hatásukat is [38, 39].

Veszélyforrásaik közé tartoznak a különféle fertőzések kialakulásához való hozzájárulás, melyről számos tanulmány számol be: a probiotikumok használatát követő *Sacharomyces cerevisiae* vagy *Saccharomyces boulardii* okozta fungémiáról [40–44], illetve *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* és *Lactobacillus rhamnosus* esetén bakterémia következményéről [45–49]. Ezen kívül több olyan szepsziszről is beszámoltak, melyek *Lactobacillus* fajokhoz, *Bacillus subtilis*-hez vagy *Bifidobacterium breve*-hez voltak köthetők [50–53]. De leírták az endocarditisben vagy tályogképződésben való szerepüket is [54–57]. Probléma lehet a túlzott immunstimuláló hatásuk, kimutatták, hogy mind a veleszületett és adaptív immunrendszer működését befolyásolják, túlzott immunválaszt válthatnak ki, ami autoimmun betegségek kialakulásához vezethet [58, 59]. A bélmikrobiom számos ARG forrása lehet, ezért rezisztomának is nevezik ezeket a géneket hordozó baktérium populációkat. Egy vizsgálat során azt találták, hogy antibiotikus kezelést követően megnőtt az ARG diverzitás, a probiotikumok adása további rezisztom bővüléséhez vezetett, mely azt sugallja, hogy az antibiotikum kezelést követő probiotikum alkalmazás megzavarhatja a gastrointestinalis traktus normál rekolonizációját [60, 61]. Az *Enterococcus* fajok számos ARG-vel rendelkezhetnek, ami miatt nem a legcélszerűbb őket probiotikus törzsként választani [62–64], klinikailag is csak néhány esetben mutatták ki egészségügyi előnyüket [65, 66]. Egy 2011-es átfogó tanulmány során arra a következtetésre jutottak, hogy bár a klinikai vizsgálatok nem bizonyítják a probiotikumok fokozott egészségügyi kockázatát, azonban a rendelkezésre álló irodalmi adatok nem elegendőek arra, hogy a kellő biztonságosságukat alátámasszák [67].

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO, *World Health Organization*) az Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (FAO, *Food and Agriculture Organization*) és az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA, *European Food Safety Authority*) javaslatai alapján a probiotikumoknak meg kell felelniük bizonyos biztonsági, funkcionális kritériumoknak és technológiai feltételeknek, amennyiben azokat élelmiszertermelő állatoknak szánják. Ezeket a tulajdonságokat az **1. táblázat** foglalja össze [68–70].

1. táblázat Alapvető kritériumok a probiotikumokkal szemben, élelmiszertermelő állatok részére történő kereskedelmi forgalomba való hozatal esetén

Biztonsági feltételek	1.	Egészséges állatokból vagy emberekből való eredet.
	2.	Pontosan meghatározott fenotípusos és genotípusos tulajdonságok.
	3.	Nem okozhatnak megbetegedést.
	4.	Az epesavas sókat nem hasznosíthatják.
	5.	Az antibiotikum rezisztencia gének nem lehetnek MGE-k.
Funkcionális feltételek	1.	Legyenek képesek versengeni a bélcsatorna mikrobiomjával.
	2.	Legyenek a patogén kórokozókkal szemben kifejezett gátló hatással.
	3.	A gyomor alacsony pH-értékével és az epesavas sókkal szembeni ellenállás.
	4.	Legyenek képesek kolonizálódni a célterületen.
	5.	Rezisztencia a bélmikrobiom által termelt bakteriocin anyagokkal szemben.
Technológiai feltételek	1.	Nagy mennyiségben legyenek előállíthatóak.
	2.	Életképességüket őrizték meg a termékek előállítása (pl. fagyasztás) során.
	3.	A forgalmazás és tárolás során legyen magas a túlélési arányuk.
	4.	A késztermékekben a termék érzékszervi tulajdonságait ne befolyásolják.
	5.	Genetikai stabilitás és a bakteriofágokkal szembeni ellenállás.

2.4. A bélmikrobiom és antimikrobiális rezisztencia génkészletének változása

Különösen fontos a probiotikumok biztonságosságának vizsgálata a bélmikrobiomba történő ARG-k átvitelének tekintetében. Lényeges kritérium, hogy ne legyenek az egyes rezisztencia gének forrásai [71], azonban ez a kérdéskör a világon nincs harmonizálva. A témával foglalkozó legfőbb szervezetek közé tartozik a *Biosafety Assessment of Probiotics used for Human Consumption* (PROSAFE), az *Assessment and Critical Evaluation of Antibiotic Resistance Transferability in Food Chain* (ACE-ART) projekt és a *Joint International Organization for Standardization-International Dairy Federation* (ISO-IDF) szervezet [72–74].

Ying-Chu Chen és Yu-Hsiang Yu tanulmánya azt mutatja, hogy a *Bacillus licheniformis*-t tartalmazó készítmények etetése a különböző baktérium genuszokban befolyásolják az ARG-k mennyiségét a csirkék vakbél- és vastagbél tartalmában. A 144 db brojler kakas vakbél- és vastagbél tartalmából vett minták metagenomikai elemzéséből kiderült, hogy a *Bacillus licheniformis*-t tartalmazó probiotikumok etetése csökkentheti a bél tartalom ARG diverzitását, a kontroll, illetve az antibiotikummal etetett csoportokhoz képest [75]. Egy emberi, sertés és csirke bélmikrobiomot vizsgáló kínai metagenomikai feltárás eredményeiből kiderült, hogy a bélmikrobiom ARG-inek jelentős részét szerzett ARG-k alkotják [76]. Metagenomikai vizsgálatokkal kimutatták, hogy a probiotikumok

etetése és a különböző környezeti tényezők együttesen is befolyásolhatják a bélsárban megjelenő ARG-k mennyiségét. Egy tanulmány kapcsán megállapították, hogy a *Bacillus coagulans* probiotikumként való etetése szignifikánsan növeli az aminoglikozid ARG-k megjelenését a bélsárban ólomnak kitett tojótyúkokban [77].

2.5. Egyes probiotikumok antibiotikum rezisztencia génhordozása

A probiotikumok ARG hordozása hozzájárulhat az antimikrobiális rezisztencia terjedéséhez [78]. Egy átfogó tanulmány során 126 db probiotikus baktérium törzs teljes genom szekvenálását végezték el ARG hordozás meghatározása céljából. Számos antibiotikum csoporttal szembeni rezisztenciát kódoló gént írtak le, összesen hatféle béta-laktamáz kódoló gént találtak, és a tetraciklinekkel szembeni rezisztencia génhordozás aránya (*tetW* gén) különösen magas volt [79].

A *Bacillus* nemzetség fontosabb probiotikus törzseinek áttekintése során *Bacillus amyloliquofaciens* esetén leírt *clbA* gén enzimatis inaktiválás útján okoz fenikol, linkóزامид és pleuromutilin rezisztenciát [80]. Egy 2015-ös vizsgálat során két olyan törzset is leírtak, melyek rifampicin (*rpoB* gén) és aminoglikozid (*rpsL* gén) rezisztencia géneket hordoztak [81]. *Bacillus licheniformis*ban leírták a *cat* gén jelenlétét, ami klóramfenikol rezisztenciát kódol, szintén előfordulhat az *aadK* és *APH* gén, melyek aminoglikozid rezisztenciáért felelős gének. Ezen kívül a makrolidokkal szembeni rezisztenciáért felelős *ermD* gént is megtalálták [82], továbbá leírták az *ermA*, az *ermB* és az *ermC* gének jelenlétét is [83]. A *bcrA* és *bcrB* gének bacitracin rezisztenciához vezető efflux pumpát kódolnak, valamint leírták a célpont mutációt kódoló *bcrC* gént [84]. *Bacillus subtilis* esetén az enzimatis inaktiváló gének közül leírták az *aadK* gént, mely egy nukleotidiltranszferázt kódoló gén és aminoglikozid rezisztenciát okoz [85, 86], a tetraciklin efflux pumpát kódoló gének közül a *tetK* és a *tetL* géneket azonosították [87–90]. Az *APH(5)* egy foszotranszferáz enzimet kódoló gén, ami szintén aminoglikozid rezisztenciát okoz [91]. Az *mprF* gén módosítja a negatív töltésű foszfatidil glicerint a membrán felszínén, ami a kationos peptidekkel szembeni rezisztencia kialakulásához vezet [92–94]. A *blt* gén olyan multidrug efflux pumpát kódol, mely fluorokinolon rezisztenciát okoz [95]. A *bmr* gén szintén egy multidrug efflux pumpát kódol, mely expressziója fluorokinolon és klóramfenikol rezisztenciához vezet [96, 97]. Az *lmrB* gén egy *ATP-binding cassette* típusú efflux pumpát kódol, ami linkóزامид rezisztenciához vezet [98]. Az *mphK* gén egy foszotranszferáz enzimet kódol, mely makrolid rezisztenciát okoz [99]. A *vmrR* gén egy ABC-F típusú ATP-ázt kódol, mely riboszómális védelmet okozva linkóزامид, pleuromutilin, fenikol,

tetraciklin és makrolid rezisztencia kialakulásához vezet [100]. Az *small multidrug resistance* típusú efflux pumpák közül a *ykkC* és *ykkD* gének fenikol, tetraciklin és aminoglikozid rezisztenciát kódolnak [101]. A *Bacillus* nemzetség fontosabb probiotikus fajaiban leírt ARG-ket a **2. táblázat** foglalja össze.

2. táblázat A fontosabb probiotikus *Bacillus* fajok esetén leírt ARG-k

Mechanizmus	Alcsoport	Gén	Rezisztencia	Forrás
Célpont mutáció	Bacillus amyloliquofaeciens			
	23S rRNS metiltranszferáz	clbA	fenikolok	[80]
			linkóزامidok	
			pleuromutilinek	
	RNS béta-alegység polimeráz	rpoB	rifamicinek	[81]
	16S rRNS	rpsL	aminoglikozidok	
	Bacillus licheniformis			
	acetiltranszferáz	cat	fenikolok	[82]
	nukleotidiltranszferáz	aadK	aminoglikozidok	
	foszfoترanszferáz	APH		
	metiltranszferáz	ermD	makrolidok	[83]
		ermA		
		ermB		
észteráz	ermC			
Efflux pumpa	ATP-binding cassette (ABC)	bcrC	peptid antibiotikumok	[84]
		bcrA		
		bcrB		
	Bacillus subtilis			
	major facilitator superfamily (MFS)	tetK	tetraciklinek	[87–90]
		tetL		
		blt	fluorokinolonok	[95]
		bmr	fluorokinolonok	[96, 97]
fenikolok				
ATP-binding cassette (ABC)	lmrB	linkóزامidok	[98]	
small multidrug resistance (SMR)	ykkC ykkD	fenikolok	[101]	
		tetraciklinek		
		aminoglikozidok		
Célpont mutáció	nukleotidiltranszferáz	aadK	aminoglikozidok	[85, 86]
	foszfoترanszferáz	APH(5)	aminoglikozidok	[91]
		mphK	makrolidok	[99]
	defenzin	mprF	peptid antibiotikumok	[92–94]
Célpont védelem	ABC-F ATP-binding casette	vmlR	linkóزامidok	[100]
			pleuromutilinek fenikolok tetraciklinek makrolidok	

A fontosabb *Lactobacillus* fajok közül *Lactobacillus acidophilus* esetén egy 2008-as tanulmány során *gyrA* gént azonosítottak, mely fluorokinolon rezisztenciát eredményez azáltal, hogy a hatóanyag giráz enzim alfa-alegységéhez való kötődését akadályozza meg, ami nélkülözhetetlen a DNS feltekerceléséhez [102]. Egy 2011-es vizsgálat során *ermB* gént izoláltak, mely metiltranszferáció során inaktiválja a makrolid és linkóزامid antibiotikumokat [103]. Egy másik tanulmányban az *ermB* gén klindamicin rezisztenciát okozott [104]. *Lactobacillus brevis* esetén az *ermC* gén egy metiltranszferáció révén makrolid és linkóزامid rezisztenciát eredményez [105]. Leírták a *gyrA* gént, ami fluorokinolon rezisztenciát okoz, valamint a *parC* gént, ami a topoizomeráz IV alegysége, melynek pontmutációja megakadályozza a fluorokinolonok DNS-szintézisének gátlását [106, 107]. *Lactobacillus bucheri* esetén egyetlen szakirodalom van (2016), ami antibiotikum rezisztencia gének jelenlétét vizsgálta, kifejezetten tetraciklin rezisztencia génekre fókuszálva, azonban egyetlen ilyen gén jelenlétét sem sikerült kimutatni [108]. *Lactobacillus fermentum* esetén leírták az *ermB*, az *ANT(6)* és az *aadA* géneket. Az *ermB* gén metiltranszferáció révén inaktiválja a makrolid és linkóزامid antibiotikumokat. Az *ANT(6)* gén, valamint az *aadA* gén nukleotidiláció révén inaktiválja az aminoglikozidokat [104]. Az *msrC* gén esetén makrolid rezisztencia figyelhető meg, ugyanebben a tanulmányban leírták a tetraciklin rezisztenciát okozó *tetK* és *tetL* géneket, melyek efflux pumpát kódolnak [109], a *tetK* gént egy másik tanulmányban is kimutatták [110]. *Lactobacillus plantarum* esetén az *ermB* gén metiltranszferáció útján okozza a makrolidok és linkóزامidok rezisztenciáját [103, 109]. Leírták a *gyrA* gént, mely fluorokinolon rezisztenciához vezet, valamint az *aadE* (*ANT(6)*) gént [102] és az *aadA* gént melyek nukleotidilációval inaktiválják az aminoglikozidokat [111]. A *cat* gén acetiltranszferáz útján klóramfenikol rezisztenciát okoz, a *tetS* gén megakadályozza, hogy a tetraciklin antibiotikumok gátolják a riboszóma működését, ezáltal riboszóma védő fehérjeként detektált gén [104]. Ezen kívül leírták még a *blaZ* gént, ami egy béta-laktamáz enzim, ami penicillin rezisztenciát okoz, valamint a *tetK* gént, ami tetraciklin efflux pumpát kódol [105], egy másik tanulmányban a *tetK* mellett a *tetL* gént is kimutatták [109]. Szintén kimutatták a *tetM* és *tetW* géneket, melyek riboszóma védelmet kódolva okoznak tetraciklin rezisztenciát [110]. Az *aac(6')-aph(2')* gén acetiltranszferáz enzimet kódoló gén, amely inaktiválja az aminoglikozidokat [111, 112]. *Lactobacillus rhamnosus* esetén a makrolid antibiotikumok rezisztenciáját okozó *emrA*, *emrB* és *emrC* géneket is kimutatták egy vizsgálat során, melyben rezisztens és érzékeny törzseket hasonlítottak össze [113]. A *Lactobacillus* nemzetség fontosabb probiotikus törzseiben leírt ARG-eket a **3. táblázat** foglalja össze.

3. táblázat A fontosabb probiotikus *Lactobacillus* fajok esetén leírt ARG-k

Mechanizmus	Alcsoport	Gén	Rezisztencia	Forrás
Célpont mutáció	Lactobacillus acidophilus			
	metiltranszferáz	ermB	makrolidok	[103, 104]
			linkóزامidok	
	DNS tropoizomeráz	gyrA	fluorokinolonok	[102]
	Lactobacillus brevis			
	metiltranszferáz	ermC	makrolidok	[105]
			linkóزامidok	
	DNS tropoizomeráz	gyrA	fluorokinolonok	[107]
		parC		
	Lactobacillus fermentum			
	metiltranszferáz	ermB	makrolidok	[104]
			linkóزامidok	
Célpont védelem	ABC-F ATP-binding cassette	msrC	makrolidok	[109, 110]
Efflux pumpa	major facilitator superfamily (MFS)	tetK tetL	tetraciklinek	
Enzimatis inaktiváció	nukleotidiltrnaszferáz	ANT(6)	aminoglikozidok	[104]
	ANT(3'')	aadA		
	Lactobacillus plantarum			
	nukleotidiltranszferáz	aadE (ANT(6))	aminoglikozidok	[102]
		aadA		[111]
	acetiltranszferáz	cat	fenikolok	[104]
		aac(6')-aph(2')	aminoglikozidok	[111, 112]
	béta-laktamáz	blaZ	penicillinek	[105]
Célpont védelem	30S riboszóma elegység	tetS	tetraciklinek	[104, 109]
		tetM		[110]
		tetW		
Efflux pumpa	major facilitator superfamily (MFS)	tetK		[105, 109]
		tetL		
Kötőhely módosítás	metiltranszferáz	ermB	makrolidok	[109]
			linkóزامidok	
	DNS tropoizomeráz	gyrA	fluorokinolonok	[102]
	Lactobacillus rhamnosus			
	metiltranszferáz	ermA	makrolidok	[113]
		ermB	linkóزامidok	
ermC				

Mind az állatoknál és az embereknél az egyik leggyakoribb probiotikumként használt törzs az *Enterococcus faecium* [114]. Probiotikumként való használata történhet immunerősítőként, például macskák herpeszvírus 1 okozta fertőzésnél [115] és fiatal állatok hasmenéses kórképeinek kezelésében [116]. Azonban potenciális veszélyforrások lehetnek a szerzett antibiotikum rezisztens gének feldúsulásának [117]. Egy vizsgálat során AAC(6')-II gént, *msrC* gént és *efmA* gént detektáltak. Ezek közül az első aminoglikozid, a második riboszómális védelmet kódoló multidrug rezisztencia gén, a harmadik pedig makrolid és fluorokinolon rezisztenciáért felelős efflux pumpát kódol [118–121]. Egy átfogó tanulmányban különféle tejtermékekben található *Enterococcus faecium* törzsek genom szekvenálása során *msrA* gént, *msrB* gént, *tetK* gént, *tetL* gént, *tetM* gént, *cat* gént és *ermB* gént találtak [122]. Egy másik vizsgálat probiotikum jelölt *Enterococcus faecium* törzset vizsgálva abban *vanC1* gént talált, mely egy D-Ala-D-Ala ligáz homológot kódol, ez D-Ala-D-Ser képződéséhez vezet, ami csökkenti a vankomicin kötődését [123].

Pediococcus acidilactici tejsavtermelő baktérium törzsek antibiotikum rezisztencia génhordozását borbán vizsgálva leírták az *ermB* gént, mely makrolid és linkózamid rezisztenciát okoz [112]. *Pediococcus pentosaceus* esetén leírták az *ermB* gént, ami metiltranszferáz enzim által okoz makrolid rezisztenciát, valamint az *msrC* gént is, ami makrolid rezisztenciához vezet. Szintén kimutatták a tetraciklin antibiotikum rezisztenciát okozó efflux pumpákat kódoló *tetK* és *tetL* géneket [109]. Egy másik tanulmányban az *aac(6')-aph(2')* gént azonosították, mely acetiltranszferáció révén aminoglikozid rezisztenciát okoz [112]. Egy 2018-as tanulmányban kézműves sajtot vizsgáltak, mely során *vanA*, *vanC1* géneket mutattak ki, melyek glikopeptid rezisztenciát okoznak. Ezen kívül leírták még a *tetO* gén (tetraciklin), a *vatE* gén (makrolid és linkózamid), valamint a *bcrB* gén (bacitracin) jelenlétét is. A *vanA* gén egy D-Ala-D-Ala ligáz homológot kódol, amely D-Ala-D-Lac-ot szintetizál, ez a peptidoglikán szintézisnek egy alternatív módja, ami egyben csökkenti a vankomicin kötődését [124, 125], a *vanC* gén hasonló módon D-Ala-D-Ser szintetizálást kódol [126, 127]. A *tetO* gén olyan fehérjét kódol, ami védi a riboszómát a tetraciklin hatóanyagokkal szemben [128, 129]. A *vatE* gén egy transzpozon mediált acetiltranszferáz, ami sztreptogramin rezisztenciához vezet [130]. A *bcrB* gén bacitracin rezisztenciát okozó efflux pumpát kódol [84]. Az *Enterococcus faecium* és *Pediococcus* nemzetségbe tartozó fontosabb probiotikus törzsekben leírt ARG-eket a **4. táblázat** foglalja össze.

4. táblázat Az *Enterococcus faecium* és fontosabb *Pediococcus* fajok esetén leírt ARG-k

Mechanizmus	Alcsoport	Gén	Rezisztencia	Forrás
	Enterococcus faecium			
Enzimatisz inaktiváció	acetiltranszferáz	AAC(6')-II	aminoglikozidok	[118]
Célpont védelem	ABC-F ATP-binding cassette	msrC	linkóزامidok	
			pleuromutilinek	
			makrolidok	
	msrA	fenikolok	[122]	
		msrB		tetraciklinek
riboszóma védő fehérje	tetM	tetraciklinek		
Efflux pumpa	major facilitator superfamily (MFS)	efmA	makrolidok	[118]
			fluorokinolonok	
		tetK	tetraciklinek	[122]
tetL				
Célpont mutáció	acetiltranszferáz	cat	fenikolok	[122]
	metiltranszferáz	ermB	makrolidok	
	D-Ala-D-Ser ligáz	vanC1	glikopeptidek	[123]
	Pediococcus acidilactici			
	metiltranszferáz	ermB	makrolidok	[112]
			linkóزامidok	
	Pediococcus pentosaceus			
	metiltranszferáz	ermB	makrolidok	[109]
	ligáz	vanA	glikopeptidek	[125]
		vanC		
Enzimatisz inaktiváció	acetiltranszferáz	aac(6')-aph(2')	aminoglikozidok	[112]
		vatE	sztreptogramin	[125]
Célpont védelem	ABC-F ATP-binding cassette	msrC	makrolidok	[109]
	riboszóma védő fehérje	tetO	tetraciklinek	[125]
Efflux pumpa	major facilitator superfamily (MFS)	tetK	tetraciklinek	[109]
		tetL		
	ATP-binding cassette (ABC)	bcrB	peptid antibiotikumok	[125]

3. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás célja, hogy az állatorvoslásban használt baromfifélékre engedélyezett, kereskedelmi forgalomban kapható probiotikumos készítmények közül ötféle készítmény új generációs (második generációs) szekvenálás segítségével történő genomikai vizsgálatát elvégezve azonosítsuk az ARG-k jelenlétét; továbbá etetési állatkísérlet során vizsgáljuk az egyes készítmények súlygyarapodásra gyakorolt hatását, valamint a probiotikumok etetése előtt vett és a felnevelési idő végén vett bélsármintákból szintén szekvenálás segítségével vizsgáljuk azok hatását brojlercsirkék bélmikrobiom összetételére, különös tekintettel a brojlercsirkék bélmikrobiom rezisztom változására. Vizsgáljuk az egyes probiotikus készítményekből izolált törzsek ARG-jeinek fenotípusos kifejeződését, minimális gátló koncentráció (MIC) érték meghatározásával. Továbbá vizsgáljuk az egyik, közegészségügyileg jelentős ARG-ket tartalmazó készítménnyel etetett csoport bélsármintáinak antibiotikummal történő dúsítás hatására bekövetkező változásait új generációs szekvenálás segítségével.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Az állatkísérlet körülményei

Az állatkísérletet az Állatorvostudományi Egyetem Gyógyszertani és Méregtani Tanszékének Állatházában végeztük. Az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács szakvéleménye alapján – mivel a készítmények baromfiban engedélyezett készítmények, így ártalmatlanságuk bizonyított – nem volt szükség állatkísérleti engedélyre a vizsgálathoz, hiszen egyrészt takarmányba keverve etettük a készítményeket, másrészt kizárólag bélsarat gyűjtöttünk tőlük. A naposcsibék a Pipi-Tér Bt-től (Bábolna TETRA Kft.) származó brojlersírkék (Ross308) voltak. A napos állatok a keltetőben Hatchback AVINEW, Hatchback IBD120 és a RISMAVAC + CA126 vakcinákat kapták.

Az állatok elhelyezése az állatvédelmi előírásoknak megfelelő méretű és kialakítású többszintű ketrecekben történt. A naposcsibék fogadása a tartástechnológiában előírt környezeti paraméterek (30 °C, 60% relatív páratartalom) mellett történt, infralámpák alatt, majd az életkornak megfelelő igények szerint változtattuk a paramétereket. Ez egy állandó 60-70%-os páratartalmat, az érkezésük napján és a második napon 30 °C-os hőmérsékletet, valamint 23 óra megvilágítást jelentett. A hőmérsékletet ezt követően fokozatosan csökkentettük a 4. hétre 20 °C-ra. A megvilágítás az érkezés napjától a 3. napig 23 óra volt, majd fokozatosan csökkentve a 4. héttől a vizsgálat végéig, azaz a 42. napig 18 óra volt.

Az állatokat egyedileg jelöltük a lábukra erősített egyedi sorszámmal, ami egyrészt a hetente mért súlygyarapodás egyedi követésében, másrészt a bélsárminták gyűjtésében volt kulcsfontosságú tényező. Az állatok takarmányozása *ad libitum* történt brojler indítótáppal, ezen kívül naponta friss itatóvizet kaptak az állatok. A kokcidiosztatikum nélküli, morzsázott formátumú intenzív brojler indító takarmánykeveréket a Farmer-Mix Kft-től (2027 Zsámbék, Etyeki u. 23.) vásároltuk. A táp összetételét az **5. táblázat** tartalmazza.

5. táblázat A brojler indító táp fontosabb összetevői

Összetevő	%-os aránya
Nedvesség	10,64%
Nyersfehérje	20,96%
Nyerszsír	6,00%
Nyersrost	2,86%
Nyershamu	6,07%
AMEn* baromfi	12,03 MJ/kg
Lizin	1,25%
Metionin	0,54%

*látszólagos metabolizálható energia nulla nitrogénretencióra korrigált értéké

A vizsgálat első négy napján a tápból ketrecenként mértünk ki a csoportoknak 1 kg-ot, amely hozzáadott probiotikus készítményt még nem tartalmazott, majd ezt az 5-13. napok között 1,5 kg/ketrec mennyiségre emeltük. A 14-27. nap között már 2,5 kg/ketrec, végül a 28-42. nap között 3 kg/ketrec tápot kaptak naponta. Friss ivóvízből naponta újat kaptak az állatok. A 0-7. napokon 1 liter/csoport, a 8-14. napokon 2 liter/csoport, a 15-28. napokon 3 liter/csoport és a 29-42. napokon 4 liter/csoport ivóvizet adtunk önitatókba.

4.2. A vizsgált készítmények és adagolásuk

Ötféle kereskedelmi forgalmi engedéllyel rendelkező probiotikus készítményt választottunk ki, melyek baromfi részére vannak engedélyezve és takarmányba keverve is adagolhatók (6. táblázat). Ezt követően mindegyik készítményből 1-1 g mintát küldtünk új generációs szekvenálás segítségével történő genom feltáráshoz ARG-ket nézve. A nyers adatok bioinformatikai feldolgozását követően az egyes rezisztencia gének jelentőségének és azok rezisztencia mechanizmusainak elemzését végeztük el.

6. táblázat A kiválasztott, baromfival takarmányba keverve etethető probiotikus készítmények listája és tulajdonságai

Ssz.	Készítmény	Probiotikus törzs	Törzsszám	CFU/g	Célállat
1.	BioPlus YC	<i>Bacillus licheniformis</i>	DSMZ5749	1,6x10 ⁹	baromfi, sertés, szarvasmarha
		<i>Bacillus subtilis</i>	DSMZ5750	1,6x10 ⁹	
2.	Agroferm M+C	<i>Enterococcus faecium</i>	DSMZ7134	1x10 ⁹	brojler, liba, pulyka, kacsa
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSMZ12837		
		<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSMZ16243		
3.	Ecobiol WX	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	CECT5940	1x10 ¹⁰	baromfi
4.	Gastroferm M+C	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSMZ12837	1x10 ⁹	baromfi
		<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSMZ16243		
		<i>Enterococcus faecium</i>	DSMZ7134		
5.	Fecinor Soluble Plus	<i>Enterococcus faecium</i>	CECT4515	1x10 ¹⁰	baromfi, sertés

Összesen 60 db állattal, 6 csoportra osztva (10 állat/csoport) végeztük a vizsgálatot, ebből az első csoport volt a kontroll csoport, aki nem kapott probiotikumot. A másik 5 csoport a kiválasztott készítmények gyártó által előírt adagját kapta, 5. életnapjuktól kezdve a felnevelés végéig (42. életnap), mely BioPlus YC esetén 4 g/10 kg takarmány, Agroferm M+C esetén 7 g/10 kg takarmány, Ecobiol WX esetén 1 g/10 kg takarmány, Gastroferm M+C esetén 7 g/10 kg takarmány, Fecinor Soluble Plus esetén 1g/10 kg takarmány volt. A

probiotikumok takarmányba történő egyenletes eloszlását bolygókeverő takarmánykeverővel végeztük, 10 kg-os egységenként 2-2 órás homogenizálással.

4.3. Az állatok testtömegének mérése és mintavétel

Az állatok súlygyarapodását egyedileg, hetente egy alkalommal mértük mérlegen. A szekvenáláshoz szükséges minták gyűjtését a felnevelési időszak során 2 alkalommal végeztük. Első alkalommal az állatok 4. életnapján vettünk mintákat, majd a felnevelési időszak végén (42. nap). Az Ecobiol WX készítménnyel etetett csoport esetén minden mintavételi időpontban kétszer vettünk mintát az állatoktól, steril tamponos mintavételi csőbe. Az összes állattól vett minta esetén mintavételi csövekbe előzőleg steril fülke alatt 3-3 ml steril foszfát puffer oldatot mértünk be, az ebbe levett bélsármintákat -80 °C-os hűtőben tároltuk a szekvenálás megkezdéséig. Az Ecobiol WX csoport második mintavételi csöveibe előzőleg steril fülke alatt 3-3 ml tripton-szója levest (TSB) mértünk be.

4.4. A minták dúsítása

Az Ecobiol WX készítmény szekvenálása során meghatározott, humán jelentőséggel bíró rezisztenciát kódoló gének alapján kiválasztott tiamulin és florfenikol hatóanyagok MIC értékének fele hatóanyag koncentrációját (32 µg/ml és 2 µg/ml) tartalmazó dúsító levesbe kerültek az ebből a csoportból külön levett minták, hogy a rezisztens mikroba törzseket dúsítással szelektáljuk, 37 °C-on 18-24 órán keresztül.

4.5. Statisztikai módszer

Az állatok testtömeggyarapodásának változását az egyes készítmények hatására a kontroll csoporthoz viszonyítottuk, melynek statisztikai elemzését ANOVA segítségével végeztük el [131] az R program 4.1.0 verziójával [132].

4.6. A fenotípusos kifejeződés vizsgálata

Az antimikrobiális rezisztencia fenotípusos kifejeződését a probiotikus törzsek adott antibiotikumokra történő MIC érték meghatározásával végeztük, melyre az egyes készítményekben található törzsek izolálását követően került sor.

A vizsgálatot megelőző nap az izolált baktériumokból sárga oltókacsnyi mennyiséget 3 ml TSB-t tartalmazó steril csőbe raktunk, majd 37 °C-on, 18-24 órán keresztül inkubáltuk. A vizsgált hatóanyagokból (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) a *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) módszertana szerint [133] készítettük el a törzsoldatokat. A 96-lyukú mikrotiter lemez 1. oszlopát kivéve, az összes többi oszlopot 90 µl TSB-vel töltöttük fel, majd a törzsoldatból az 1. oszlop lyukaiba 180 µl-t mértünk be. Ezt követően

elkészítettük a hatóanyag kettes alapú hígítási sorát. Az első oszlopban található törzsoldatból 90 µl-t pipettáztunk a 2. oszlopba, 3-4x alaposan szuszpendáltuk a pipettával a hozzáadott mennyiséget, majd ezt a folyamatot ismételve haladtunk tovább a 10. oszlopig, amelyből a keverés után visszaszívott felesleges 90 µl-t kidobtuk, így minden lyuk egyenlő mennyiségben 90 µl szuszpenziót tartalmazott. Egy segédlemezen elkészítettük a baktériumok hígítását, melynek egy-egy oszlopa egy-egy hatóanyag vizsgálatához történő átoltást szolgált. Ehhez 240 µl TSB-t mértünk az oszlopokba, majd ehhez soronként az egyes baktérium szuszpenziót tartalmazó csövekből 10 µl-t adtunk, ezzel 25x hígított szuszpenziót kaptunk a munkalemezre való ráoltáshoz. A kettes alapú hígítási sort tartalmazó munkalemez 11. oszlopától kezdve visszafelé haladva minden lyukba 10 µl baktériumszuszenziót mértünk. A munkalemez 11. oszlopa pozitív kontrollként szolgált, amelybe az 1-10. oszlophoz hasonlóan tápleves és baktériumszuszenzió is került, viszont hatóanyag nem. A munkalemez 12. oszlopa volt a negatív kontroll, amely csak táplevest tartalmazott, baktériumot és hatóanyagot nem.

Ezt követően 18-24 órán keresztül 37 °C-on termosztátban inkubáltuk a munkalemezeket, majd a pozitív és negatív kontrollokhoz viszonyítva elbíráltuk a MIC értékeket, a **7. táblázatban** látható szempontok alapján.

7. táblázat A MIC értékek elbírálásának szempontjai lyukanként egy adott mikrobatörzs adott hatóanyag koncentrációval történő kezelése esetén

Jelölés	Tapasztalat	Értékelés
+++	jelentős mértékű zavarosodás	pozitív
++	mérsékelt zavarosodás	pozitív
+	enyhe zavarosodás	pozitív
+-	enyhe zavarosodás, a baktérium növekedése nem megítélhető	negatív
-	nincs zavarosság	negatív

4.7. Új generációs szekvenálás

A probiotikum készítmények szekvenálását Illumina NextSeq 500 segítségével végeztük [134]. A DNS kivonása QIAmp DNS kit (Qiagen, Németország) segítségével történt a gyártó által előírt protokoll szerint. Egy készítményből 1 g mennyiséget küldtünk szekvenálásra. A bélsárminták szekvenálása költséghatékonysági megfontolásból NovaSeq PE150 segítségével történt [135]. A DNS kivonást szintén QIAmp DNS kit (Qiagen, Németország) segítségével végeztük a gyártó által előírt protokoll szerint. Ehhez csoportonként ötösével poolozott mintát vettünk alapul, ami csoportonként 2 db poolozott mintát eredményezett. Ugyanígy jártunk el a kísérlet elején és végén vett mintákkal,

valamint ehhez jött még hozzá a kiválasztott Ecobiol WX csoport dúsítást követő mintáinak poolozása, szintén a kísérlet elején és végén vett mintákkal. Mindösszesen 28 db poolozott minta szekvenálására került sor.

4.8. Bioinformatikai adatelemzés

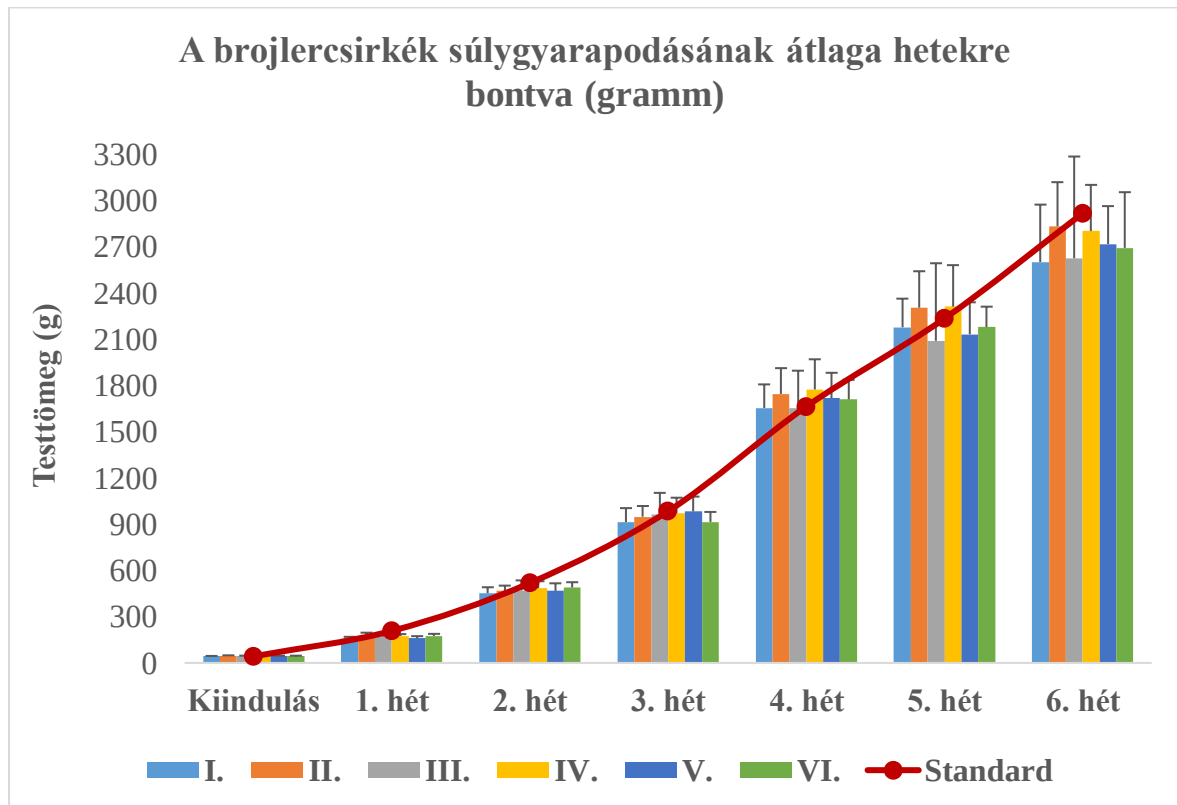
A nyers szekvenciaadatok minőségellenőrzését FastQC v0.11.9 [136] szoftver segítségével végeztük, a nem megfelelő szekvenciák szűrésére TrimGalore v0.6.6 [137] programot használtunk. A leolvasott szekvenciákat ezt követően hosszabb szekvenciákká (contigok) állítottuk össze a MEGAHIT v1.2.9 [138] program segítségével. A contigok minőségellenőrzését a QUAST szoftver segítségével végeztük [139]. A bétartalomban a házityúk genomjának darabjai is megjelennek, melynek a bázisrendje is a könyvtárba került, ennek kiszűrése céljából a Bowtie2 [140] szoftver segítségével a házityúk (*Gallus gallus*) referenciagenomjára (NCBI azonosító: GRCg6a) illesztettük a leolvasási szekvenciákat. A rendszertani besorolást Kraken2 [141] szoftver segítségével és az NCBI nukleotid adatbázissal [142] végeztük. A feldolgozás R-környezetben [132], phyloseq [143] és microbiome [144] csomagok segítségével történt. A bakteriális eredetű szekvenciák összeállítását a metaSPAdes [145] szoftver segítségével végeztük. Az így kapott contigokból a Prodigal v2.6.3 [146] segítségével meghatároztuk az összes lehetséges nyílt leolvasási keretet (ORF, *Open Reading Frames*). Az ORF-ek között található ARG-k azonosítását a *Resistance Gene Identifier* (RGI) v5.1.0 segítségével végeztük a *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) adatbázissal összevetve [147]. Csak azokat a géneket vettük figyelembe, melyek megfeleltek a CARD adatbázis által meghatározott STRICT küszöbértéknek és legalább 95%-os szekvenciaazonosságot és lefedettséget mutattak.

Az azonosított rezisztenciagének MGE-ként való vizsgálatát MobileElementFinder (v1.0.3) [148] program segítségével végeztük. Csak azokat az ARG-ket tekintettük potenciálisan mobilisnak, melyek az adatbázisban szereplő leghosszabb adott mikroorganizmusra jellemző transzpozon távolságán belül voltak. Ezen kívül a contigok plazmid eredetét a PlasFlow v1.1 szoftver segítségével vizsgáltuk [149], a gének fagon való kódolásának vizsgálatát pedig a VirSorter v2.2.2 [150] szoftver segítségével végeztük.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Az állatok testtömeggyarapodása

Az egyes csoportok testtömeggyarapodása grafikusán ábrázolva heti bontásban az **1. ábrán** látható. A testtömeg a vizsgálati idő teljes időtartama alatt egyenletesen nőtt. Az I-es kontroll csoport és a többi kezelt csoport közötti különbségek nem szignifikánsak. Azonban a kontrollhoz képest a II-es csoport (Bioplus YC) és a IV-es csoport (Ecobiol WX) kiugróan nagyobb átlagos súlygyarapodást ért el. A Ross308-as fajta standard súlygyarapodását egyenletesen követték az egyes készítményekkel etetett csoportok, sőt a 4. élethéten a Bioplus YC (II. csoport, +5%), az Ecobiol WX (IV. csoport, +6%), a Gastroferm M+C (V. csoport, +3%) és a Fecinor Soluble Plus (VI. csoport, +3%) probiotikumok hatására meg is haladták azt. Az 5. élethéten ugyanez továbbra is megfigyelhető a Bioplus YC (II. csoport, +3%) és az Ecobiol WX (IV. csoport, +3%) probiotikumok esetén (**8. táblázat**).



1. ábra A brojlercsirkék súlygyarapodásának átlaga hetekre bontva, csoportonként. Az I. csoport a negatív kontroll, aki nem kapott probiotikumot a tápba. A II. csoport BioPlus YC-t (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*), a III. csoport Agroferm M+C-t (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*), a IV. csoport Ecobiol WX-et (*Bacillus amyloliquefaciens*), az V. csoport Gastroferm M+C-t (*Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*) és a VI. csoport Fecinor Soluble Plus-t (*Enterococcus faecium*) kapott.

8. táblázat Az egyes csoportok súlygyarapodásának átlaga (g) hetekre bontva.

Csoport	Kiindulás	1. hét	2. hét	3. hét	4. hét	5. hét	6. hét
I.	43,9	157,6	452,6	913,5	1654,5	2178,0	2601,3
II.	45,2	177,3	467,6	948,7	1745,8	2305,2	2833,3
III.	43,4	170,0	470,5	963,6	1653,4	2090,5	2625,8
IV.	45,8	175,5	485,6	973,0	1774,3	2312,5	2802,6
V.	44,1	159,8	467,7	983,6	1718,9	2132,5	2718,3
VI.	43,2	174,7	489,4	914,9	1709,9	2179,5	2693,2
Standard	43,0	208,0	519,0	985,0	1664,0	2235,0	2918,0

5.2. A testtömeggyarapodás statisztikai elemzése

A 6. héten mért végső testsúly a kontroll (I.) csoporthoz képest a Bioplus YC (II. csoport, $p=0,32$), az Agroferm M+C (III. csoport, $p=0,49$), az Ecobiol WX (IV. csoport, $p=0,44$), a Gastroferm M+C (V. csoport, $p=0,87$) és a Fecinor Soluble Plus (VI. csoport, $p=0,55$) esetén sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget (**9. táblázat**). Szakmailag azonban a kontrollhoz képest a legalább 5%-os pozitív átlagsúly különbséget elérő mért értékeket relevánsnak tekintettük, ami az esetek 42%-ában volt tapasztalható. A IV. csoport minden esetben >5% feletti különbséget mutatott a kontroll csoporthoz képest. Ahhoz, hogy szignifikáns eredményeket kapjunk, a jövőben a mintaelemszámot kell növelni.

9. táblázat A 6. héten mért testtömeg I-es kontroll csoporthoz való viszonyítása az egyes készítmények (II-VI. csoportok) tükrében

Csoport	Az I. csoporthoz viszonyított átlagos különbség (g)	Standard hiba	t-érték	p-érték
I. csoport	2695,89	98,57	27,35	0,00
II. csoport	137,41	135,87	1,01	0,32
III. csoport	97,11	139,40	0,70	0,49
IV. csoport	106,71	135,87	0,79	0,44
V. csoport	22,41	135,87	0,16	0,87
VI. csoport	83,44	139,40	0,60	0,55

5.3. A készítmények szekvenálási eredményei

A vizsgált készítmények szekvenálását követően az egyes mintákban azonosított ARG-eket a **10. táblázat** szemlélteti. Az egyik legfontosabb rezisztencia mechanizmus az enzimatis inaktiváció, ilyen rezisztenciát kódol az *aadk* gén, mely a BioPlus YC készítményben *Bacillus* spp. eredetű azonosított aminoglikozid rezisztenciát okozó gén. Az AAC(6')-II gén megtalálható volt az Agroferm M+C, a Gastroferm M+C és a Fecinor Soluble Plus készítményekben is, mely szintén aminoglikozid rezisztencia kialakításáért felelős gén, mely *Enterococcus* spp. eredetű volt. A BioPlus YC esetén ezen kívül *mphk* gén került

azonosításra, mely makrolid antibiotikumok rezisztenciáját okozhatja. A célpont mutációk közül ki kell emelni a BioPlus YC készítményben azonosított *mprF* gént, melyek peptid antibiotikum rezisztenciához vezethetnek. Meg kell említeni az Ecobiol WS készítményben azonosított diaminopirimidin rezisztenciát kódoló *DfrA43* gént, aminek bár lefedettsége 82,56%, azonossága pedig csak 35,75%, azonban dsDNS fāgon kódolt génként azonosított *Bacillus* spp. eredetű ARG.

10. táblázat Az egyes készítményekben azonosított ARG-k. A lefedettség a szekvenálás pontossága, amely többszörös lefedettség biztosítja a konszenzus hibamentességét. Az azonosság a megfeleltetett szakasszal való átfedés.

Minta	Szekvencia %		ARG	Mechanizmus	Rezisztencia
	lefedettség	azonosság			
BioPlus YC	100	99,25	<i>blt</i>	efflux pumpa	fluorokinolonok
	100	98,91	<i>vmlR</i>	célpont mutáció	makrolidok, linkóزامidok, pleuromutilinek, fenikolok, tetraciklinek, sztreptogramin, oxazolidon
	100	98,59	<i>aadK</i>	enzimatis inaktiváció	aminoglikozidok
	100	99,49	<i>tmrB</i>	permeabilitás csökkentés	nukleozidok
	100	99,79	<i>lmrB</i>	efflux pumpa	linkóزامidok
	100	98,68	<i>mphK</i>	enzimatis inaktiváció	makrolidok
	100	100	<i>mprF</i>	célpont mutáció	peptid antibiotikumok
	100	99,74	<i>bmr</i>	efflux pumpa	fluorokinolonok, fenikolok, nukleozidok
	86,15	35,52	<i>DfrA43</i>	célpont mutáció	diaminopirimidinek
	100	99,65	<i>ErmD</i>	célpont mutáció	makrolidok, linkóزامidok
	100	98,03	<i>bcrC</i>	célpont mutáció	peptid antibiotikumok
	100	98,56	<i>bcrB</i>	efflux pumpa	peptid antibiotikumok
	96,08	99,32	<i>bcrA</i>	efflux pumpa	peptid antibiotikumok
	100	100	<i>ykkC</i>	efflux pumpa	aminoglikozidok, tetraciklinek, fenikolok
	100	99,05	<i>ykkD</i>	efflux pumpa	aminoglikozidok, tetraciklinek, fenikolok
Agroferm M+C	100	100	<i>efmA</i>	efflux pumpa	makrolidok, fluorokinolonok
	100	98,9	<i>AAC(6')-II</i>	enzimatis inaktiváció	aminoglikozidok
	100	97,15	<i>msrC</i>	célpont mutáció	makrolidok, linkóزامidok, pleuromutilinek, fenikolok, tetraciklinek, sztreptogramin, oxazolidon
	100	99	<i>eatAv</i>	célpont mutáció	

10. táblázat Az egyes készítményekben azonosított ARG-k. A lefedettség a szekvenálás pontossága, amely többszörös lefedettség biztosítja a konszenzus hibamentességét. Az azonosság a megfeleltetett szakasszal való átfedés. (folytatás)

Minta	Szekvencia %		ARG	Mechanizmus	Rezisztencia
	lefedettség	azonosság			
Ecobiol WX	100	99,43	<i>clbA</i>	célpont mutáció	fenikolok, linkóزامidok, pleuromutilinek, sztreptogramin, oxazolidon
	82,56	35,75	<i>DfrA43</i>	célpont mutáció	diaminopirimidinek
Gastroferm M+C	100	100	<i>efmA</i>	efflux pumpa	makrolidok, fluorokinolonok
	100	97,15	<i>msrC</i>	célpont mutáció	makrolidok, linkóزامidok, pleuromutilinek, fenikolok, tetraciklinek, sztreptogramin, oxazolidon
	100	98,9	<i>AAC(6')-Ii</i>	enzimatis inaktiváció	aminoglikozidok
	100	99	<i>eatAv</i>	célpont mutáció	makrolidok, linkóزامidok, pleuromutilinek, fenikolok, tetraciklinek, sztreptogramin, oxazolidon
Fecinor Soluble Plus	100	98,9	<i>AAC(6')-Ii</i>	enzimatis inaktiváció	aminoglikozidok
	100	97,15	<i>msrC</i>	célpont mutáció	makrolidok, linkóزامidok, pleuromutilinek, fenikolok, tetraciklinek, sztreptogramin, oxazolidon
	100	99	<i>eatAv</i>	célpont mutáció	makrolidok, linkóزامidok, pleuromutilinek, fenikolok, tetraciklinek, sztreptogramin, oxazolidon

Efflux pumpát kódoló gének közül a legtöbb a BioPlus YC készítményben volt megtalálható, ezek közül ki kell emelni a fluorokinolon rezisztencia szempontjából lényeges *blt* gént és *bmr* gént, valamint a peptid antibiotikum rezisztencia szempontjából jelentős *bcrA* és *bcrB* géneket. Az Agroferm M+C és Gastroferm M+C készítményekben is megtalálható volt a makrolid és fluorokinolon rezisztenciát eredményező efflux pumpát kódoló *efmA* gén. Meg kell említeni a BioPlus YC készítményben megtalálható aminoglikozid, tetraciklin és fenikol multirezisztenciáért felelős *ykkC* és *ykkD* gének jelenlétét is. Összességében elmondhatjuk, hogy MGE nem került azonosításra és plazmidon kódolt ARG-t sem találtunk.

5.4. A probiotikus törzsek fenotípusos vizsgálata

A BioPlus YC készítményben található *Bacillus licheniformis* és *Bacillus subtilis* törzsek esetén penicillinekkal szembeni ARG-t nem azonosítottunk, melyet jól tükröz a fenotípusos érzékenység is. Gentamicin esetén a magas MIC értékek (8 és 16 µg/ml) rezisztenciára utalnak, mely az *aadK* (enzimatis inaktiváció), *ykkC* és *ykkD* (efflux pumpa) gének kifejeződésének tulajdonítható. *Bacillus licheniformis* esetén a magas

oxitetraciklin MIC érték (8 µg/ml), *Bacillus subtilis* esetén pedig a magas doxiciklin MIC érték (>32 µg/ml) oka lehet a *vmlR* gén (célpont mutáció) vagy a *ykkC* és *ykkD* (efflux pumpa) gének kifejeződése. Klindamicinre előbbi törzs mutat rezisztenciát (32 µg/ml), melyet okozhatja a *vmlR* vagy *ermD* gén (célpont mutáció), illetve az *lmrB* gén (efflux pumpa). Mindkét törzs esetén a magas tiamulin MIC értékek (>64 µg/ml) a *vmlR* génnek (célpont mutáció) tulajdoníthatók. Az Agroferm M+C készítményben található ARG-k mind *Enterococcus* eredetűek, a nemzetség cefalosporin hatóanyagokra *ab ovo* rezisztens, melyet jól tükröz a ceftriaxon MIC értéke (>16 µg/ml), penicillinekre viszont általában érzékenynek bizonyulnak. Gentamicin esetén az *AAC(6')-II* gén (enzimatis inaktiváció) okozhatja a rezisztenciát (32 µg/ml), florfenikol esetén a rezisztencia (8 µg/ml) az *msrC* génnek vagy *eatAv* génnek (célpont mutáció) tulajdonítható. Tiamulinnal szemben (64 µg/ml) szintén az *msrC* gén vagy *eatAv* gén (célpont mutáció) okozza a magas MIC értéket, mely *Lactobacillus plantarum* esetén is megfigyelhető (64 µg/ml).

11. táblázat Az egyes készítményekből izolált törzsek MIC értékei. Zölddel jelöltük, ahol az ARG tartalom mellett a feltételezhetően azok által okozott fenotípusos rezisztenciát is tapasztaltuk.

Ssz.	Probiotikus törzs	PEN	AM	AMK	CTR	GEN	OTC	DOX	TIL
1.	<i>B. licheniformis</i>	0,125	1	2	16	8	8	<0,06	0,5
	<i>B. subtilis</i>	1	0,5	0,5	0,25	16	0,125	>32	0,5
2.	<i>E. faecium</i>	8	1	1	>16	32	0,25	<0,125	1
	<i>L. plantarum</i>	1	16	4	16	8	8	4	2
	<i>P. acidilactici</i>	1	16	8	>16	4	4	0,5	<0,125
3.	<i>B. amyloliquefacies</i>	<0,06	1	2	4	32	0,25	0,25	0,5
4.	<i>L. plantarum</i>	4	2	0,5	>16	>32	0,5	0,125	4
	<i>P. acidilactici</i>	1	16	4	>16	32	32	16	4
	<i>E. faecium</i>	8	1	1	>16	32	0,25	<0,125	1
5.	<i>E. faecium</i>	4	1	1	>16	>32	0,25	<0,125	4

PEN – penicillin, AM – amoxicillin, AMK – amoxicillin-klavulánsav, CTR – ceftriaxon, GEN – gentamicin, OTC – oxitetraciklin, DOX – doxiciklin, TIL – tilozin. *B.* – *Bacillus*, *E.* – *Enterococcus*, *L.* – *Lactobacillus*, *P.* – *Pediococcus*

fenotípusos rezisztencia mögött feltételezhető, rezisztencia gének azonosítása történt

Az Ecobiol WX készítmény esetén egyértelműen csak a tiamulin esetén (>64 µg/ml) sikerült a rezisztenciáért felelős *clbA* gént (célpont mutáció) azonosítani. Gentamicin rezisztencia figyelhető meg *Lactobacillus plantarum* (>32 µg/ml), *Pediococcus acidilactici* (32 µg/ml) és *Enterococcus faecium* (32 µg/ml) esetén is, melyet az *AAC(6')-II* gén (enzimatis inaktiváció) okozhat. *Pediococcus acidilactici* esetén az oxitetraciklin (32 µg/ml) és doxiciklin (16 µg/ml) rezisztenciát az *msrC* vagy az *eatAv* gén (célpont mutáció) okozhatja. Szintén mindhárom törzs rezisztenciát mutat florfenikolra (8 µg/ml) és tiamulinra (>64 µg/ml), mely az *msrC* vagy az *eatAv* gén (célpont mutáció) aktiválódásának következménye lehet. A Fecinor Soluble Plus készítmény esetén az aminoglikozid

rezisztencia (>32 µg/ml) az AAC(6')-II gén (enzimatis inaktiváció) következtében alakulhatott ki. Florfenikol (8 µg/ml) és tiamulin esetén (64 µg/ml) az *msrC* vagy az *eatA* gén (célpont mutáció) aktiválódásának következménye lehet a rezisztencia [151]. Az egyéb hatóanyagok esetén tapasztalt magas MIC értékek *ab ovo* rezisztencia következményei (**11. táblázat**). Annak pontos meghatározása érdekében azonban, hogy az egyes fenotípusos rezisztencia megnyilvánulások mely gének aktiválódásának a következményei, transzkriptomikai vizsgálatok végzése szükséges.

11. táblázat Az egyes készítményekből izolált törzsek MIC értékei. Zöld színnel kiemelve azokat az értékeket, melyek mögött azonosítottunk fenotípusos megnyilvánulást okozható ARG-t. (folytatás)

Ssz.	Probiotikus törzs	FLO	KLI	TIA	VAN	GAT	PSA	SUL	TRI
1.	<i>B. licheniformis</i>	2	32	>64	0,25	<0,03	4	64	<0,25
	<i>B. subtilis</i>	2	2	>64	0,25	<0,03	2	64	0,5
2.	<i>E. faecium</i>	8	4	64	2	0,5	>128	>128	>128
	<i>L. plantarum</i>	4	<0,06	>64	>32	2	>128	>128	64
	<i>P. acidilactici</i>	4	<0,06	1	>32	0,5	128	64	>128
3.	<i>B. amyloliquefacies</i>	2	0,5	>64	1	<0,03	4	128	0,5
4.	<i>L. plantarum</i>	8	4	>64	>32	1	>128	>128	64
	<i>P. acidilactici</i>	8	<0,06	>64	>32	8	>128	>128	>128
	<i>E. faecium</i>	8	4	>64	1	2	>128	>128	>128
5.	<i>E. faecium</i>	8	4	64	2	1	>128	>128	>128

FLO – florfenikol, KLI – klindamicin, TIA – tiamulin, VAN – vankomicin, GAT – gatifloxacin, PSA – potenciált szulfonamid, SUL – szulfametoxazol, TRI – trimetoprim. *B.* – *Bacillus*, *E.* – *Enterococcus*, *L.* – *Lactobacillus*, *P.* – *Pediococcus*

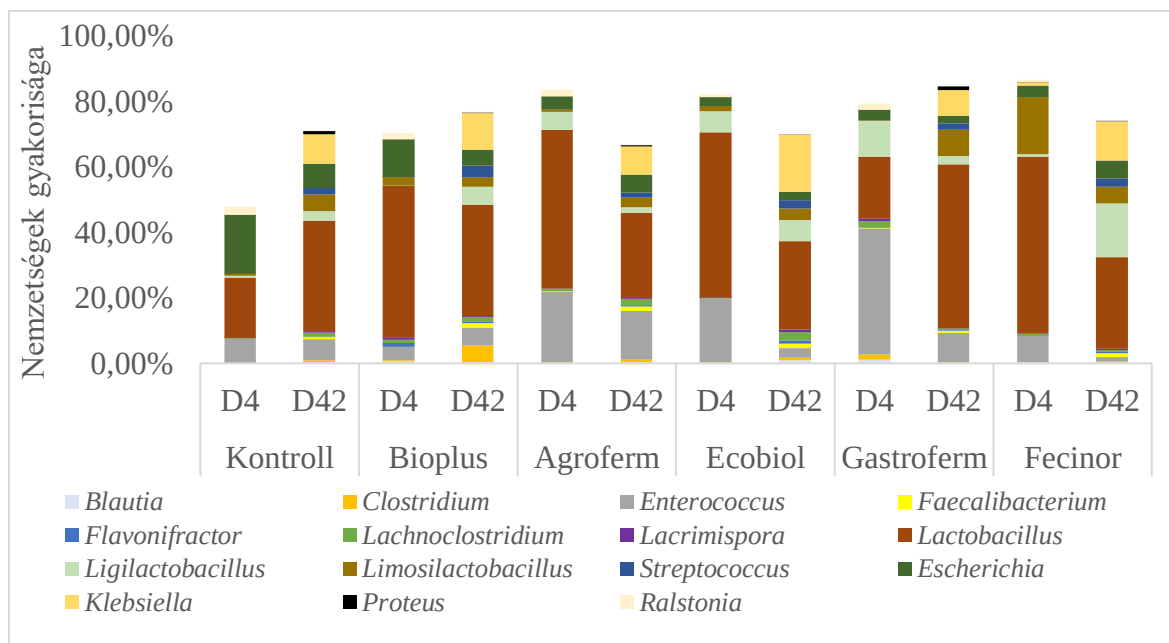
fenotípusos rezisztencia mögött feltételezhető, rezisztencia gének azonosítása történt

5.5. A bélmikrobiom összetétele és antimikrobiális rezisztencia génhordozása

A minták között átlagosan 36 549 401 read-et kaptunk a baktériumok országából klasszifikálva. A genus szintjén klasszifikált read-ek átlagos száma 29 277 955 volt, ugyanez faj szintjén 25 885 945 volt. Az ún. core-bacteriome alapjául a minták legalább 10%-ában, minimum 1%-kal jelen levő genusokat vettük alapul.

Törzs szintjén a *Firmicutes* és *Proteobacteria* voltak meghatározóak. Ezek aránya a kontroll csoport esetén a felnevelés során úgy változott, hogy a *Firmicutes* aránya megnőtt (28,5% ⇒ 59%), *Proteobacteria* esetén pedig csökkent (66% ⇒ 31%). Bioplus etetése során azt tapasztaltuk, hogy ezek aránya közel azonos maradt (63,5% ⇒ 66% és 26,5% ⇒ 25%), míg az összes többi probiotikum etetése során a kontroll csoporthoz képest fordítva alakult a megoszlás, a kezdeti sokkal magasabb *Firmicutes* arány a felnevelés végére jelentősen csökkent, a *Proteobacteria* esetén pedig fordítva. A *Bacteroidetes* aránya a kontroll csoportban jelentősen megnőtt (0,04% ⇒ 10,03%), míg az összes többi csoportban <1% maradt. A tiamulinnal és florfenikollal történő dúsítás hatására az Ecobiol-lal etetett csoport

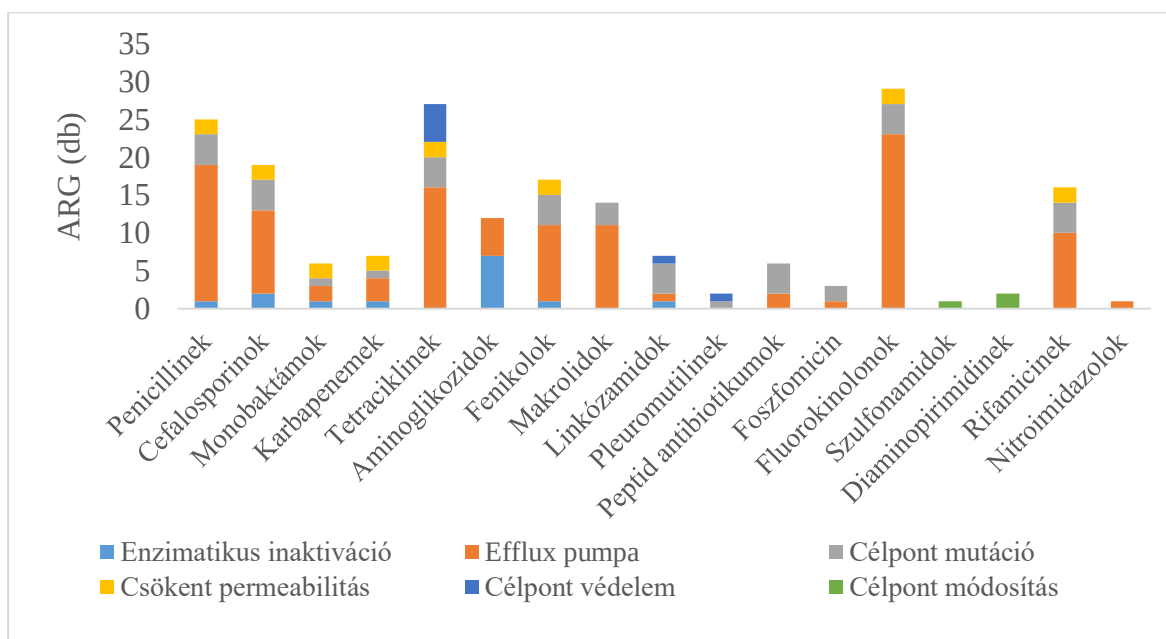
mintákban a Gram-pozitív baktériumokat magukban foglaló *Firmicutes* törzs aránya jelentősen lecsökkent, mind a felnevelés elején (81% $\Rightarrow$ 1,3%) és végén (64% $\Rightarrow$ 4%); a Gram-negatív baktériumokat magukban foglaló *Proteobacteria* esetén pedig arányuk jelentősen megnőtt (6% $\Rightarrow$ 97%, 25,5% $\Rightarrow$ 93,5%).



2. ábra Az egyes minták összetétele és változása a felnevelés, és a különböző etetett probiotikumok hatására nemzetség szintjén, az összes szekvencia %-os részeként kifejezve. D – nap.

Nemzetség szintjén a *Lactobacillus* nemzetség dominál a legtöbb mintában, aránya a felnevelés során a kontroll csoportban nőtt (18,5% $\Rightarrow$ 34%), a kezelt csoportok közül csak a Gastroferm esetén figyeltünk meg a kontrollhoz hasonló növekedést (19% $\Rightarrow$ 50%), az összes többi csoportban csökkent az aránya. A második domináns nemzetség az *Enterococcus* nemzetség, melynek aránya a Bioplus kivételével a felnevelés során a kontroll mintában (7,5% $\Rightarrow$ 6,5%) és az összes többi mintában csökkent, Bioplus esetén növekedést figyeltünk meg (4% $\Rightarrow$ 5,5%). A *Proteobacteria* törzsbe tartozó *Escherichia* nemzetségnél Agroferm (4% $\Rightarrow$ 5,5%) és Fecinor (3,5% $\Rightarrow$ 5,5%) esetén növekedést, az összes többi csoportnál csökkenést tapasztaltunk. A *Klebsiella* nemzetség aránya viszont a felnevelés során mindegyik csoport esetén jelentős mértékben megnőtt (Kontroll 0,1% $\Rightarrow$ 9%, Bioplus 0,05% $\Rightarrow$ 11%, Agroferm 0,02% $\Rightarrow$ 8,5%, Ecobiol 0,06% $\Rightarrow$ 17,5%, Gastroferm 0,02% $\Rightarrow$ 8%, Fecinor 1,01% $\Rightarrow$ 12%). Az Ecobiol csoportból dúsításra levett minták esetén nemzetség szintjén is dominánsan a Gram-negatív baktériumok szelekciója figyelhető meg, a felnevelés végén vett mintákban *Escherichia* esetén 2,5% $\Rightarrow$ 21%, *Proteus* esetén 0,09% $\Rightarrow$ 10% növekedést figyeltünk meg (**2. ábra**).

Összesen 172-féle ARG-t azonosítottunk a mintákban. Az egyes géneket csoportosítva az antibiotikum hatóanyag csoportok és a rezisztencia mechanizmusa szerint jelentős különbségeket nem találtunk a kontroll csoport és az egyes készítményekkel etetett csoportok között, sem a felnevelés kezdetén, sem a felnevelés végén (**3. ábra**).



3. ábra Az Ecobiol csoport 42. napján vett minta szekvenálása során azonosított ARG-k gyakorisága hatóanyag csoportonként, az egyes rezisztencia mechanizmusok függvényében (>90% lefedettség).

Az *AAC(6')-II* gén (aminoglikozidok; enzimatis inaktiváció), az *eatA* gén (pleuromutilinek; célpont védelem) és az *efmA* gén (makrolidok és fluorokinolonok; efflux pumpa) a felnevelés előtt vett mintákban fordult elő, majd a felnevelés végén vett mintákból eltűnt, kivéve a Gastroferm probiotikummal etetett csoportot, viszont itt maga a probiotikum is hordozta ezeket a géneket.

A dúsítás hatására azonban jelentős változásokat tapasztaltunk a minta ARG készletében. Egyrészt több olyan gén is eltűnt, melyek Gram-pozitív baktériumok ellen alakítanak ki rezisztenciát. Másrészt megfigyeltünk olyan géneket, melyek csak ebben a mintában fordultak elő: *ACT-40* és *SHV-38* (β -laktámok; enzimatis inaktiváció), *adeF* (fluorokinolonok, tetraciklinek; efflux pumpa), *arnT* és *eptB* (peptidek; célpont mutáció), *fosA2* és *fosA6* (foszfomicin; enzimatis inaktiváció), *kpnG*, *lptD*, *oqxA*, és *oqxB* (multidrug; efflux pumpa), *ompK37* (β -laktámok; csökkent permeabilitás), *ompA* (peptidek, csökkent permeabilitás), *ramA* (multidrug; efflux pumpa és csökkent permeabilitás).

Különösen aggasztó, hogy több mintából már napos korban kimutattuk a kiterjedt spektrumú β -laktamáz (ESBL) termelésért felelős *SHV-38*, *TEM-1* és *TEM-163* géneket.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásunk során ötféle baromfira engedélyezett probiotikum tartalmú készítményt vizsgáltunk brojlersírkékkel etetve, a teljes felnevelés ideje alatt (42 nap). A kontroll csoport és a probiotikummal etetett csoportok között a súlygyarapodás tekintetében nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni ($p>0,05$), azonban szakmailag releváns mértékben meghaladta a 4. élethéten a legtöbb készítmény (+3-6%) etetése a fajtastandardot. Az 5. élethéten ugyanez már csak a Bioplus YC (+3%) és az Ecobiol WX (+3%) esetén volt megfigyelhető. A kontrollhoz képest az Ecobiol csoport a teljes felnevelés ideje alatt jelentősen jobb súlygyarapodást ért el. Xu és mtsai. kutatásuk során *Bacillus subtilis* és *Bacillus licheniformis* etetését követően (10^9 CFU/g), a 360 db kakassal végzett vizsgálat során szignifikáns javulást ($p<0,05$) mutattak ki az etetés hatására a súlygyarapodásban és takarmányfelvételben is [152]. Vizsgálataink során ugyanezeket a probiotikumokat etetve (Bioplus), mi nem mutattunk ki szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest ($p>0,05$). Ma és mtsai. 240 db kakast vizsgálva ugyancsak *Bacillus subtilis* esetén szignifikánsan jobb súlygyarapodást ($p=0,022$) állapítottak meg a 42. napon, a kontrollhoz képest [153], ellentétben a mi eredményeinkkel ($p=0,32$). Trela és mtsai. 400 db Ross308-as nőivarú brojlersírkékkel etetett *Bacillus licheniformis* vizsgálata során az 1-10. napban ($p=0,016$) és a 11-22. nap között ($p=0,018$) találtak szignifikáns különbséget a súlygyarapodásban a kontroll csoporthoz képest, a 23-36. nap között ($p=0,466$) már nem volt ez megfigyelhető [154]. Wang és mtsai. *Lactobacillus plantarum* etetése esetén csak a 21. napon mért súlygyarapodásban mutattak ki szignifikáns különbséget [155]. Reuben és mtsai. *Pediococcus acidilactici* önmagában történő etetése során nem találtak szignifikáns különbséget a súlygyarapodásban a kontroll csoporthoz képest [156]. Wu és mtsai. *Enterococcus faecium* etetése során csak a 22-35. nap között tapasztaltak szignifikánsan jobb súlygyarapodást ($p=0,045$) a kontrollhoz képest [157], Han és mtsai. pedig csak a 42. napon mért adatok esetén [158]. Eredményeinket más kutatásokkal összevetve megállapítottuk, hogy szignifikáns különbség kimutatásához növelni kell a mintaelemszámot.

Törzs szintjén a bélmikrobiomban a *Firmicutes* és *Proteobacteria* törzsek voltak meghatározóak. A felnevelés során arányuk változott, a kontrollban a *Firmicutes* aránya megnőtt ($28,5\% \Rightarrow 59\%$), a *Proteobacteria* csökkent ($66\% \Rightarrow 31\%$). Bioplus etetése során azt tapasztaltuk, hogy ezek aránya közel azonos maradt ($63,5\% \Rightarrow 66\%$ és $26,5\% \Rightarrow 25\%$), míg az összes többi probiotikum etetése során kezdetben volt magasabb a *Firmicutes* arány, mely később lecsökkent, a *Proteobacteria* esetén pedig fordítva. Ma és mtsai. Shannon-

diverzitás eloszlás vizsgálata során a bélmikrobiom sokféleségben hozzánk hasonló módon nem találtak szignifikáns különbséget a kontroll és kezelt csoportok között; szintén a *Firmicutes* és a *Proteobacteria* törzseket találták dominánsnak; *Bacillus subtilis*-t etetve szintén magasabb *Firmicutes* arányt mutattak ki [153], Han és mtsai. szintén nem találtak különbséget a diverzitásban *Enterococcus faecalis* etetése során [158], Trela és mtsai. is csak a *jejunum* bélszakaszából vett bélsárminták esetén figyeltek meg szignifikáns eltérést [154]. Vizsgálataink során csak a kontroll csoportban mutattunk ki a felnevelés végén vett mintából magas (10,03%) *Bacteroidetes* törzs arányt, az összes többi kezelt csoportban arányuk <1% volt, ez egybevág Ma és mtsai. eredményeivel, akik probiotikum kezelés hatására jelentős csökkenésüket írták le [153]. Gao és mtsai. vizsgálati eredményei törzs szintjén egybevágnak a mi eredményeinkkel, összehasonlítva *Firmicutes* 63,58% vs. 68%, *Proteobacteria* 17,31% vs. 23,8%, *Actinobacteria* 0,23% vs. 0,6% [159].

A *Lactobacillus* nemzetség aránya a felnevelés során a kontroll csoportban nőtt (18,5% $\Rightarrow$ 34%), a kezelt csoportok közül csak a Gastroferm esetén figyeltünk meg növekedést (19% $\Rightarrow$ 50%), az összes többi csoportban csökkent az aránya. Az *Enterococcus* nemzetség aránya a felnevelés során a Bioplus kivételével a kontroll mintában (7,5% $\Rightarrow$ 6,5%) és az összes többi mintában csökkent, Bioplus esetén növekedést figyeltünk meg (4% $\Rightarrow$ 5,5%). Az *Escherichia* nemzetségnél Agroferm (4% $\Rightarrow$ 5,5%) és Fecinor (3,5% $\Rightarrow$ 5,5%) esetén növekedést, az összes többi csoportnál csökkenést tapasztaltunk. A *Klebsiella* nemzetség aránya viszont a felnevelés során mindegyik csoport esetén jelentős mértékben megnőtt (Kontroll 0,1% $\Rightarrow$ 9%, Bioplus 0,05% $\Rightarrow$ 11%, Agroferm 0,02% $\Rightarrow$ 8,5%, Ecobiol 0,06% $\Rightarrow$ 17,5%, Gastroferm 0,02% $\Rightarrow$ 8%, Fecinor 1,01% $\Rightarrow$ 12%). Sureshkumar és mtsai. hasonlóan magas, 22,82%-os *Lactobacillus* arányt [160], Gao és mtsai. 16,69%-os arányt találtak [159]; *Enterococcus* nemzetség esetén viszont alacsonyabb (2,17%) arányt; *Blautia* esetén 4,34%, *Clostridium* esetén 1,08% előfordulást írtak le [160], mi viszont utóbbi két esetben átlagosan 0,41%-os és 0,84%-os arányt mutattunk ki. Khan és mtsai. hasonló eredményt mutattak ki *Klebsiella* abundanciája esetén a kontroll csoportnál és probiotikus kezelés hatására [161], mint amilyen mértékű csökkenést mi is tapasztaltunk.

A készítmények ARG génkészletét vizsgálva efflux pumpát kódoló gének közül a legtöbbet a BioPlus készítményben azonosítottunk, kiemelendő a fluorokinolon rezisztenciát okozó *blt* gén és *bmr* gén, előbbi Ahmed és mtsai. *Bacillus subtilis*-ben azonosították [95]. utóbbit Neyfakh és mtsai., valamint Klyachko és mtsai. írták le [96, 97]. Peptid antibiotikum rezisztencia szempontjából jelentős *bcrA* és *bcrB* géneket találtunk, Podlessek

és mtsai. *Bacillus licheniformis*ban írták le [84]. Meg kell említeni az aminoglikozid, tetraciklin és fenikol multirezisztenciáért felelős *ykkC* és *ykkD* gének jelenlétét is, melyet *Bacillus subtilis* esetén Jack és mtsai. írták le [101]. Az egyik legfontosabb rezisztencia mechanizmus az enzimatis inaktiváció, ilyen rezisztenciát kódoló *aadK* gént azonosítottunk, mely aminoglikozid rezisztenciát okoz, Argerso és mtsai. *Bacillus licheniformis* esetén írták le a gént [82]. Efflux pumpák közül *mphK* gén került azonosításra, mely makrolidok rezisztenciáját okozhatja, Pawlowski és mtsai. *Bacillus subtilis* esetén mutatták ki [99], valamint a *bcrC* gént, mely célpont mutációként peptid antibiotikum rezisztenciát okozhat [84]. A célpont mutációk közül ki kell emelni az *mprF* gént, mely peptid antibiotikum rezisztenciához vezethet, *Bacillus subtilis* eredetű génként került azonosításra [92–94]. Az Agroferm és Gastroferm készítményekben makrolid és fluorokinolon rezisztenciát eredményező efflux pumpát kódoló *efmA* gént írtunk le, amit Urshev és mtsai. *Enterococcus faecium* esetén MFS-típusú pumpaként leírtak [118]. Az AAC(6')-II gén megtalálható volt az Agroferm, a Gastroferm és a Fecinor Soluble Plus készítményekben is, mely szintén aminoglikozid rezisztencia kialakításáért felelős gén, amit *Enterococcus faecium* esetén azonosítottak [118].

A bélmikrobiom ARG készletében a 4 napos és 42 napos, a kontroll és az egyes etetett csoportok között jelentős különbséget nem találtunk. Chen és mtsai. ellenben leírták, hogy a probiotikum etetése az ARG gazdagságát (Fisher-féle alfa) csökkentette [75]. Az AAC(6')-II gén közegészségügyi szempontból jelentős, aminoglikozidok enzimatis inaktivációját kódoló gén, mely az Agroferm etetett csoport kivételével a felnevelés végére minden csoportból eltűnt, a gént *Enterococcus faecium* esetén Urshev és mtsai. írták le [118]. Különösen aggasztó a már napos korban az összes csoportból kimutatott TEM-1 gén és az egyik csoportból kimutatott TEM-163 gén, valamint a dúsítás hatására megjelent SHV-38 gén jelenléte. Hassen és mtsai. egy átfogó vizsgálat során csirke bélsár és hús minták 25,8%-a esetén mutatták ki a TEM-1 gén jelenlétét [162]. Az SHV-38 egy *Klebsiella pneumoniae* fajból azonosított ESBL termelésért felelős gén [163], korábban csirke bélsárból még nem azonosították. A TEM-163 gén szintén ESBL termelésért felel, melyet *E. coli* fajból mutattak ki [164], azonban csirke bélsárban korábban ezt sem írták még le.

A dúsítás hatására bekövetkező ARG változás oka a Gram-negatív baktériumok szelekciója, illetve a gének feldúsulása. Olyan ARG-t nem azonosítottunk, ami az etetett készítményekből átadódott volna a csirkék bélmikrobiomja részére. A továbbiakban elvégezzük az egyes gének taxon klasszifikációját, hogy pontosabb képet kapjunk az egyes gének eredetéről, valamint vizsgáljuk azok MGE, fágon vagy plazmidon való kódolását.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az antimikrobiális rezisztencia az emberiség egyik legnagyobb kihívása. Gazdasági használlataink termékei kockázatot jelenthetnek mikróbákkal történő kontamináció és velük együtt antimikrobiális rezisztencia gének (ARG) terjesztésében, azaz a horizontális géntranszfer lehetőségének a megteremtésében. Az antibiotikum felhasználás csökkentésére számos alternatív megoldás létezik, ilyen a probiotikumok használata, melyek olyan hasznos mikroorganizmusok, amik megfelelő módon adva kedvező hatással bírnak az élő szervezetre. Keveset vizsgált terület ezek ARG hordozása, és a bélmikrobiomra, különös tekintettel a bélrezisztoma változásra gyakorolt hatásuk.

Kutatásunk során új generációs szekvenálás segítségével baromfifélékre engedélyezett probiotikumok ARG hordozását vizsgáltuk, különös tekintettel azok plazmidon, fágon vagy MGE-ként való kódolására. Ezen kívül vizsgáltuk a brojlersirke teljes felnevelési időszaka alatt a különböző probiotikum készítmények etetésének hatására bekövetkező bélrezisztoma és bélmikrobiom változását, valamint összefüggést kerestünk az egyes azonosított ARG-k és a minimális gátló koncentráció (MIC) értékek meghatározását követően a rezisztencia fenotípusos kifejeződése között.

Az egyes készítményekben kritikusan fontos antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mechanizmus kialakulásáért felelős géneket azonosítottunk, mint fluorokinolon efflux pumpát kódoló géneket, peptid antibiotikum célpont mutációt és efflux pumpát kódoló géneket. Továbbá közegészségügyi szempontból jelentős aminoglikozidok enzimatis inaktivációját kódoló *aadK* és *AAC(6')-II* géneket is azonosítottunk. Számos ún. multidrug rezisztenciát kódoló gén is azonosításra került (*vmlR*, *ykkC*, *ykkD*, *msrC*, *clbA*, *eatAv*). Azonban sem MGE-t, sem plazmidon kódolt gént nem találtunk; fágon kódolt gént is csak egy esetben mutattunk ki (*DfrA43*). A fenotípusos vizsgálat során MIC érték meghatározást végeztünk és számos esetben a rezisztencia kialakulásáért felelős gén megtalálható volt a törzsekben. A bélsárminták metagenom vizsgálata során genus szintjén az egyes csoportonként, az idő és etetés függvényében Shannon-diverzitás eloszlás és Mann-Whitney teszt alkalmazása során sem találtunk szignifikáns különbséget a párosított minták között.

A probiotikumok is hordozhatnak közegészségügyi szempontból jelentős ARG-ket. A jövőben érdemes több, a probiotikumok molekuláris genetikai módszerekkel történő vizsgálatára irányuló kutatást végezni, az egyes gének kifejeződésének vizsgálatához pedig transzkriptomikai vizsgálatok szükségesek.

8. SUMMARY

Antimicrobial resistance is one of the greatest challenges facing humanity. The products of our farm animals can pose a risk of contamination by mycobacteria and with them the spread of antimicrobial resistance genes, i.e. the potential for horizontal gene transfer. There are several alternatives to reduce antibiotic use, such as the use of probiotics, which are beneficial micro-organisms that, when properly administered, have a beneficial effect on the living organism. A little studied area is the antimicrobial resistance gene (ARG) expression and its effect on the gut microbiome, in particular on changes in the gut resistome.

Our study investigated the ARG carriage of probiotics approved for poultry using next-generation sequencing, with a focus on their encoding as plasmid, phage or mobile genetic elements. In addition, we investigated the changes in the intestinal resistome and gut microbiome during the whole rearing period of broiler chickens in response to feeding different probiotic preparations and looked for a correlation between the phenotypic expression of resistance after determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) values for each identified ARG and the ARGs.

We identified genes responsible for the development of antibiotic resistance mechanism critical in each formulation as fluoroquinolone efflux pump encoding genes, peptide antibiotic target mutation and efflux pump encoding genes. In addition, genes encoding enzymatic inactivation of aminoglycosides of public health relevance, *aadK* and *AAC(6')-Ii*, were identified. Several genes coding for multidrug resistance were also identified (*vmlR*, *ykkC*, *ykkD*, *msrC*, *clbA*, *eatAv*). However, no mobile genetic element or plasmid-encoded gene was found; only one phage-encoded gene was detected (*DfrA43*). MIC values were determined in the phenotypic analysis and in several cases the gene responsible for the development of resistance was found in the strains. In the metagenomic analysis of faecal samples, no significant differences were found between the paired samples at genus level, time and feeding as a function of time and feeding using Shannon diversity distribution and Mann-Whitney test.

Probiotics may also carry ARGs of public health significance. In the future, more research on probiotics using molecular genetic methods is worthwhile, and transcriptomic studies are needed to investigate the expression of individual genes.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Jim O (2014) Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations
2. Harbarth S, Balkhy HH, Goossens H, Jarlier V, Kluytmans J, Laxminarayan R, Saam M, Van Belkum A, Pittet D, for the World Healthcare-Associated Infections Resistance Forum participants (2015) Antimicrobial resistance: one world, one fight! *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 4:49. <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0091-2>
3. Teillant A, Gandra S, Barter D, Morgan DJ, Laxminarayan R (2015) Potential burden of antibiotic resistance on surgery and cancer chemotherapy antibiotic prophylaxis in the USA: a literature review and modelling study. *Lancet Infect Dis* 15:1429–1437. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00270-4)
4. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, Laxminarayan R (2014) Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis* 14:742–750. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7)
5. Fleming SA (1946) *Chemotherapy: Yesterday, To-day, and To-morrow*. CUP Archive
6. Gálfi P, Csikó G, Jerzsele Á (2015) *Állatorvosi gyógyszerteran III., második, javított kiadás*. Robbie-Vet Kft., Budapest
7. De Pascale G, Wright GD (2010) Antibiotic resistance by enzyme inactivation: from mechanisms to solutions. *Chembiochem* 11:1325–1334. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000067>
8. Li X-Z, Nikaido H (2009) Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69:1555–1623. <https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000>
9. Takahata S, Ida T, Hiraishi T, Sakakibara S, Maebashi K, Terada S, Muratani T, Matsumoto T, Nakahama C, Tomono K (2010) Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35:333–337. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.011>
10. Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI (2003) Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2850–2858. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2850-2858.2003>
11. SAKAMOTO Y, FURUKAWA S, OGIHARA H, YAMASAKI M (2003) Fosmidomycin Resistance in Adenylate Cyclase Deficient (cya) Mutants of *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67:2030–2033. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.2030>
12. Paterson GK, Larsen AR, Robb A, Edwards GE, Pennycott TW, Foster G, Mot D, Hermans K, Baert K, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA (2012) The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *J Antimicrob Chemother* 67:2809–2813. <https://doi.org/10.1093/jac/dks329>
13. García-Álvarez L, Holden MTG, Lindsay H, Webb CR, Brown DFJ, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RLR, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA (2011) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 11:595–603. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70126-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70126-8)
14. Hartman BJ, Tomasz A (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 158:513–516. <https://doi.org/10.1128/jb.158.2.513-516.1984>
15. Ubukata K, Nonoguchi R, Matsuhashi M, Konno M (1989) Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J Bacteriol* 171:2882–2885. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2882-2885.1989>
16. Fuda C, Suvorov M, Vakulenko SB, Mobashery S (2004) The Basis for Resistance to β -Lactam Antibiotics by Penicillin-binding Protein 2a of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus**. *Journal of Biological Chemistry* 279:40802–40806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403589200>
17. Wilson DN, Hauryliuk V, Atkinson GC, O'Neill AJ (2020) Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nature Reviews Microbiology*
18. Cohen SP, McMurry LM, Levy SB (1988) *marA* locus causes decreased expression of *OmpF* porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170:5416–5422. <https://doi.org/10.1128/jb.170.12.5416-5422.1988>
19. Delcour AH (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* 1794:808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
20. Makino K, Yokoyama K, Kubota Y, Yutsudo CH, Kimura S, Kurokawa K, Ishii K, Hattori M, Tatsuno I, Abe H, Iida T, Yamamoto K, Onishi M, Hayashi T, Yasunaga T, Honda T, Sasakawa C, Shinagawa H (1999) Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak. *Genes Genet Syst* 74:227–239. <https://doi.org/10.1266/ggs.74.227>
21. Zhang D, Jiang B, Xiang Z, Wang S (2008) Functional characterisation of altered outer membrane proteins for tetracycline resistance in *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 32:315–319. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.04.015>
22. Lin X, Yang M, Li H, Wang C, Peng X-X (2014) Decreased expression of LamB and Omp1 complex is crucial for antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *J Proteomics* 98:244–253. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.12.024>
23. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME (2014) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11:506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

24. Lilly DM, Stillwell RH (1965) Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.147.3659.747>
25. Afric RF (1989) Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66:365–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>
26. Rijkers GT, de Vos WM, Brummer R-J, Morelli L, Corthier G, Marteau P (2011) Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. *Br J Nutr* 106:1291–1296. <https://doi.org/10.1017/S000711451100287X>
27. Sniffen JC, McFarland LV, Evans CT, Goldstein EJC (2018) Choosing an appropriate probiotic product for your patient: An evidence-based practical guide. *PLOS ONE* 13:e0209205. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209205>
28. Gareau MG, Sherman PM, Walker WA (2010) Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7:503–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.117>
29. Simon O (2005) Micro-Organisms as Feed Additives – Probiotics. *Adv Pork Prod* 16:161–167
30. Macpherson AJ, Uhr T (2004) Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1091334>
31. Matsuo K, Ota H, Akamatsu T, Sugiyama A, Katsuyama T (1997) Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut* 40:782–789. <https://doi.org/10.1136/gut.40.6.782>
32. Maqueda M, Sánchez-Hidalgo M, Fernández M, Montalbán-López M, Valdivia E, Martínez-Bueno M (2008) Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 32:2–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00087.x>
33. Weinberg ED (1997) The Lactobacillus Anomaly: Total Iron Abstinence. *Perspectives in Biology and Medicine* 40:578–583. <https://doi.org/10.1353/pbm.1997.0072>
34. Collado M c., Meriluoto J, Salminen S (2007) Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology* 45:454–460. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02212.x>
35. Mack DR (2003) Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52:827–833. <https://doi.org/10.1136/gut.52.6.827>
36. Hess P, Altenhöfer A, Khan AS, Daryab N, Kim KS, Hacker J, Oelschlaeger TA (2004) A Salmonella fim Homologue in Citrobacter freundii Mediates Invasion In Vitro and Crossing of the Blood-Brain Barrier in the Rat Pup Model. *Infect Immun* 72:5298–5307. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.9.5298-5307.2004>
37. Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y (2004) Probiotic Bifidobacteria Protect Mice from Lethal Infection with Shiga Toxin-Producing Escherichia coli O157:H7. *Infect Immun* 72:2240–2247. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2240-2247.2004>
38. O'Mahony L, Feeney M, O'Halloran S, Murphy L, Kiely B, Fitzgibbon J, Lee G, O'Sullivan G, Shanahan F, Collins JK (2001) Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 15:1219–1225. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2001.01027.x>
39. Guelpen BV, Hultdin J, Johansson I, Hallmans G, Stenling R, Riboli E, Winkvist A, Palmqvist R (2006) Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut* 55:1461–1466. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.085480>
40. Fredenucci I, Chomarat M, Boucaud C, Flandrois JP (1998) Saccharomyces boulardii fungemia in a patient receiving Ultra-levure therapy. *Clin Infect Dis* 27:222–223. <https://doi.org/10.1086/517685>
41. Henry S, D'Hondt L, André M, Holemans X, Canon JL (2004) Saccharomyces cerevisiae fungemia in a head and neck cancer patient: a case report and review of the literature. *Acta Clin Belg* 59:220–222. <https://doi.org/10.1179/acb.2004.032>
42. Lolis N, Veldekis D, Moraitou H, Kanavaki S, Velegraki A, Triandafyllidis C, Tasioudis C, Pefanis A, Pneumatikos I (2008) Saccharomyces boulardii fungaemia in an intensive care unit patient treated with caspofungin. *Crit Care* 12:414. <https://doi.org/10.1186/cc6843>
43. Muñoz P, Bouza E, Cuenca-Estrella M, Eiros JM, Pérez MJ, Sánchez-Somolinos M, Rincón C, Hortal J, Peláez T (2005) Saccharomyces cerevisiae fungemia: an emerging infectious disease. *Clin Infect Dis* 40:1625–1634. <https://doi.org/10.1086/429916>
44. Niault M, Thomas F, Prost J, Ansari FH, Kalfon P (1999) Fungemia due to Saccharomyces species in a patient treated with enteral Saccharomyces boulardii. *Clin Infect Dis* 28:930. <https://doi.org/10.1086/517255>
45. De Groote MA, Frank DN, Dowell E, Glode MP, Pace NR (2005) Lactobacillus rhamnosus GG bacteremia associated with probiotic use in a child with short gut syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 24:278–280. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000154588.79356.e6>
46. Ledoux D, Labombardi VJ, Karter D (2006) Lactobacillus acidophilus bacteraemia after use of a probiotic in a patient with AIDS and Hodgkin's disease. *Int J STD AIDS* 17:280–282. <https://doi.org/10.1258/095646206776253507>
47. Richard V, Van der Auwera P, Snoeck R, Daneau D, Meunier F (1988) Nosocomial bacteremia caused by Bacillus species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7:783–785. <https://doi.org/10.1007/BF01975049>
48. Vahabnezhad E, Mochon AB, Wozniak LJ, Ziring DA (2013) Lactobacillus bacteremia associated with probiotic use in a pediatric patient with ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol* 47:437–439. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e318279abf0>
49. Tommasi C, Equitani F, Masala M, Ballardini M, Favaro M, Meledandri M, Fontana C, Narciso P, Nicastrì E (2008) Diagnostic difficulties of Lactobacillus casei bacteraemia in immunocompetent patients: A case report. *Journal of Medical Case Reports* 2:315. <https://doi.org/10.1186/1752-1947-2-315>
50. Land MH, Rouster-Stevens K, Woods CR, Cannon ML, Cnota J, Shetty AK (2005) Lactobacillus sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics* 115:178–181. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-2137>

51. Oggioni MR, Pozzi G, Valensin PE, Galieni P, Bigazzi C (1998) Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. *J Clin Microbiol* 36:325–326. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.1.325-326.1998>
52. Ohishi A, Takahashi S, Ito Y, Ohishi Y, Tsukamoto K, Nanba Y, Ito N, Kakiuchi S, Saitoh A, Morotomi M, Nakamura T (2010) *Bifidobacterium* septicemia associated with postoperative probiotic therapy in a neonate with omphalocele. *J Pediatr* 156:679–681. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.041>
53. Zein EF, Karaa S, Chemaly A, Saidi I, Daou-Chahine W, Rohban R (2008) [*Lactobacillus rhamnosus* septicemia in a diabetic patient associated with probiotic use: a case report]. *Ann Biol Clin (Paris)* 66:195–198. <https://doi.org/10.1684/abc.2008.0210>
54. Mackay AD, Taylor MB, Kibbler CC, Hamilton-Miller JMT (1999) *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clin Microbiol Infect* 5:290–292. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1999.tb00144.x>
55. Presterl E, Kneifel W, Mayer HK, Zehetgruber M, Makristathis A, Graninger W (2001) Endocarditis by *Lactobacillus rhamnosus* due to yogurt ingestion? *Scand J Infect Dis* 33:710–714. <https://doi.org/10.1080/00365540110026953>
56. Conen A, Zimmerer S, Trampuz A, Frei R, Battegay M, Elzi L (2009) A pain in the neck: probiotics for ulcerative colitis. *Ann Intern Med* 151:895–897. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-12-200912150-00020>
57. Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, Pietarinen I, Saxelin M, Tynkkynen S, Koskela M (1999) Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis* 28:1159–1160. <https://doi.org/10.1086/514766>
58. Vaarala O (2003) Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. *Clin Exp Allergy* 33:1634–1640. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2003.01835.x>
59. Veckman V, Miettinen M, Pirhonen J, Sirén J, Matikainen S, Julkunen I (2004) *Streptococcus pyogenes* and *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 75:764–771. <https://doi.org/10.1189/jlb.1003461>
60. Turjeman S, Koren O (2021) ARGuing the case for (or against) probiotics. *Trends Microbiol* 29:959–960. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.09.004>
61. Montassier E, Valdés-Mas R, Batard E, Zmora N, Dori-Bachash M, Suez J, Elinav E (2021) Probiotics impact the antibiotic resistance gene reservoir along the human GI tract in a person-specific and antibiotic-dependent manner. *Nat Microbiol* 6:1043–1054. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00920-0>
62. Arias CA, Contreras GA, Murray BE (2010) Management of multidrug-resistant enterococcal infections. *Clinical Microbiology and Infection* 16:555–562. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03214.x>
63. Arias CA, Murray BE (2012) The rise of the *Enterococcus*: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 10:266–278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2761>
64. Gao W, Howden BP, Stinear TP (2018) Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Current Opinion in Microbiology* 41:76–82. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.030>
65. Doron S, Snyderman DR (2015) Risk and Safety of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases* 60:S129–S134. <https://doi.org/10.1093/cid/civ085>
66. Huang Y-F, Liu P-Y, Chen Y-Y, Nong B-R, Huang I-F, Hsieh K-S, Chen K-T (2014) Three-Combination Probiotics Therapy in Children With *Salmonella* and Rotavirus Gastroenteritis. *Journal of Clinical Gastroenterology* 48:37–42. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31828f1c6e>
67. Hempel S, Newberry S, Ruelaz A, Wang Z, Miles JNV, Suttrop MJ, Johnsen B, Shanman R, Slusser W, Fu N, Smith A, Roth B, Polak J, Motala A, Perry T, Shekelle PG (2011) Safety of probiotics used to reduce risk and prevent or treat disease. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)* 1–645
68. Ganguly NK, Bhattacharya SK, Sesikeran B, Nair GB, Ramakrishna BS, Sachdev HPS, Batish VK, Kanagasabapathy AS, Muthuswamy V, Kathuria SC, Katoch VM, Satyanarayana K, Toteja GS, Rahi M, Rao S, Bhan MK, Kapur R, Hemalatha R (2011) ICMR-DBT Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food. *Indian J Med Res* 134:22–25
69. Authority (EFSA) EFS (2005) Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA Journal* 3:226. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.226>
70. Kovács D, Palkovicsné Pézsa N, Farkas O, Jerzsele Á (2021) Antibiotikum-alternatívák a sertéstartásban : Irodalmi összefoglaló. *MÁL* 143:281–282
71. Sanders ME, Akkermans LMA, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, Huys G, Levy DD, Lutgendorff F, Mack D, Phothirath P, Solano-Aguilar G, Vaughan E (2010) Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 1:164–185. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127>
72. Vankerckhoven V, Huys G, Vancanneyt M, Vael C, Klare I, Romond M-B, Entenza JM, Moreillon P, Wind RD, Knol J, Wiertz E, Pot B, Vaughan EE, Kahlmeter G, Goossens H (2008) Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE project. *Trends in Food Science & Technology* 19:102–114. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.013>
73. Kastner S, Perreten V, Bleuler H, Hugenschmidt G, Lacroix C, Meile L (2006) Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Syst Appl Microbiol* 29:145–155. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.07.009>
74. Huys G, D'Haene K, Swings J (2006) Genetic basis of tetracycline and minocycline resistance in potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* strain CCUG 43738. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1550–1551. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1550-1551.2006>

75. Chen Y-C, Yu Y-H (2022) *Bacillus licheniformis*-fermented products and enramycin differentially modulate microbiota and antibiotic resistome in the cecal digesta of broilers. *Poult Sci* 101:102010. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102010>
76. Wang Y, Hu Y, Liu F, Cao J, Lv N, Zhu B, Zhang G, Gao GF (2020) Integrated metagenomic and metatranscriptomic profiling reveals differentially expressed resistomes in human, chicken, and pig gut microbiomes. *Environ Int* 138:105649. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105649>
77. Xing S-C, Chen J-Y, Cai Y-F, Huang C-B, Liao X-D, Mi J-D (2021) *Bacillus coagulans* R11 consumption influenced the abundances of cecum antibiotic resistance genes in lead-exposed laying hens. *Environ Pollut* 274:116562. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116562>
78. Zheng M, Zhang R, Tian X, Zhou X, Pan X, Wong A (2017) Assessing the Risk of Probiotic Dietary Supplements in the Context of Antibiotic Resistance. *Frontiers in Microbiology* 8:
79. Fatahi-Bafghi M, Naseri S, Alizehi A (2022) Genome analysis of probiotic bacteria for antibiotic resistance genes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 115:375–389. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01703-7>
80. Hansen LH, Planellas MH, Long KS, Vester B (2012) The order Bacillales hosts functional homologs of the worrisome cfr antibiotic resistance gene. *Antimicrob Agents Chemother* 56:3563–3567. <https://doi.org/10.1128/AAC.00673-12>
81. Tojo S, Tanaka Y, Ochi K (2015) Activation of Antibiotic Production in *Bacillus* spp. by Cumulative Drug Resistance Mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7799–7804. <https://doi.org/10.1128/AAC.01932-15>
82. Agersø Y, Bjerre K, Brockmann E, Johansen E, Nielsen B, Siezen R, Stuer-Lauridsen B, Wels M, Zeidan AA (2019) Putative antibiotic resistance genes present in extant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome. *PLoS One* 14:e0210363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210363>
83. Jeong D-W, Lee B, Heo S, Oh Y, Heo G, Lee J-H (2020) Two genes involved in clindamycin resistance of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* identified by comparative genomic analysis. *PLoS One* 15:e0231274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231274>
84. Podlessek Z, Comino A, Herzog-Velikonja B, Zgur-Bertok D, Komel R, Grabnar M (1995) *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance. *Mol Microbiol* 16:969–976. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02322.x>
85. Ohmiya K, Tanaka T, Noguchi N, O'Hara K, Kono M (1989) Nucleotide sequence of the chromosomal gene coding for the aminoglycoside 6-adenylyltransferase from *Bacillus subtilis* Marburg 168. *Gene* 78:377–378. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90241-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90241-2)
86. Noguchi N, Sasatsu M, Kono M (1993) Genetic mapping in *Bacillus subtilis* 168 of the aadK gene which encodes aminoglycoside 6-adenylyltransferase. *FEMS Microbiol Lett* 114:47–52. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(93\)90140-w](https://doi.org/10.1016/0378-1097(93)90140-w)
87. Dai M, Lu J, Wang Y, Liu Z, Yuan Z (2012) In vitro development and transfer of resistance to chlortetracycline in *Bacillus subtilis*. *J Microbiol* 50:807–812. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1454-5>
88. Sakaguchi R, Amano H, Shishido K (1988) Nucleotide sequence homology of the tetracycline-resistance determinant naturally maintained in *Bacillus subtilis* Marburg 168 chromosome and the tetracycline-resistance gene of *B. subtilis* plasmid pNS1981. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 950:441–444. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(88\)90142-X](https://doi.org/10.1016/0167-4781(88)90142-X)
89. Takayuki H, Takayuki I, Noboru T, Kensuke F (1985) Nucleotide sequence of the tetracycline resistance gene of pTHT15, a thermophilic *Bacillus* plasmid: comparison with staphylococcal TcR controls. *Gene* 37:131–138. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90265-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90265-3)
90. Sakaguchi R, Shishido K (1988) Molecular cloning of a tetracycline-resistance determinant from *Bacillus subtilis* chromosomal DNA and its expression in *Escherichia coli* and *B. subtilis*. *Biochim Biophys Acta* 949:49–57. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(88\)90053-x](https://doi.org/10.1016/0167-4781(88)90053-x)
91. Parulekar RS, Barale SS, Sonawane KD (2019) Antibiotic resistance and inhibition mechanism of novel aminoglycoside phosphotransferase APH(5) from *B. subtilis* subsp. *subtilis* strain RK. *Braz J Microbiol* 50:887–898. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00132-z>
92. Hachmann A-B, Sevim E, Gaballa A, Popham DL, Antelmann H, Helmann JD (2011) Reduction in membrane phosphatidylglycerol content leads to daptomycin resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4326–4337. <https://doi.org/10.1128/AAC.01819-10>
93. Hachmann A-B, Angert ER, Helmann JD (2009) Genetic analysis of factors affecting susceptibility of *Bacillus subtilis* to daptomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1598–1609. <https://doi.org/10.1128/AAC.01329-08>
94. Ernst CM, Staubitz P, Mishra NN, Yang S-J, Hornig G, Kalbacher H, Bayer AS, Kraus D, Peschel A (2009) The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. *PLoS Pathog* 5:e1000660. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000660>
95. Ahmed M, Lyass L, Markham PN, Taylor SS, Vázquez-Laslop N, Neyfakh AA (1995) Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J Bacteriol* 177:3904–3910. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.3904-3910.1995>
96. Neyfakh AA, Bidnenko VE, Chen LB (1991) Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4781–4785. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4781>
97. Klyachko KA, Schuldiner S, Neyfakh AA (1997) Mutations affecting substrate specificity of the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Bmr. *J Bacteriol* 179:2189–2193. <https://doi.org/10.1128/jb.179.7.2189-2193.1997>
98. Yoshida K-I, Ohki Y-H, Murata M, Kinehara M, Matsuoka H, Satomura T, Ohki R, Kumano M, Yamane K, Fujita Y (2004) *Bacillus subtilis* LmrA is a repressor of the lmrAB and yxaGH operons: identification of its binding site

- and functional analysis of *lmrB* and *yxaGH*. *J Bacteriol* 186:5640–5648. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5640-5648.2004>
99. Pawlowski AC, Stogios PJ, Koteva K, Skarina T, Evdokimova E, Savchenko A, Wright GD (2018) The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. *Nat Commun* 9:112. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02680-0>
 100. Crowe-McAuliffe C, Graf M, Huter P, Takada H, Abdelshahid M, Nováček J, Murina V, Atkinson GC, Hauryliuk V, Wilson DN (2018) Structural basis for antibiotic resistance mediated by the *Bacillus subtilis* ABCF ATPase VmlR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:8978–8983. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808535115>
 101. Jack DL, Storms ML, Tchieu JH, Paulsen IT, Saier MH (2000) A broad-specificity multidrug efflux pump requiring a pair of homologous SMR-type proteins. *J Bacteriol* 182:2311–2313. <https://doi.org/10.1128/JB.182.8.2311-2313.2000>
 102. Bhukya KK, Bhukya B (2021) Unraveling the probiotic efficiency of bacterium *Pediococcus pentosaceus* OBK05 isolated from buttermilk: An in vitro study for cholesterol assimilation potential and antibiotic resistance status. *PLoS One* 16:e0259702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0259702>
 103. Drago L, Mattina R, Nicola L, Rodighiero V, De Vecchi E (2011) Macrolide resistance and in vitro selection of resistance to antibiotics in *Lactobacillus* isolates. *J Microbiol* 49:651–656. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0470-1>
 104. Aristimuño Ficooseco C, Mansilla FI, Maldonado NC, Miranda H, Fátima Nader-Macias ME, Vignolo GM (2018) Safety and Growth Optimization of Lactic Acid Bacteria Isolated From Feedlot Cattle for Probiotic Formula Design. *Front Microbiol* 9:2220. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02220>
 105. AQUILANTI L, GAROFALO C, OSIMANI A, SILVESTRI G, VIGNAROLI C, CLEMENTI F (2007) Isolation and Molecular Characterization of Antibiotic-Resistant Lactic Acid Bacteria from Poultry and Swine Meat Products. *Journal of Food Protection* 70:557–565. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.3.557>
 106. Drlica K, Zhao X (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:377–392. <https://doi.org/10.1128/mmbr.61.3.377-392.1997>
 107. FUKAO M, TOMITA H, YAKABE T, NOMURA T, IKE Y, YAJIMA N (2009) Assessment of Antibiotic Resistance in Probiotic Strain *Lactobacillus brevis* KB290. *Journal of Food Protection* 72:1923–1929. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.9.1923>
 108. FEICHTINGER M, MAYRHOFER S, KNEIFEL W, DOMIG KJ (2016) Tetracycline Resistance Patterns of *Lactobacillus buchneri* Group Strains. *Journal of Food Protection* 79:1741–1747. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-577>
 109. Thumu SCR, Halami PM (2012) Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin. *Antonie van Leeuwenhoek* 102:541–551. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9749-4>
 110. Chang Y-C, Tsai C-Y, Lin C-F, Wang Y-C, Wang I-K, Chung T-C (2011) Characterization of tetracycline resistance lactobacilli isolated from swine intestines at western area of Taiwan. *Anaerobe* 17:239–245. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.08.001>
 111. Shao Y, Zhang W, Guo H, Pan L, Zhang H, Sun T (2015) Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Food Control* 50:250–258. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.003>
 112. Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Poeta P, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Torres C (2006) Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology* 111:234–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.007>
 113. Wasko A, Skrzypczak K, Polak-Berecka M, Kuzdraliński A (2012) Genetic mechanisms of variation in erythromycin resistance in *Lactobacillus rhamnosus* strains. *J Antibiot* 65:583–586. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.73>
 114. Gan Y-Q, Zhang T, Gan Y-Q, Zhao Z, Zhu B (2020) Complete genome sequences of two *Enterococcus faecium* strains and comparative genomic analysis. *Exp Ther Med* 19:2019–2028. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8447>
 115. Lappin MR, Veir JK, Satyaraj E, Czarnecki-Maulden G (2009) Pilot Study to Evaluate the Effect of Oral Supplementation of *Enterococcus faecium* SF68 on Cats with Latent Feline Herpesvirus 1. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11:650–654. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2008.12.006>
 116. Becquet P (2003) EU assessment of enterococci as feed additives. *International Journal of Food Microbiology* 88:247–254. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00187-9)
 117. Wang X, Yang Y, Huycke MM (2020) Risks associated with enterococci as probiotics. *Food Res Int* 129:108788. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108788>
 118. Urshev Z, Yungareva T (2021) Initial safety evaluation of *Enterococcus faecium* LBB.E81. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 35:11–17. <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1840438>
 119. Nishioka T, Ogawa W, Kuroda T, Katsu T, Tsuchiya T (2009) Gene cloning and characterization of *EfmA*, a multidrug efflux pump, from *Enterococcus faecium*. *Biol Pharm Bull* 32:483–488. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.483>
 120. Singh KV, Malathum K, Murray BE (2001) Disruption of an *Enterococcus faecium* species-specific gene, a homologue of acquired macrolide resistance genes of staphylococci, is associated with an increase in macrolide susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 45:263–266. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.263-266.2001>
 121. Costa Y, Galimand M, Leclercq R, Duval J, Courvalin P (1993) Characterization of the chromosomal *aac(6')-II* gene specific for *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1896–1903. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.9.1896>

122. Hummel A, Holzapfel WH, Franz CMAP (2007) Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology* 30:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.02.004>
123. Nascimento LCS, Casarotti SN, Todorov SD, Penna ALB (2019) Probiotic potential and safety of enterococci strains. *Ann Microbiol* 69:241–252. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1412-5>
124. Marshall CG, Broadhead G, Leskiw BK, Wright GD (1997) D-Ala-D-Ala ligases from glycopeptide antibiotic-producing organisms are highly homologous to the enterococcal vancomycin-resistance ligases VanA and VanB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6480–6483. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6480>
125. Cavicchioli VQ, Camargo AC, Todorov SD, Nero LA (2019) Potential Control of *Listeria monocytogenes* by Bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* ST57ACC and *Pediococcus pentosaceus* ST65ACC Strains Isolated From Artisanal Cheese. *Probiotics & Antimicrob Prot* 11:696–704. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9449-0>
126. Clark NC, Teixeira LM, Facklam RR, Tenover FC (1998) Detection and differentiation of vanC-1, vanC-2, and vanC-3 glycopeptide resistance genes in enterococci. *J Clin Microbiol* 36:2294–2297. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.8.2294-2297.1998>
127. Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P (1992) Sequence of the vanC gene of *Enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a d-alanine:d-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. *Gene* 112:53–58. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90302-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90302-6)
128. Luna VA, Roberts MC (1998) The presence of the tetO gene in a variety of tetracycline-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotypes from Washington State. *J Antimicrob Chemother* 42:613–619. <https://doi.org/10.1093/jac/42.5.613>
129. LeBlanc DJ, Lee LN, Titmas BM, Smith CJ, Tenover FC (1988) Nucleotide sequence analysis of tetracycline resistance gene tetO from *Streptococcus mutans* DL5. *J Bacteriol* 170:3618–3626. <https://doi.org/10.1128/jb.170.8.3618-3626.1988>
130. Jensen LB, Hammerum AM, Aarestrup FM (2000) Linkage of vat(E) and erm(B) in streptogramin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2231–2232. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.8.2231-2232.2000>
131. J. Reiczigel, A. Harnos, N. Solymosi (2014) Biostatistika nem statisztikusoknak, javított utánnomás. Pars Kft.
132. R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
133. Melvin P (2018) CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 11. th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
134. Sahin-Tóth J, Kovács E, Tóthpál A, Juhász J, Forró B, Bányai K, Havril K, Horváth A, Ghidán Á, Dobay O (2021) Whole genome sequencing of coagulase positive staphylococci from a dog-and-owner screening survey. *PLoS One* 16:e0245351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245351>
135. Modi A, Vai S, Caramelli D, Lari M (2021) The Illumina Sequencing Protocol and the NovaSeq 6000 System. *Methods Mol Biol* 2242:15–42. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1099-2_2
136. Andrews S (2012) FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Accessed 25 Apr 2022
137. Krueger F (2022) Trim Galore
138. Dinghua MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph | Bioinformatics | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/31/10/1674/177884>. Accessed 25 Apr 2022
139. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G (2013) QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
140. Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
141. Wood DE, Lu J, Langmead B (2019) Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology* 20:257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
142. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR (2007) NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* 35:D61–65. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl842>
143. McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8:e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
144. Lahti L, Shetty S (2012) Microbiome R Package
145. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA (2017) metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res* 27:824–834. <https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>
146. Hyatt D, Chen G-L, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11:119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>
147. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen A-LV, Cheng AA, Liu S, Min SY, Miroshnichenko A, Tran H-K, Werfalli RE, Nasir JA, Oloni M, Speicher DJ, Florescu A, Singh B, Faltyn M, Hernandez-Koutoucheva A, Sharma AN, Bordeleau E, Pawlowski AC, Zubyk HL, Dooley D, Griffiths E, Maguire F, Winsor GL, Beiko RG, Brinkman FSL, Hsiao WWL, Domselaar GV, McArthur AG (2020) CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 48:D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
148. Johansson MHK, Bortolaia V, Tansirichaiya S, Aarestrup FM, Roberts AP, Petersen TN (2021) Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *J Antimicrob Chemother* 76:101–109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>

149. Krawczyk PS, Lipinski L, Dziembowski A (2018) PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. *Nucleic Acids Res* 46:e35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1321>
150. Roux S, Enault F, Hurwitz BL, Sullivan MB (2015) VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data. *PeerJ* 3:e985. <https://doi.org/10.7717/peerj.985>
151. (FEEDAP) E (2012) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal* 10:. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2740>
152. Xu Y, Yu Y, Shen Y, Li Q, Lan J, Wu Y, Zhang R, Cao G, Yang C (2021) Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunity, short chain fatty acid production, antioxidant capacity, and cecal microflora in broilers. *Poult Sci* 100:101358. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101358>
153. Ma Y, Wang W, Zhang H, Wang J, Zhang W, Gao J, Wu S, Qi G (2018) Supplemental *Bacillus subtilis* DSM 32315 manipulates intestinal structure and microbial composition in broiler chickens. *Sci Rep* 8:15358. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33762-8>
154. Trela J, Kierończyk B, Hautekiet V, Józefiak D (2020) Combination of *Bacillus licheniformis* and Salinomycin: Effect on the Growth Performance and GIT Microbial Populations of Broiler Chickens. *Animals (Basel)* 10:E889. <https://doi.org/10.3390/ani10050889>
155. Wang B, Gong L, Zhou Y, Tang L, Zeng Z, Wang Q, Zou P, Yu D, Li W (2021) Probiotic *Paenibacillus polymyxa* 10 and *Lactobacillus plantarum* 16 enhance growth performance of broilers by improving the intestinal health. *Anim Nutr* 7:829–840. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.03.008>
156. Reuben RC, Sarkar SL, Ibnat H, Roy PC, Jahid IK (2022) Novel mono- and multi-strain probiotics supplementation modulates growth, intestinal microflora composition and haemato-biochemical parameters in broiler chickens. *Vet Med Sci* 8:668–680. <https://doi.org/10.1002/vms3.709>
157. Wu Y, Zhen W, Geng Y, Wang Z, Guo Y (2019) Effects of dietary *Enterococcus faecium* NCIMB 11181 supplementation on growth performance and cellular and humoral immune responses in broiler chickens. *Poult Sci* 98:150–163. <https://doi.org/10.3382/ps/pey368>
158. Han W, Zhang XL, Wang DW, Li LY, Liu GL, Li AK, Zhao YX (2013) Effects of microencapsulated *Enterococcus faecalis* CG1.0007 on growth performance, antioxidation activity, and intestinal microbiota in broiler chickens. *J Anim Sci* 91:4374–4382. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5956>
159. Gao P, Hou Q, Kwok L-Y, Huo D, Feng S, Zhang H (2017) Effect of feeding *Lactobacillus plantarum* P-8 on the faecal microbiota of broiler chickens exposed to lincomycin. *Science Bulletin* 62:105–113. <https://doi.org/10.1016/j.scib.2017.01.001>
160. Sureshkumar S, Jung SK, Kim D, Oh KB, Yang H, Lee HC, Jo YJ, Lee HS, Lee S, Byun SJ (2020) Administration of *L. salivarius* expressing 3D8 scFv as a feed additive improved the growth performance, immune homeostasis, and gut microbiota of chickens. *Anim Sci J* 91:e13399. <https://doi.org/10.1111/asj.13399>
161. Khan S, Chousalkar KK (2020) Short-term feeding of probiotics and synbiotics modulates caecal microbiota during *Salmonella Typhimurium* infection but does not reduce shedding and invasion in chickens. *Appl Microbiol Biotechnol* 104:319–334. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10220-7>
162. Hassen B, Abbassi MS, Ruiz-Ripa L, Mama OM, Hassen A, Torres C, Hammami S (2020) High prevalence of mcr-1 encoding colistin resistance and first identification of blaCTX-M-55 in ESBL/CMY-2-producing *Escherichia coli* isolated from chicken faeces and retail meat in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology* 318:108478. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108478>
163. Poirrel L, Héritier C, Podglajen I, Sougakoff W, Gutmann L, Nordmann P (2003) Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV beta-lactamase that compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 47:755–758. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.2.755-758.2003>
164. Di Conza JA, Badaracco A, Ayala J, Rodríguez C, Famiglietti A, Gutkind GO (2014) β -lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant enterobacteria isolated in Buenos Aires, Argentina: a new blaTEM gene. *Rev Argent Microbiol* 46:210–217. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70075-6](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70075-6)

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretném megköszönni mindazoknak, akik segítségükkel hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez. Köszönöm Dr. Jerzsele Ákosnak, hogy lehetővé tette a kutatómunkát, dr. Makrai Lászlónak a baktériumok izolálását, dr. Bányai Krisztiánnak a szekvenálást, dr. Solymosi Norbertnek és dr. Papp Mártonnak a bioinformatikai elemzést, Borbás Évának az állatgondozást és Fehérvári Péternek a statisztikai elemzést. Legfőképpen témavezetőmnek dr. Kerek Ádámnak szeretnék köszönetet nyilvánítani, aki témavezetőként és mentorként is támogatott a munkában.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Kerek Ádám**, mint témavezető nyilatkozom, hogy **Román István László** állatorvostan-hallgató „**Állatgyógyászati probiotikumok metagenomikai vizsgálata brojlercsirkében**” c. dolgozata részt vehet az Állatorvostudományi Egyetem 2022. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján.

Budapest, 2022. október hó 17. nap.

.....

Dr. Kerek Ádám
témavezető

HuVetA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Román István László

Elérhetőség (e-mail cím): romanistvanlaszlo@gmail.com

A feltöltendő mű címe: Állatgyógyászati probiotikumok metagenomikai vizsgálata
brojlercsirkében

A mű megjelenési adatai: TDK 2022

Az átadott fájlok száma: 1 db

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédt PDF formára konvertálja és szolgáltatssa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:



engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,

- ☐ az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- ☐ a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- ☐ csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

- ☒ Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2022. év október hó 17. nap

aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által

működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése, a nyílt hozzáférés támogatása.*