TDK DOLGOZAT

Szabó Emese

2023

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Társállatokban használt probiotikum készítmények antimikrobiális rezisztencia génkészletének (ARG) felmérése

Készítette:

Szabó Emese

4. évf. áo. hallgató

Témavezető:

Dr. Kerek Ádám

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, egyetemi tanársegéd

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 3

1. Bevezetés 4

2. Célkitűzések 5

3. Irodalmi áttekintés 6

3.1. Az antimikrobiális rezisztencia jelentősége 6

3.2. Antimikrobiális rezisztencia mechanizmusok 6

3.3. A probiotikumok áttekintése 9

3.4. Probiotikus törzsek antimikrobiális rezisztencia génhordozása 11

3.5. Probiotikumokban előforduló gyakoribb antimikrobiális rezisztenciagének 13

4. Anyag és módszer 17

4.1. A készítmények eredete, a színtenyészetek létrehozása 17

4.2. A hatóanyag törzsoldatok elkészítése 17

4.3. A minimális gátló koncentráció meghatározása 17

4.4. Az új generációs szekvenálás és bioinformatikai elemzés 20

5. Eredmények 21

6. Következtetések 28

7. Összefoglalás 31

8. Summary 32

9. Irodalomjegyzék 33

10. Köszönetnyilvánítás 41

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ARG	Antimikrobiális rezisztencia gén (*Antimicrobial Resistance Gene*)
B. amyloliquefaciens	*Bacillus amyloliquefaciens*
CFU	Telepformáló egység (*Colony Forming Unit*)
E. faecium	*Enterococcus faecium*
L. acidophilus	*Lactobacillus acidophilus*
L. plantarum	*Lactobacillus plantarum*
L. rhamnosus	*Lactobacillus rhamnosus*
P. pentasaccus	*Pediococcus pentasaccus*
MHB	Müller-Hinton leves (*Müller-Hinton Broth*)
P. acidilactici	*Pediococcus acidilactici*
WHO	Világegészségügyi Szervezet (*World Health Organization*)
MGE	Mobilis genetikai elem

1. BEVEZETÉS

Korunk egyik legnagyobb kihívása az antimikrobiális rezisztencia (AMR) globális terjedése, amely nemcsak a közegészségügyben, hanem az állategészségügyben is komoly kockázatot jelent. Ezért közös gondolkodásra van szükség az Egy Egészség tükrében és megfelelő jogszabályi keretek között csökkenteni kell az antibiotikum felhasználás mértékét, indokolt esetben és helyes módon egyénre szabott terápiákat kell kialakítani és mindemellett alternatív megoldásokkal részben vagy egészben kiváltani az antibiotikumok használatát. Ennek az egyik eszköze a mára már széles körben használt probiotikumok alkalmazása, azonban azt nem szabad figyelmen kívül hagynunk, hogy a probiotikus baktérium törzsek is hordozhatnak antimikrobiális rezisztencia géneket (ARG). Bár élelmiszertermelő állatokban történő felhasználásuk szigorúbb szabályozás alatt áll, többek között nem hordozhatnak közegészségügyben fontos antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakításáért felelős géneket, társállatok esetén azonban ez egyáltalán nem szabályozott terület.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás célja, hogy a Magyarországon kereskedelmi forgalomban kapható, társállatokban használt probiotikus készítmények ARG hordozását vizsgáljuk, különös tekintettel az azonosított gének plazmidon vagy fágon való hordozása, valamint mobilis genetikai elemként (MGE) való hordozására nézve. Az új generációs szekvenálással végzett vizsgálatokat kiegészítettük a készítményekből sikeresen izolált baktérium színtenyészetek minimális gátló koncentráció (MIC) érték meghatározásával, a köz- és állategészségügy szempontjából fontos antibiotikum hatóanyagokra nézve; összefüggéseket keresve a fenotípusosan megjelenő rezisztencia genetikai hátterével. Eredményeink tükrében célkitűzésünk, hogy rávilágítsunk arra, hogy a társállatok körében is fontos feladat a probiotikus készítményekbe szánt törzsek fenotípusos és genotípusos tulajdonságainak vizsgálata.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Az antimikrobiális rezisztencia jelentősége

Az antimikrobiális rezisztencia a baktériumoknak azon képessége, mellyel képesek túlélni az antimikrobiális készítmény azon koncentrációját, mely más, az azonos fajból származó egyedek pusztulását okozza, vagy szaporodásukat gátolja [1]. A rezisztencia a baktériumok adaptációs folyamatai során alakul ki, mely tulajdonképpen az evolúció szerves része. Azonban egyre szélesebb körben terjednek a multirezisztens ágensek okozta fertőzések, melyek napjainkra gyakran kórházakon kívül is előfordulnak, egyre nagyobb terhet helyezve az egészségügyben dolgozók és gyógyszerfejlesztők vállára [2]. A növekvő rezisztencia a patogén törzsek között megnehezíti az általuk okozott fertőzések gyógykezelését, meghosszabbítva ezzel a terápia időtartamát. A Világegészségügyi Szervezet (WHO) közleménye szerint, az antimikrobiális rezisztencia a 21. század tíz vezető egészségügyet veszélyeztető tényező egyike [3]. Világszerte legalább 700 000-en halnak meg évente a rezisztencia következtében, ebből 50 000 csak Európában és az Amerikai Egyesült Államokban. Ez a szám viszont 2050-re akár 10 millióra is nőhet, ha ilyen mértékű marad a világ antibiotikum felhasználásának mértéke [4]. Mivel egyre nehezebb legyőzni ezeket a fertőzéseket, a kórházi kezelési költségek is folyamatosan nőnek. Ez a plusz költség az Európai Unióban évente eléri a 1,5 milliárd eurót. Az állatorvoslásban használt szerekkel szembeni rezisztencia is széles körben előfordul, ami csökkentheti az előállított állati eredetű élelmiszerek mennyiségét, nem utolsó sorban pedig az állatok jóllétére is negatív hatással van [5]. A jelenleg klinikai használatban lévő antibakteriális szerek között vannak alternatív, nem tradicionális, újszerű fejlesztések is, mint például bakteriofágok, probiotikumok, prebiotikumok, és kombinációjuk a szimbiotikumok. Ezeket használhatjuk a hagyományos szerek mellett a terápia kiegészítéseként, vagy akár helyettesítéseként is [6].

3.2. Antimikrobiális rezisztencia mechanizmusok

Az antimikrobiális rezisztenciának két fő típusa van. Az egyik a veleszületett vagy intrinsic, ami az adott baktérium biológiai sajátossága, tehát sosem volt érzékeny az adott hatóanyaggal szemben a baktérium. A másik pedig a szerzett rezisztencia, ami keletkezhet a gének mutációjával, vagy idegen eredetű gének felvételével, amiket plazmidok, transzpozonok, integronok vagy bakteriofágok közvetítenek [7, 8]. A plazmidokon található rezisztenciagének gyorsan terjednek, akár genetikailag távolabb álló fajoknak is átadhatóak. A kromoszómán kódolt rezisztencia viszont lassan terjed, a baktérium általában csak a saját utódjának tudja átadni azt [9, 10]. Valószínűsíthető, hogy a rezisztencia mechanizmusok

olyan génekből fejlődtek ki, melyek az antibiotikumokat termelő organizmusokban megtalálhatóak. Ezen gének átadása megtörténhetett akár a talajban, akár az állatok vagy emberek gasztrointesztinális rendszerében [11].

A kromoszómamutációk ritkán fordulnak elő, általában replikációs hiba eredményei. Ezek strukturális elemekkel szembeni rezisztenciát kódolnak [12]. Az *Escherichia coli* fluorokinolonokkal szembeni rezisztenciáját minimum 3 génmódosulás okozza, a rifampicin esetében azonban ehhez mindössze egy pontmutációra van szükség [13]. A horizontális génátadás a rezisztens gének egyik baktériumból a másikba történő átadását jelenti [14]. Ez a folyamat három fő úton történhet meg: transzdukcióval, transzformációval vagy konjugációval. Az átadás leggyakrabban plazmidokon keresztül történik. A géntranszfer a baktériumok szempontjából sokkal hatékonyabb, mint a kromoszómamutációk [15].

Az enzimatikus inaktiváció révén kialakított rezisztencia mechanizmuson belül három fő enzimcsoportot különböztetünk meg, melyek a β-laktamázok, az aminoglikozid-módosító enzimek és a klóramfenikol-acetiltranszferázok [16]. A β -laktamáz enzimek hidrolítikus úton bontják a β-laktám antibiotikumok túlnyomó részét. Jelenleg körülbelül 300 β-laktamáz enzimet ismerünk, melyek közül a klinikailag relevánsakat elsősorban Gram-negatív baktériumok termelik. Ezek lehetnek kromoszómán vagy plazmidon találhatóak, és az esetek nagyrészében transzpozonok közvetítik őket [17]. Minden β-laktámot elbontanak, amikben megtalálható az észter és az amid kötés. Két nagy csoportjukat különböztetjük meg, az elsőbe a szerin-β-laktamázok tartoznak, mint például a cefalosporinázok, amik az *Enterobacter* genusban és a *Pseudomonas aeruginosa* baktériumban találhatóak, valamint a penicillinázok, amiket főként a *Staphylococcus aureus* termel [18]. A második nagy csoport a metallo-β-laktamázok csoportja, ezeket a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Klebsiella pneumoniae*, az *Escherichia coli* és egyes *Enterobacter* fajok termelik. Ezek felelősek az imipenemmel, újgenerációs cefalosporinokkal és a penicillinekkel szembeni rezisztenciáért, és még a β -laktamáz-inhibítorokra sem érzékenyek az esetek többségében [19].

A célpont kötőhely módosítás alapja, hogy az antimikrobiális szer és a baktériumon lévő célpont molekula közötti kapcsolat specifikus, már a target kisebb változásai is befolyásolhatják, gátolhatják a szer kötődését. A peptidoglikán réteg a sejtfal része. Ennek a komponensnek az előállítását akadályozzák a sejtfalszintézis-gátlók, melynek célpontjai a *penicillin binding protein* (PBP) kötőhelyek, az ezeken végbemenő mutációk csökkentik a β-laktám antibiotikumok hatékonyságát [20]. Erre példa a *Staphylococcus aureus* és

Staphylococcus pseudintermedius meticillinnel (MRSA, MRSP) szemben kialakult rezisztenciája, amely esetében a PBP fehérjét kódoló génben történt egy mutáció és így szerkezetileg eltérő PBP2a target jött létre. Ez a fehérje egyáltalán nem köti a β -laktámokat, még többszörös dózis esetén sem [21]. A fehérjeszintézist gátló antibiotikumokkal szemben is kialakulhat rezisztencia a célpont módosítása révén. A 23S rRNS mutációja ugyanolyan hatással bír, mint amikor nem metilálódik az rRNS. Mindkettő az 50S riboszóma alegységen gátló szerek (makrolidok, linkózamidok, pleuromutilinek) elleni rezisztenciához vezet, főként Gram-pozitív baktériumokban [22]. A DNS-szintézist gátló szerek ellen két enzim mutációján keresztül alakulhat ki rezisztencia. Ezek a DNS-giráz, más néven topoizomeráz II és a topoizomeráz IV enzimek. A leggyakoribb mutáció a DNS-giráz *gyrA* génjében történik. Az így megváltozott DNS-komplexhez az eredetileg kötni képes fluorokinolonok képtelenek kapcsolódni. Ez a mutáció keresztrezisztenciát is okozhat MRSA-ra és MRSP-re [23].

Az efflux pumpák olyan membránfehérjék, amelyek az antimikrobiális szereket kipumpálják a sejtből, és ezzel alacsony szinten tartják a hatóanyag intracelluláris koncentrációját. Az egykomponensű efflux pumpák a citoplazmamembránon keresztül szállítják a szubsztrátjukat. A többkomponensű rendszerek gyakrabban találhatóak Gram-negatív baktériumokban. Egy periplazmatikus membrán fehérjével és egy külső membrán fehérjével együtt a sejtburkon keresztül távolítják el a vegyületeket [20]. A polimixineket leszámítva minden antibiotikum érzékeny az efflux pumpa-rendszerekre [24]. Ezek a pumpák lehetnek egy-egy szerre vagy szercsoportra specifikusak, de a legtöbbjük többféle antibiotikus csoport tagjait képes szállítani. Emiatt ezek is közrejátszanak a multirezisztencia kialakulásában [25].

A membránpermeabilitás csökkenés alapja, hogy a gyógyszermolekulák többféleképpen juthatnak át a sejtmembránon. Ennek módja nagymértékben függ a molekula kémiai tulajdonságaitól. Az átjutás történhet diffúzióval a kettős foszfolipid rétegen keresztül vagy a porin csatornákon át, illetve egy harmadik módon például az aminoglikozidok penetrálnak, megzavarják az LPS réteget, hogy utána átjuttassák magukat („*self-promoting uptake*"). A Gram-negatív baktériumok plazmamembránja a foszfolipiden kívül tartalmaz egy lipopoliszacharid (LPS) réteget is. Ez az összetétel nagyban akadályozza a gyógyszerek penetrációját, rajta keresztül a transzport porin csatornákkal valósul meg. A hidrofil β-laktámok is ezen a membránproteinen keresztül képesek bejutni a sejtbe. Így ennek változásai nagyban befolyásolják az antibiotikum diffúzióját [26]. A *Pseudomonas*

aeruginosa baktériumnak hiányozhat az *oprD* nevű fehérjét kódoló génje, ami az imipenem hatóanyaggal szembeni rezisztencia kialakulásához vezethet [27].

A célpont védelem esetén az antibiotikum célpontjához egy rezisztenciáért felelős fehérje („célpont védelmi fehérje") kötődik, amivel megvédi azt a hatóanyag hatásától. Ez nem jelent végleges változást a célpontban. Ahhoz, hogy a hatását elérje, a rezisztenciáért felelős fehérjének tartósan vagy ismétlődően kötődnie kell a targethez [28]. A célpont védelem először körülbelül 30 éve lett elismerve, mint az antimikrobiális rezisztencia egyik mechanizmusa, a tetraciklinnel szembeni rezisztenciával kapcsolatosan [29]. A tetraciklin védelmi fehérjét kódoló gének mind Gram-pozitív, mind Gram-negatív patogén fajokban előfordulnak [30]. Ezen kívül még két nagy csoportot különböztetünk meg ezen a mechanizmuson belül. Az egyik az ABC (*ATP-binding cassette*) szupercsaládba tartozó ABC-F fehérjék, amelyek a riboszómához kötődnek, hogy megakadályozzák a transzlációt gátló szerek hatását a Gram-pozitív baktériumokban [31]. A másik pedig a *fusB*-típusú rezisztencia, ami a fuzidinsavval szembeni rezisztenciát alakítja, szintén a transzláció folyamatának biztosításával [32].

3.3. A probiotikumok áttekintése

A probiotikumok olyan élő mikroorganizmusok, melyek a szervezetbe jutva jótékony hatást fejtenek ki a gazdaszervezet egészségére. Ezen mikroorganizmusok nagy része a bélben természetesen előforduló baktériumokhoz hasonló mikróba. A probiotikumokat széles körben tesztelték humán gasztrointesztinális betegségek kezelésében. A leggyakrabban előforduló baktérium nemzetség a *Lactobacillus,* a *Bifidobacterium* és a gombák közül a Saccharomyces nemzetség. Szerepük fontos lehet a gastrointestinális traktus immunológiai védelmének fenntartásában, modulálásában [33]. A probiotikumok védő mechanizmusainak több formája ismert, például megakadályozzák a patogén baktériumok bélfalhoz való tapadását, gátló faktorokat termelnek. A Gram-negatív baktériumokhoz való közvetlen kötődésükkel csökkentik a patogén törzsek szaporodását, helyreállítják a bélfal permeabilitását, ezzel serkentve az elektrolitok felszívódását [34–37]. Az eddigi kutatási eredmények arra utalnak, hogy a gazdafajra specifikus baktériumfajoknak a legkedvezőbb a probiotikus hatása, főleg a gastrointestinális traktus megbetegedéseiben [38]. Bár a probiotikumok emberi szervezetre való hatásairól rengeteg tanulmány áll rendelkezésre, a társállatokra kifejtett hatásairól lényegesen kevesebb vizsgálat készült. Azonban, mivel egyre nagyobb hangsúlyt kap a háziállatok egészsége, egyre elterjedtebben használnak különféle probiotikus készítményeket körükben is. Ezek a tesztelt készítmények

bizonyítottan segítenek fenntartani a kutyák és macskák normális gasztrointesztinális mikrobiomját. A probiotikumok a bélbeli hatásokon kívül társállatainknál is valószínűsíthetően immunmoduláló hatásúak, stresszcsökkentőek, és az emésztéssel összefüggő vérparaméterek pl. koleszterin, lipidek, balanszírozásában segítenek [39]. A *Bacillus* nemzetségbe tartozó fajok ellenállóképessége kimagasló, amit a spóraképző tulajdonságuknak köszönhetnek. Ennek következtében szélsőséges hőmérsékleti és pH viszonyok között is túlélnek, ami elősegíti probiotikumként való alkalmazásukat [40]. Yuanyuan és mtsai. tibeti jakokból izolált *Bacillus amyloliquefaciens* törzsek tulajdonságait vizsgálták, melyek pozitív hatással voltak a bélbolyhok fejlődésére. Minden vizsgált törzs mutatott antibakteriális tulajdonságokat a gyakori gasztrointesztinális patogén fajokkal szemben [41]. A kutyák jejunumának fő bakteriális alkotóeleme az aerob körülmények között élő *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) faj [42], aminek legfőbb oka, hogy hatékonyan kötődik a bélfalhoz, a felszínén található *S-layer* fehérjéknek köszönhetően, amit több *Lactobacillus* fajnál is megfigyeltek [43]. Az *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) szintén a laktát-termelő baktériumok közé tartozik, a húsevők gasztrointesztinális rendszerének természetes lakója. Ígéretes probiotikum, mivel ellenáll a gyomorsavnak és epének, emellett stimulálja az immunsejtek proliferációját a bélrendszerben [44]. BS és mtsai. tejtermékekben található baktériumok GABA-termelését vizsgálták, ami több fiziológiás folyamatban is szerepet játszik, mivel egy központi idegrendszeri neurotranszmitter. A megfigyelt baktériumok közül az *E. faecium* volt a legproduktívabb, ami ezek alapján felhasználható GABA kiegészítésre a takarmányban [45]. Antimikrobiális potenciálja is van, az általa termelt szerves savak és hidrogén-peroxid gátolja több gyakori patogén faj növekedését, mint például az *Escherichia coli*, a *Listeria monocytogenes*, a *Pseudomonas aeruginosa* és a *Staphylocccus aureus*. Azonban az antibakteriális hatása proteolitikus enzimek jelenlétében teljes mértékben inaktiválódik [46]. A *Pediococcus* nemzetség tagjai széles ozmotikus-, pH- és hőmérséklet-tűréssel rendelkeznek. A *Pediococcus acidilactici* (*P. acidilactici*) antiproliferatív hatást képes kifejteni a vastagbél daganatos sejtjei ellen, ezen kívül pedig nagymennyiségű rövid szénláncú zsírsavat (SCFA) termel, amelyek bioprotektív hatással rendelkeznek, mivel serkentik a nyálkahártya mucin termelését [47, 48]. Probiotikumként bizonyos élesztőgomba fajokat is használhatunk, de jelenleg csak a *Saccharomyces cerevisiae*-t ismerik el és alkalmazzák az állatorvoslásban [49]. A *Saccharomyces cerevisiae* serkenti a gyulladásgátló és csökkenti a proinflammatorikus citokinek kiválasztását a bélrendszerben, ezen felül pedig antioxidáns

hatása is igazolt [50]. Kísérletek alapján használható táplálékkiegészítőként, terápiás célból és az élelmiszeriparban bizonyos készítmények előállításakor [51].

3.4. Probiotikus törzsek antimikrobiális rezisztencia génhordozása

Egy baktériumtörzs probiotikumként való megfelelésének fontos kitétele, hogy nem hordozhatnak a közegészségügy szempontjából jelentős antibiotikum hatóanyagokkal szemben rezisztenciát. Ez a szabályozás azonban csak az élelmiszertermelő állatokban alkalmazott készítmény esetén előírás, társállatok esetén hiányzik ez a szabályozás. Ez azért is különösen fontos, mert a probiotikus törzsek hordozhatnak rezisztenciagéneket, amelyeket különböző módokon átadhatnak a jelenlévő patogén és kommenzalista baktériumoknak. Élelmiszertermelő állatok érintettsége esetén minden esetben el kell végezni egy antimikrobiális érzékenységi vizsgálatot, amikor egy potenciális probiotikus törzset fejlesztenek [52]. Du és mtsai. *Bacillus amyloliquefaciens* (*B. amyloliquefaciens*) törzs érzékenységi vizsgálta során megállapították, hogy a törzs kifejezetten érzékeny volt a fluorokinolonokra, azon belül elsősorban az enrofloxacinra és a ciprofloxacinra. Ezzel szemben a régebbi antibakteriális csoportoknál csökkent szenzitivitást mutatott, melyek alig gátolták a szaporodását [53]. Egy másik kutatásban megfigyelt törzs azonban semmilyen rezisztenciagént nem hordozott, nagymértékben érzékeny volt a tesztben résztvevő szűk- és szélesspektrumú antimikrobiális szerekre is [54]. Tibeti jakokból izolált törzsek vizsgálata során egy törzs semmilyen antibiotikumra nem volt rezisztens, egy törzs csak neomicinre, két törzs pedig polimixin-B esetén a rezisztens és az érzékeny kategória határára esett [41]. Egy másik tibeti jakokból izolált *B. licheniformis* vizsgálata során az antibiotikum érzékenységi próbát kiegészítették polimeráz-láncreakció (PCR) génvizsgálattal. A szenzitivitási próba során csak a linkomicinnel szemben találtak változó mértékű rezisztenciát, a másik tíz antibiotikumra érzékeny volt mindkét törzs; azonban a PCR vizsgálat során nem tudtak kimutatni rezisztenciagént még linkomicinre nézve sem [55]. Dindhoria és mtsai. kutatása szintén erre a fajra irányult, genomszekvenálás során semmilyen ARG nem volt kimutatható belőle, melyhez a *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) adatbázis információit használták fel [56].

Fontos elkülöníteni a probiotikus törzsekben jelenlévő intrinsic, vagyis horizontálisan nem átadható, és a szerzett, tehát különféle utakon továbbadható antimikrobiális rezisztencia géneket. A *Lactobacillus* fajokra jellemző az intrinsic rezisztencia viszonylag sok antibiotikum csoportra nézve, ilyenek az aminoglikozidok, glikopeptidek, nukleinsav-szintézis gátlók és folsav-szintézis gátlók [57]. Általánosságban elmondható, hogy a

penicillinekre és a β-laktám inhibítorokra érzékenyek, azonban a cefalosporinokkal szemben már csökkent szenzitivitást mutatnak. Viszont már több vizsgálat során találtak penicillin G-vel szembeni rezisztenciagént különféle izolátumokban [58–60]. Különböző fermentált ételekben található *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) és *Lactobacillus rhamnosus* (*L. rhamnosus*) esetében kimutattak oxacillin és cefalosporinok elleni rezisztenciát [61, 62]. Több *L. rhamnosus* és *L. plantarum* törzset is rezisztensnek találtak vankomicinnel szemben, azonban ennek mechanizmusát egyelőre nem tudták tisztázni [63, 64]. Mater és mtsai. a gyakran használt *Lactobacillus acidophilus* vizsgálatakor bizonyították, hogy a törzs képes átvenni vankomicin rezisztenciagént *Enterococcus* fajoktól, mind *in vitro* és *in vivo* kísérletek között is [65]. Bár a legtöbb *Lactobacillus* faj érzékeny a fluorokinolonokra és fenikolokra, fermentált zöldségekből kimutattak mobilis klóramfenikol-rezisztenciagéneket néhány *L. plantarum* törzsben, ami egyben keresztrezisztenciát mutatott eritromicinre [66]. A leggyakrabban előforduló rezisztenciagének *Lactobacillus* fajoknál a tetraciklinre és eritromicinre irányuló gének. A *tetM* és *tetS* gének riboszómavédő fehérjéket kódolnak, melyek lehetnek plazmidon és kromoszómálisan is. A *tetL* egy efflux pumpafehérjét kódoló gén, ami viszont csak plazmidon található meg. Az eritromicin-rezisztenciagén az *ermB* gén, mely szintén plazmidon található [67]. Azok a törzsek, melyek egynél több tetraciklin-rezisztenciagénnel rendelkeznek, nagyobb mértékben mutatnak rezisztenciát, mivel ezen gének között szinergista hatás van [68]. Feld és mtsai. egy olyan *L. plantarum* törzset izoláltak, amely rendelkezik egy *tetM* gén traszpozonnal, melyet képes átadni más laktáttermelő baktériumoknak [69]. A Lactobacillusokkal szemben a *Limosilactobacillus fermentum* általánosságban biztonságosnak tekinthető, mivel hiányoznak belőle az átadható antimikrobiális rezisztenciagének és virulenciagének [70]. Azonban valószínűsíthető, hogy, mint a legtöbb laktát-termelő baktérium, ez a faj is intrinsic rezisztenciával rendelkezik kanamicinnel és sztreptomicinnel szemben [71].

Egy újabb tanulmányban vizsgált *P. acidilactici* törzset 21 különböző antimikrobiális szerre teszteltek. Ezek közül csak négy törzs mutatott teljes érzékenységet piperacillinre, imipenemre, klóramfenikolra és eritromicinre. Mérsékelt rezisztenciával rendelkeztek klindamicin, doxiciklin és levofloxacin hatóanyagokkal szemben, a többi szerre, mint például vankomicin és tetraciklin, viszont teljes mértékben rezisztensek voltak [72]. Yang és mtsai. két probiotikus törzs iszaprákokra kifejtett hatását vizsgálták. Eközben elvégezték rajtuk az antimikrobiális szenzitivitási tesztet 19 antimikrobiális ágenssel szemben. A *Pediococcus pentasaccus* törzs érzékenységet mutatott a ceftazidim és a szulfometoxazol

hatóanyagok kívül az összes többire. Ezzel szemben a másik vizsgált, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) törzs szinte minden szerre rezisztens volt. Ez a vizsgálat is alátámasztja azt, hogy a *Pediococcus* törzsek biztonságosabban használhatók probiotikumként, mint az *Enterococcus* fajok [73].

A társállatokban használt probiotikus készítmények leggyakoribb összetevője az *E. faecium*. Azonban számos tanulmány mutatott már ki különböző antibakteriális szerekkel szembeni rezisztenciát egyes törzsekben. A különböző törzsek eltérő mértékű rezisztenciát mutatnak az egyes hatóanyagokra. Ezek közül sokat szerzett rezisztenciagének okoznak. A BS és mts. által vizsgált *E. faecium* BS5 rezisztensnek bizonyult penicillinre, ampicillinre, eritromicinre, kanamicinre és sztreptomicinre. Viszont érzékeny volt tetraciklinekre, klóramfenikolra és rifampicinre [45]. Egy 1920 körül izolált törzs, amelyet azóta humán és állati probiotikumként is alkalmaznak, továbbra is érzékeny penicillinre, eritromicinre, tetraciklinre, klóramfenikolra és gentamicinre, de intrinsic rezisztenciával rendelkezik oxacillinnel, kanamicinnel és sztreptomicinnel szemben. Azonban a sztreptomicin-penicillin kombinációra szenzitív [74]. Az elmúlt évtizedekben a vankomicin-rezisztens *Enterococcus* (VRE) törzsek is egyre elterjedtebbek, gyakori fertőzéseket okoznak a kórházi tartózkodások alatt [75]. Egy kutatás során sajtból izolált *Enterococcus* fajok tetraciklin-rezisztenciáját elemezték. Genotípusos vizsgálatot is folytattak, és a legtöbb esetben *tet(M)*, egy esetben pedig *tet(S)* gén jelenlétét mutatták ki [76].

A probiotikus törzsek esetében kívánatos lehet az antibakteriális rezisztencia, hogy azok túléljék az antibiotikumos kezelést. Azonban ezeket a géneket a baktériumok vertikálisan vagy horizontálisan át tudják adni egymásnak. Az emlősök gasztrointesztinális traktusában a géntranszfernek kedvező feltételek vannak jelen. Viszont ez a folyamat az élesztőgombák esetében nem fenyeget, mivel köztük és a baktériumok között nincsen génátvitel, ezek használata biztonságosnak minősül [77]. Egy friss tanulmányban több, mint 50 törzs antibakteriális érzékenységét tesztelték, melyek közül mindegyik túlélte mind az ötféle antibiotikum (sztreptomicin, klóramfenikol, gentamicin, eritromicin, oxitetraciklin) applikációját, még a legnagyobb alkalmazott dózisnál is [51].

3.5. Probiotikumokban előforduló gyakoribb antimikrobiális rezisztenciagének

Az *AAC(6')-Ii* gén egy kromoszómán található aminoglikozid-acetiltranszferáz, amit *Enterococcus* fajokban, legelőször *E. faecium*-ban írtak le [78], az *AAC(6')-I* (*aminoglycoside acetyltransferase class*) géncsalád tagja, és aminoglikozid antibiotikumok

elleni rezisztenciáért felel, mely gén számos esetben megtalálható az *E. faecium* törzsekben [79]. Az amikacin és a gentamicin C1a-t és C2-t képes inaktiválni. A géncsaládban egyedüliként mutat hasonlóságot az *AAC(6')-Ia* génnel [78]. Az *aad(6)* egy plazmidon található aminoglikozid nukleotidil-transzferáz, az *ANT(6)* család tagja. Inaktiválja az aminoglikozidokat *E. faecalis* és *Streptococcus oralis* törzsekben. Szinonimaként használják rá az *acc(6)* elnevezést [80].

Az *APH(3')* géncsalád minden tagja aminoglikozidokkal szembeni rezisztenciáért felel, amelyek antibiotikum enzimatikus inaktivációja révén alakítják ki a rezisztenciát. Az *APH(3')-Ia* transzpozonon található foszfotranszferáz az *Escherichia coli* és *Salmonella enterica* fajokban. Fehérjeszekvenciája megegyezik az *APH(3')-Ic* génével, amely viszont plazmidon vagy transzpozonon található, elsősorban *Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii*-ban és *Corynebacterium* fajokban fordul elő [81, 82]. Az *APH(3')-IIIa* gén egy plazmidon található foszfotranszferáz, amely *Staphylococcus aureus*-ban és *Enterococcus* fajokban található meg [83]. 3D-s struktúrája nagyban hasonlít a protein kinázokéra, ily módon kapcsolatot teremtve a két enzimcsoport között [84]. Az *APH(3')-Ib* gént *Escherichia coli*-ban mutatták ki, ami szintén egy plazmidon található aminoglikozid-foszfotranszferáz, szinonimája az *aphA*-like gén [85].

Az *APH(6)-Id* az *APH(6)* géncsaládba tartozó gén, aminoglikozidok enzimatikus inaktiválásával hozza létre a rezisztenciát velük szemben. Lehet plazmidon, transzpozonon vagy kromoszómán elhelyezkedő foszfotranszferáz. Sok baktériumtörzsben kimutatták jelenlétét, többek között *Klebsiella pneumoniae, Salmonella, Escherichia coli, Pseudomonas* és *Pasteurella multocida* fajokban [86].

A *catA8* gén a *CAT* (chloramphenicol acetyltransferase) család tagja, egy klóramfenikol acetiltranszferáz enzimet jelent. Enzimatikus inaktivációval semlegesíti a fenikolokat, azon belül is elsősorban a klóramfenikolt [87]. A *CRP* széles körű szabályozó szereppel bíró gén. Elnyomja az *mdtEF* multirezisztenciát kialakító efflux rendszer expresszióját. Az RND (*resistance-nodulation-cell division*) antibiotikum efflux pumpa családba tartozik. Penicillinek, makrolidok és fluorokinolonokkal szembeni rezisztenciáért felelős, elsősorban *Escherichia coli* baktériumban található [88], de jelenlétét kimutatták már *L. plantarum* törzsben is [89].

Az *eatAv* gént *E. faecium* baktériumból mutatták ki először, ami az *eatA ABC-F* vad géntípus mutálódott változata. Az ABC szupercsalád, azon belül az *ABC-F* alcsalád tagja.

Rezisztencia mechanizmusa a kevésbé ismert célpont védelem, ami pleuromutilinekkel és linkózamidokkal szemben alakít ki rezisztenciát [90].

Az *EF-Tu* (*elongation factor*) egy G-fehérje, a peptidlánc elongációját katalizálja a bakteriális fehérjeszintézis során [91]. Az *EF-Tu:GTP* megvédi a tRNS-t a hidrolízistől, és segíti az mRNS-hez való megfelelő kötődését, miközben ő maga hidrolizálódik, és *EF-Tu:GDP* lesz belőle. Ezt később az *EF-Ts* faktor alakítja vissza aktív formává. Mutáns variánsai rezisztenciát okozhatnak kirromicinre és fuzidinsavra [91].

Az *ermB* expresszióját, hasonlóan az *ermC* génhez, az eritromicin hatóanyag indukálja. Az eritromicin hozzákapcsolódik a megfelelő fehérjéhez, amiben ennek hatására konformáció változás következik be, ami az *ermB* expressziójához vezet. Ez a gén az *erm* 23S riboszóma RNS metiltranszferáz géncsaládba tartozik. A célpont módosítása révén alakít ki rezisztenciát a makrolidok és linkózamidok ellen [92]. Jelenlétét kimutatták *L. plantarum* [93] és *Lactobacillus rhamnosus* [94] törzsekben is, valamint igen gyakori *E. faecium* törzsekben [95], de *P. acidilactici* [96] és *Pediococcus pentasaccus* [93] fajokban is előfordul.

Az általában *E. faecium* törzsekben található, fajspecifikus *msrC* egy kromoszómán kódolt, makrolidokkal, azon belül is főként eritromicinnel szembeni rezisztenciát kialakító gén. Az msr-típusú *ABC-F* alcsaládba tartozik. A célpont védelmével akadályozza meg az antibiotikumok hatását [97]. Hasonlósága az *msr(A)* génhez azt a feltételezést eredményezi, hogy ez a gén is működtet egy efflux rendszert [97]. Jelenlétét azonban kimutatták már *Lactobacillus fermentum* [93, 98] és *Pediococcus pentasaccus* [93] fajokban is.

Az *rsmA* egy kis RNS-kötő fehérje, amely poszttranszkripciós regulátor szerepet játszik a *Pseudomonas aeruginosa* virulencia génjeinek kialakításában. Emellett a *mexEF-oprN* túlprodukcióját okozza, melynek révén különböző antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát alakít ki [99]. Az RND családba tartozik, *Escherichia coli*-ban található homológja a *csrA* gén. Diaminopirimidinekre, fenikolokra és fluorokinolonokra alakít ki rezisztenciát, efflux pumpa mechanizmus révén [99].

Az eredetileg *Campylobacter coli* baktériumból származó *SAT-4* gén egy plazmid-mediált sztreptotricin-acetiltranszferáz. A sztreptotricin egy Gram-negatív baktériumokra ható, *Streptomyces* fajok által termelt antibiotikum, ami a bakteriális transzlációt gátolja. A gént már *Escherichia coli* törzsekből és más *Campylobacter* fajokból is kimutatták [100]. A

SAT (streptothricin acetyltransferase) család tagja. A nukleozid antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztencia kialakításáért felel, azok inaktiválása révén [101].

Tetraciklin hatóanyagokkal szembeni rezisztencia kialakításért felelős gén a *tetC* gén, ami főként Gram-negatív baktériumokban megtalálható efflux pumpa kifejeződéséért felelős gén, általában plazmidon található. A *tetD* hasonló ehhez, viszont kizárólag Gram-negatív baktériumokban fordul elő. Mindkettő az MFS (*major facilitator superfamily*) családba tartozik [30, 102]. A *tetC* gén előfordul *Chlamydia suis* törzsekben is. Ez az első bejelentett, szerzett tetraciklin rezisztenciagén a sertések bármely obligát intracelluláris patogén baktériumfajában. Ez valószínűleg az *Aeromonas salmonicida*-ból származik [30]. A *tetM* és a *tetS* gének riboszóma védelmi fehérjékért felelős gének, melyek mobilis genetikai elemeken találhatóak, Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumokban egyaránt. A tetraciklin-rezisztens riboszóma védelmi fehérjék géncsaládjának tagjai. A célpont védelmével alakítják ki a rezisztenciát a tetraciklinekkel szemben. A *tetS* főként *E. faecalis, E. faecium* és *Staphylococcus aureus* törzsekben fordul elő [103, 104], tetS [89, 93] és tetM [98] gént kimutattak már *L. plantarum* törzsekben is.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A készítmények eredete, a színtenyészetek létrehozása

A kutatáshoz összesen tízféle, kereskedelmi forgalomban kapható, kutyáknak és macskáknak szánt probiotikus készítményt használtunk fel. A készítményekben található egyes törzsek színtenyészetben történő izolálását az Állatorvostudományi Egyetem Járványtani és Mikrobiológiai Tanszéke végezte. Az *E. faecium* törzsek izolálása minden esetben (9/9) sikeresen megtörtént, a készítmények leírásában szereplő egyéb törzsek közül egy esetben sikerült *L. plantarum* (1/4), két esetben *P. pentasaccus* (2/2) és egy esetben *P. acidilactici* (1/2) törzset izolálni. Ezeken kívül bizonyos készítmények esetén jelölve volt, hogy a *Pediococcus* törzset (1 db) és *Lactococcus* törzseket (8 db) inaktivált formában tartalmazzák. A MIC vizsgálatokhoz a színtenyészeteket készen kaptuk meg.

4.2. A hatóanyag törzsoldatok elkészítése

A vizsgálathoz szükséges hatóanyagokból a (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) törzsoldatokat készítettünk a CLSI ajánlása szerint [105]. A penicillint, az amoxicillint, az amoxicillin-klavulánsav 2:1 arányát (pH 7,2, 0,01 mol/l) foszfát pufferoldatban oldottuk fel. A gentamicint, az oxitetraciklint, a doxiciklint, a tilozint, a klindamicint és a vankomicint desztillált vízben vittük maradéktalanul oldatba. A potenciált szulfonamid elkészítése során szulfametoxazol és trimetoprim 20:1 arányát használtuk, előbbit forró vízben néhány csepp 2,5 mol/l NaOH-val oldottuk fel, míg utóbbit 0,05 mol/l HCl-al desztillált vízben oldottuk fel. A gatifloxacint pár csepp 1 mol/l NaOH-oldattal desztillált vízben készítettük el. A florfenikolt néhány csepp 95%-os etanol és desztillált víz segítségével oldottuk fel. A vizsgálatokhoz 1024 µg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, korrigálva az egyes hatóanyagok gyártó által meghatározott tisztaságára, a vizsgálatokat 128-0,125 µg/ml kettes alapú hígítási tartományban végeztük el.

4.3. A minimális gátló koncentráció meghatározása

A rezisztencia fenotípusos kifejeződését az egyes baktériumtörzsek MIC-érték meghatározásával vizsgáltuk, amit a CLSI módszertanával végeztük [105], a töréspontokat (breakpoint) pedig a CLSI és az EUCAST irányelvei alapján határoztuk meg.

A -80 °C-on tárolt baktériumtörzseket a vizsgálatot megelőző napon 3 ml Müller-Hinton levesbe (MHB) oltottuk, majd 18-24 órán át inkubáltuk 37 °C-on. A vizsgálatokat 96 lyukú mikrotiter lemez (VWR International, LLC., Magyarország) segítségével végeztük. A munkalemezek első oszlopát kivéve a lyukakat 90 µl MHB-vel (1. lépés) töltöttük fel (**1.**

ábra). A törzsoldatot MHB-vel négyszeresére hígítottuk, ezzel kialakítva a kezdő 128 µg/ml koncentrációt, majd ebből 180 µl-t mértünk a munkalemez első oszlopába (2. lépés) és 2-es alapú hígítási sort készítettünk belőle (3. lépés), a munkalemez 10. oszlopa után a felesleget pipettaheggyel együtt eldobtuk, így minden oszlopban 90 µl térfogatot kialakítva. Minden baktériumtörzs vizsgálatához egy sort használtunk fel a munkalemezen (**2. ábra**).

1. lépés: feltöltés

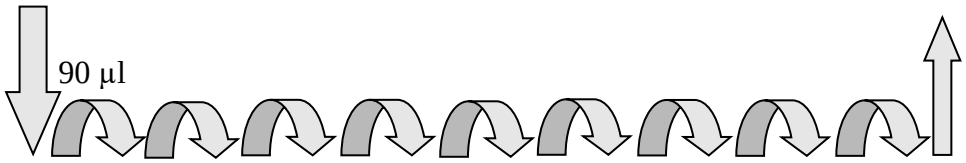
90 µl

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

1. ábra A lemezek feltöltése 90 µl MHB-vel

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

90 µl feleslegben kidob



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

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

Egy segédlemezen 0,5 McFarland értékre beállítva előkészítettük a baktériumok ráoltásához szükséges baktériumszuszpenziót. Ehhez egy segédlemezt 240 µl MHB-vel töltöttünk fel (**3. ábra**), majd minden lyukba 10 µl alaposan vortexelt baktériumszuszpenziót

mértünk (4. lépés). Ezt követően a baktériumtörzseket az elkészített munkalemezekre oltottuk úgy, hogy a kettes alapú hígítási sort tartalmazó lemezek 11. oszlopától kezdve haladtunk visszafelé, 10 µl baktériumszuszpenziót pipettázva a segédlemezről (5. lépés). A 11. oszlop pozitív kontrollként szolgált (baktériumszuszpenzió és leves), a 12. oszlop negatív kontrollként (leves) funkcionált (**4. ábra**).

4. lépés: a baktériumszuszpenzió 0,5 McFarland értékkel

10 µl

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

3. ábra A baktériumszuszpenzió 25x hígításának elkészítése segédlemezen

5. lépés: a baktériumszuszpenzió bemérése

10 µl

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

4. ábra A baktériumszuszpenzió rámérése a munkalemezre a pozitív kontrolltól kezdve

A munkalemezeket ezt követően 18-24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd vizuálisan elbíráltuk a MIC értékeket a pozitív (11. oszlop) kontrollhoz viszonyítva. Az értékelés során a – (nincs zavarosodás) és ± (nehezen megítélhető) jelöléssel ellátott lyukakat

negatív eredménynek tekintettük, míg pozitív eredménynek a + (enyhe zavarosodás), ++ (mérsékelt zavarosodás), +++ (jelentős zavarosodás) jelöléssel ellátott lyukak minősültek.

4.4. Az új generációs szekvenálás és bioinformatikai elemzés

A készítményekből származó DNS-t a QIAmp DNS-kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk a gyártó protokollja szerint. A DNS-ből létrehozott párosított leolvasási szekvenciák (paired-end readek) meghatározása Illumnia NextSeq szekvenátorral történt [106].

A bioinformatikai adatfeldolgozás során a nyers szekvenciák minőségellenőrzését a FastQC v0.11.9 [107] szoftver segítségével végeztük el, majd TrimGalore v0.6.6 [108] segítségével a nem kielégítő minőségű szakaszok szűrését hajtottuk végre. A leolvasási szekvenciákat (ún. read-eket) hosszabb szekvenciákká (kontigokká) illesztettük össze a MEGAHIT v1.2.9 [109] szoftver segítségével. Az így kapott kontigokból meghatároztuk az összes lehetséges leolvasási keretet (ORF, *Open Reading Frame*) a Prodigal v2.6.3 segítségével [110], majd ezek bázissorrendje szerint származtattuk a fehérjeszekvenciákat és végül a Resistance Gene Identifier (RGI) v5.1.0 szoftverrel összehasonlítottuk a CARD adatbázisában [111] található ARG szekvenciákkal. Az eredmények közül azokat hagytuk meg, melyek legalább *strict* minősítésűek voltak, azaz a CARD adatbázis meghatározott küszöbértékét elérték.

Vizsgáltuk az azonosított rezisztencia gének potenciális mobilitását, ehhez a MobileElementFinder v1.0.3 programot [112] vettük igénybe, amely a kontigokon prediktálja az előforduló MGE géneket. Csupán azokat az ARG-ket tekintettük ebből a szempontból potenciálisan mobilisnak, amelyek az MGE-khez az adatbázisban az adott fajra jellemző leghosszabb kompozit transzpozon távolságán belül voltak megtalálhatók a kontigon. Mindezen túl vizsgáltuk a plazmidon való kódolást a PlasFlow v1.1 szoftver segítségével , a fág genomok jelenlétét a kontigokon pedig a VirSorter v2.2.2 [114] szoftver segítségével határoztuk meg.

A statisztikai elemzés során az így kapott eredményeket, az egyes rezisztencia gének jelentőségét a CARD adatbázisában leírt információkkal hasonlítottuk össze. Az adatok közül csak a 95% feletti lefedettséggel és szekvencia azonossággal rendelkező adatokat vettük figyelembe. Az adatbázisból kiolvasható az egyes rezisztencia gének okozta rezisztencia mechanizmus, annak rövid leírása és hogy mely antibiotikum csoportok esetén vezet a gén megléte rezisztenciához.

5. EREDMÉNYEK

Az **1. táblázat** összefoglalja a készítményekből izolált *E. faecium* törzsek MIC-érték meghatározással kapott, az egyes hatóanyagokra kifejeződő fenotípusos érzékenységi, illetve rezisztencia eredményeket; a **2. táblázat** pedig *Lactobacillus* és *Pediococcus* fajok esetén foglalja ugyanezt össze. A **3. táblázatban** az egyes készítményekben található, a gyártó által definiált probiotikus fajokkal, nemzetközileg elismert törzsszámukkal, a készítményben található telepformáló egység (CFU) és a célállatfaj, valamint az új generációs szekvenálás során kapott eredmények minőségét tükrözve a feltüntetett read-számmal kiegészítve találhatók információk.

E. faecium esetén a Gastroferm pet készítmény (DSM7134) kivételével az összes többi törzs ugyanazzal a törzsszámmal rendelkezett (NCIMB10415). A törzsek nemzetközi klasszifikációjáért három fő nemzetközi szervezet felel, ezek alapján vannak ellátva egyedi azonosítóval a készítményekben található probiotikus törzsek. A legtöbb esetben van megfeleltethetőség a három szervezet között, azonban nem minden esetben. A CECT (*Spanish Type Culture Collection*) egy spanyol törzsgyűjtemény, mely ISO 9001 szabvánnyal rendelkezik [115]. Az NCIMB (*National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria*) az Egyesült Királyságban található törzsgyűjtemény, mely magántulajdonban van [116]. A DSM (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) pedig egy német törzsgyűjtemény [117]. Az összes törzs esetén nagyon hasonló MIC-értékeket figyeltünk meg, az összes vizsgált törzs érzékenynek bizonyult penicillinre, amoxicillinre, amoxicillin-klavulánsavra, oxitetraciklinre, doxiciklinre, klindamicinre, tilozinra és vankomicinre. Gentamicin (100%; >32 µg/ml MIC) és potenciált szulfonamid (szulfametoxazol és trimetoprim) esetén (100%; 16 µg/ml MIC) az összes törzs rezisztensnek bizonyult. A negyedik generációs fluorokinolonok közé tartozó gatifloxacin esetén hat törzs volt érzékeny, három pedig rezisztens (66,7%; >2 µg/ml MIC).

A *Lactobacillus* törzsek közül egy *L. plantarum* törzset sikerült színtenyészetben izolálni, mely penicillinre, amoxicillin-klavulánsavra, gentamicinre, oxitetraciklinre, doxiciklinre, klindamicinre, tilozinra és vankomicinre volt érzékeny. Rezisztens volt amoxicillinre (>1 µg/ml MIC), potenciált szulfonamidra (>16 µg/ml MIC) és gatifloxacinra (>2 µg/ml MIC). A *Pediococcus* fajok közül két *P. pentasaccus* és egy *P. acidilactici* törzset sikerült izolálni, melyek kizárólag a klindamicin hatóanyagra voltak érzékenyek (<8 µg/ml MIC), az összes többi általunk vizsgált hatóanyagra rezisztenciát mutattak.

1. táblázat A készítményekből izolált *E. faecium* törzsek MIC-értéke a vizsgált hatóanyagokra. érzékeny, rezisztens

Készítmény	Állatfaj	Faj	PEN	AMX	AMK	GEN	OTC	DOX	KLI	PSA	GAT	FLO	TIL	VAN
			MIC (µg/ml)											
		Breakpoint*	≥16	≥8	≥8	≥32	≥8	≥0,5	≥32	≥16	≥2	≥8	≥128	≥4
Pro-Pet paszta	kutya, macska	***E. faecium***	4	1	1	>32	0,25	<0,125	4	>128	0,5	8	2	1
Synbiotic D-C	kutya, macska		8	1	1	>32	0,25	<0,125	4	>128	0,5	8	2	1
Agroferm cat	macska		4	1	2	32	0,25	<0,125	4	>128	1	8	1	1
Agroferm pet	kutya		8	1	2	32	0,25	<0,125	4	>128	0,5	8	1	2
Florentero act paszta	kutya, macska		4	1	1	>32	0,25	<0,125	4	>128	0,5	8	2	2
Florentero act tabletta	kutya, macska		8	1	1	>32	0,25	<0,125	4	>128	0,5	8	2	1
Promax	kutya		8	1	1	>32	0,25	<0,125	8	>128	2	8	1	1
Probicol-H paszta	kutya, macska		8	1	1	>32	0,25	<0,125	4	>128	2	8	2	2
Gastroferm pet	kutya		8	1	1	32	0,25	<0,125	8	>128	2	8	1	1

PEN-penicillin, AMX-amoxicillin, AMK-amoxicillin-klavulánsav, GEN-gentamicin, OTC-oxitetraciklin, DOX-doxiciklin, KLI-klindamicin, PSA-potenciált szulfonamid, GAT-gatifloxacin, FLO-florfenikol, TIL-tilozin, VAN-vankomicin; *CLSI és EUCAST

2. táblázat A készítményekből izolált L*actobacillius* és *Pediococcus* törzsek MIC-értéke. érzékeny, rezisztens

Készítmény	Állatfaj	Faj	PEN	AMX	AMK	GEN	OTC	DOX	KLI	PSA	GAT	FLO	TIL	VAN
			MIC (µg/ml)											
		Breakpoint*	≥8	≥8	≥8	≥512	≥32	≥32	≥8	≥32	≥2	-	≥32	≥16
Canius	kutya	*L. plantarum*	1	16	0,25	8	4	2	<0,125	>128	2	2	2	1
Készítmény	**Állatfaj**	**Breakpoint***	≥0,125	≥0,125	≥0,125	≥4	≥4	≥4	≥0,5	≥2	≥1	≥8	-	≥4
Afroferm cat	macska	*P. pentasaccus*	0,5	16	4	>128	32	16	<0,125	>128	8	8	2	>128
Agroferm pet	kutya	*P. pentasaccus*	1	16	4	32	32	32	<0,125	>128	8	8	4	>128
Florentero act tabletta	kutya, macska	*P. acidilactici*	0,25	8	2	>128	32	8	<0,125	>128	4	8	2	>128

PEN-penicillin, AMX-amoxicillin, AMK-amoxicillin-klavulánsav, GEN-gentamicin, OTC-oxitetraciklin, DOX-doxiciklin, KLI-klindamicin, PSA-potenciált szulfonamid, GAT-gatifloxacin, FLO-florfenikol, TIL-tilozin, VAN-vankomicin; *CLSI és EUCAST

3. táblázat Az egyes készítményekben megtalálható törzsek, törzsszámuk, CFU számuk, valamint a szekvenálás során kapott readszámuk

Készítmény	Törzs	Törzsszám	CFU	Readszám
Canius	*Lactobacillus fermentum*	NCIMB41636	$3*10^{11}$ CFU/kg	9059026
	Lactobacillus plantarum	NCIMB41638		
	Lactobacillus rhamnosus	NCIMB41640		
Pro-Pet paszta	*Enterococcus faecium*	NCIMB10415	$1,125*10^{8}$ CFU/g	10989104
Synbiotic D-C	*Enterococcus faecium*	NCIMB10415	$1*10^{13}$ CFU/kg	8586294
Agroferm cat	*Lactobacillus plantarum*	DSM12837	$1*10^{9}$ CFU/g	7599134
	Pediococcus acidilactici	DSM16243		
	Enterococcus faecium	NCIMB10415		
Agroferm pet	*Lactobacillus plantarum*	DSM12837	$1*10^{9}$ CFU/g	3409408
	Pediococcus acidilactici	DSM16243		
	Enterococcus faecium	NCIMB10415		
Florentero act paszta	*Pediococcus pentasaccus*	DSM1283U	$1*10^{9}$ CFU/g	8599150
	Lactobacillus brevis	DSM12835		
	Lactobacillus buchnerii	DSM12856		
	Lactobacillus plantarum	DSM12836		
	Lactobacillus rhamnosus	NCIMB30121		
	Enterococcus faecium	NCIMB10415	$2,8*10^{11}$ CFU	
	Lactobacillus acidophilus	CECTU529	$8,6*10^{12}$ CFU	
Florentero act tabletta	*Pediococcus pentasaccus*	DSM1283U	$1*10^{9}$ CFU/g	7383340
	Lactobacillus brevis	DSM12835		
	Lactobacillus buchnerii	DSM12856		
	Lactobacillus plantarum	DSM12836		
	Lactobacillus rhamnosus	NCIMB30121		
	Enterococcus faecium	NCIMB10415	$1,7*10^{11}$ CFU	
	Lactobacillus acidophilus	CECTU529	$5,2*10^{12}$ CFU	
Promax	*Enterococcus faecium*	NCIMB10415	$2*10^{11}$ CFU	7426306
Probicol-H paszta	*Enterococcus faecium*	NCIMB10415	$2*10^{11}$ CFU	12190218
Gastroferm pet	*Lactobacillus plantarum*	DSM12837	$1*10^{9}$ CFU/g	6706486
	Pediococcus acidilactici	DSM16243		
	Enterococcus faecium	DSM7134		

CFU – telepformáló egység

A **4. táblázat** az új generációs szekvenálás során kapott eredményeket foglalja össze, a készítményekben izolált rezisztencia gének, azok taxon eredete, az egyes gének ARG családját jelölve és hogy milyen rezisztencia mechanizmust kódolnak az adott gének, valamint, hogy milyen antibiotikum csoportokkal szemben alakítanak ki rezisztenciát.

Összesen 19 ARG-t azonosítottunk, melyek közül 11 db plazmidon volt található, fágon nem azonosítottunk gént. Különösen aggasztó, hogy két készítmény esetén egy-egy plazmidon található gén egyben MGE volt. Az egyik az *APH(3')-Ia* gén volt, amely a Probicol-H pasztában volt megtalálható. Ennek a rezisztencia génnek az aktiválódása enzimatikus úton (foszfotranszferáz) képes inaktiválni az aminoglikozid antibiotikumokat. A másik gén a *tetS* gén volt, mely a Pro-pet pasztában volt megtalálható. Ez a gén célpont védelem útján (mozaikos riboszóma) képes a tetraciklin hatóanyagokkal szemben kialakítani hatékonyság csökkenést, a hatóanyag bekötődésének megakadályozása révén.

A MIC-érték meghatározások során kapott rezisztensnek számító magas értékek és az egyes készítmények *E. faecium* törzseiben azonosított ARG-k között több esetben összefüggés mutatható ki. Az *AAC(6')-Ii* gén enzimatikus úton (acetiltranszferáz) képes az aminoglikozid esetén rezisztenciát kialakítani, ez a gén az összes vizsgált készítményben megtalálható volt és a fenotípusosan, az összes törzs esetén megfigyelhető rezisztencia (≥32 µg/ml) hátterében álló egyik gén lehetett. Ki kell emelni, hogy általában kromoszómálisan található, azonban egy esetben (Florentero act paszta) ez a gén átugrott plazmidra. Az *eatAv* gén célpont védelem (ABC-F típusú) révén alakít ki rezisztenciát linkózamidokkal és pleuromutilinekkel szemben, ez a gén az összes készítmény *E. faecium* törzseiben megtalálható volt. Az *efmA* egy MFS-típusú efflux pumpa makrolid és fluorokinolon hatóanyagok esetén, ami egy esetben (Gastroferm pet) állhat a rezisztencia mögött gatifloxacinnal szemben (2 µg/ml MIC). Az *rsmA* gén egy RND-típusú multidrug efflux pumpa, ami fenikolokkal, fluorokinolonokkal és diaminopirimidinekkel szemben alakíthat ki rezisztenciát. Ez a gén szintén az összes *E. faecium* törzsben megtalálható volt, és magyarázhatja az összes esetben tapasztalt potenciált szulfonamid rezisztenciát (>128 µg/ml MIC), a Promax, Probicol-H paszta és Gastroferm pet esetén megfigyelt rezisztenciát gatifloxacinnal szemben (2 µg/ml MIC), valamint a florfenikol rezisztencia kialakításához szintén hozzájárulhatott (8 µg/ml MIC).

Összességében tehát elmondhatjuk, hogy több azonosított ARG és annak fenotípusos kifejeződése között, a MIC-értékek tükrében összefüggés figyelhető meg. Eredményeink alapján az összes fenotípusos rezisztencia mögött sikeresen azonosítottunk ARG-t. Különösen aggasztó a plazmidon található gének igen magas aránya (57,9%) és az, hogy két esetben ezek MGE-k voltak. Az általunk leírt eredmények alapján tehát szükséges lenne az élelmiszertermelő állatokéhoz hasonlóan, a társállatok probiotikus készítményeinek forgalomba-hozatala előtt is az ilyen jellegű vizsgálatok elvégzése.

4. táblázat Az egyes készítmények ARG-készlete, azok hatásmechanizmusa, hatóanyagcsoporttal szemben kialakított rezisztencia

plazmidon kódolt gén																								
az adott ARG fenotípusos kifejeződése a MIC-értékek tükrében																								
*** MGE – mobilis genetikai elem**																								
				I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**	**VII**	**VIII**	**IX**	**X**	**XI**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
Gén	**Taxon eredet**	**ARG család**	**Mechanizmus**																					
AAC(6')-Ii	*Enterococcus* spp.	acetiltranszferáz	enzimatikus inaktiváció		x										x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
aad(6)	*Lactococcus* spp.	nukleotidiltranszferáz	enzimatikus inaktiváció		x										x							x		
APH(3')-Ia	*Klebsiella* spp.	foszfotranszferáz	enzimatikus inaktiváció		x										x							x*		
APH(3")-Ib	*Klebsiella* spp.	foszfotranszferáz	enzimatikus inaktiváció		x										x							x		
APH(3')-IIIa	*Lactococcus* spp.	foszfotranszferáz	enzimatikus inaktiváció		x										x							x		
APH(6)-Id	*Pseudomonas* spp.	foszfotranszferáz	enzimatikus inaktiváció		x										x							x		
catA8	*Lactobacillus* spp.	acetiltranszferáz	enzimatikus inaktiváció				x															x		
CRP	*Hafnia* spp.	RND-típusú	efflux pumpa	x				x			x				x									
eatAv	*Enterococcus* spp.	ABC-F	célpont védelem						x	x					x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
efmA	*Enterococcus* spp.	MFS-típusú	efflux pumpa					x			x						x	x						x
ermB	*Enterococcus* spp.	metiltranszferáz	célpont módosítás					x	x						x							x		
EF-Tu	*Hafnia* spp.	ABC-F	célpont védelem												x									
msrC	*Enterococcus* spp.	ABC-F	célpont védelem					x							x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
rsmA	*Hafnia* spp.	RND-típusú	efflux pumpa				x				x	x			x									
SAT-4	*Lactococcus* spp.	acetiltranszferáz	enzimatikus inaktiváció			x								x	x							x		
tetC	*Enterococcus* spp.	MFS-típusú	efflux pumpa			x																x		
tetD	*Acinetobacter* spp.	MFS-típusú	efflux pumpa			x									x									
tetM	*Enterococcus* spp.	mozaikos, riboszóma	célpont védelem			x																x		
tetS	*Streptococcus* spp.	mozaikos, riboszóma	célpont védelem			x									x*							x		

I. penicillinek, II. aminoglikozidok, III. tetraciklinek, IV. fenikolok, V. makrolidok, VI. linkózamidok, VII. pleuromutilinek, VIII. fluorokinolonok, IX. diaminopirimidinek, X. rifamicinek, XI. nukleozidok;

1. Pro-Pet paszta; 2. Synbiotic D-C; 3. Agroferm cat; 4. Agroferm pet; 5. Florentero act paszta; 6. Florentero act tabletta; 7. Promax; 8. Probicol-H paszta; 9. Gastroferm pet

Az egyes készítmények áttekintése alapján elmondhatjuk, hogy összesen tíz kereskedelmi forgalomban kapható társállatok számára elérhető készítmény új generációs szekvenálását végeztük el. Egy készítmény esetén, a Canius készítményben, ami *L. plantarum* (NCIMB41638), *Lactobacillus fermentum* (NCIMB41636) és *Lactobacillus rhamnosus* (NCIMB41640) törzseket tartalmaz, nem találtunk ARG-t. Így az ez esetben tapasztalt fenotípusos rezisztenciát nem tudjuk genotípusosan génekkel alátámasztani.

A Pro-Pet paszta *E. faecium* (NCIMB10415) törzset tartalmazott, ebben 15 ARG-t azonosítottunk, melyek közül 7 volt plazmidon található és egy (*tetS*) gén volt MGE. Összesen 4 db gén volt ténylegesen *Enterococcus* fajból eredeztethető, a többi gén *Lactococcus, Klebsiella, Pseudomonas, Hafnia, Acinetobacter* és *Streptococcus* fajokból kerültek át a törzsbe. A Synbiotic D-C és Promax készítményekben szintén *E. faecium* volt (NCIMB10415), melyből 3 ARG-t azonosítottunk, melyek mind kromoszómális gének és *Enterococcus* spp. eredetűek voltak. Az Agroferm cat, Gastroferm pet és Agroferm pet készítmények *L. plantarum* (DSM12837), *P. acidilactici* (DSM16243) és *E. faecium* (NCIMB10415) fajokat tartalmaznak, mindhárom készítmény esetén ugyanannak a 4 ARG-nek a jelenlétét azonosítottuk, ezek a gének kromoszómálisan voltak megtalálhatóak és mind *Enterococcus* spp. eredetű volt.

A Florentero paszta *P. pentasaccus* (DSM1283U), *Lactobacillus brevis* (DSM12835), *Lactobacillus bucherii* (DSM12856), *L. plantarum* (DSM12836), *Lactobacillus rhamnosus* (NCIMB30121), *Lactobacillus acidophilus* (CECTU529) és *E. faecium* (NCIMB10415) törzseket tartalmazott, melyek közül a *Pediococcus* és *Lactobacillus* fajok inaktivált formában voltak a készítményben. Négyféle rezisztencia génjük megegyezik az Agroferm pet készítményben találtakkal, azonban ebből a paszta esetében az *AAC(6')-Ii* gén plazmidon volt található, a többi gén kromoszómális. Az összes gén *Enterococcus* spp. eredeztethető volt. A Florentero tabletta összetétele megegyezik a Florentero pasztáéval, azonban itt csak két kromoszómálisan található ARG-t tudtunk azonosítani, melyek *Enterococcus* spp. eredetűek voltak.

A Probicol-H paszta, amiben *E. faecium* (NCIMB10415) törzs van, tartalmazta a legtöbb azonosított ARG-t, összesen 14 db-ot. Ezek közül 8 db plazmidon volt megtalálható és ezek közül az *APH(3')-Ia* gén egyben MGE volt. A gének közül 5 db volt eredendően *Enterococcus* spp. eredetű, a többit a törzs más fajokból horizontális géntranszferrel szerezhette *Staphylococcus, Klebsiella, Lactobacillales, Enterobacteriaceae, Enterobacterales, Streptococcus* fajoktól.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Összesen tízféle, társállatok (kutya, macska) számára kereskedelmi forgalomban kapható probiotikus készítményből izolált probiotikus törzs *in vitro* antibiotikum érzékenységét vizsgáltuk, valamint a készítmények új generációs szekvenálással történő feltárása során 19-féle ARG-t azonosítottunk. Az egyik legnépszerűbb probiotikumként használt törzs az *E. faecium*, mind az állatgyógyászatban és a közegészségügyben széles körben használják [118].

Az általunk vizsgált *E. faecium* törzsek mindegyike mutatott gentamicin rezisztenciát, >32 µg/ml MIC értékekkel. Ezzel szemben Takeuchi és mtsai. kutatása során, az általuk izolált *E. faecium* törzsek 22 %-ában ez az érték >500 µg/ml volt [119]. Shokoohizadek és mtsai. betegekből izolált törzsei ennél is jóval magasabb értékeket mutattak (1024 µg/ml MIC) [120], ugyanilyen eredményt kapott Talebi és mtsai. az általuk tanulmányozott *E. faecium* törzsek 95 %-ában, melyeket húsból, csirkéből és sajtból izoláltak [121]. Xu és mtsai. egy szennyvízből származó törzs antimikrobiális érzékenységi vizsgálata során potenciált szulfonamidnál (szulfometoxazol-trimetoprim) extrém magas (9000 µg/ml MIC) értéket találtak [122]. Kutatásunk során ennél sokkal kisebb értékeket (16 µg/ml MIC) mutattunk ki. Maasjost és mtsai. baromfiből származó izolátumainál mind gentamicinre, mind pedig potenciált szulfonamidra hasonló eredményeket kaptak (32 µg/ml MIC, 16 µg/ml MIC) [123]. Három törzsben gatifloxacinnal szembeni rezisztenciát is megfigyeltünk, viszonylag alacsony értékkel (>2 µg/ml MIC). Ezt az eredményt több eddigi tanulmány is alátámasztja. Klinikai izolátumokkal dolgozott Wenzler és mtsai., ahol az értékek szélesebb skálán mozogtak (0,5-64 µg/ml MIC), azonban a medián érték (2 µg/ml MIC) megegyezett az általunk leírtakkal [124]. Szintén klinikai forrásból származó törzsekkel dolgoztak Fung-Tomc és mtsai. és Wickman és mtsai., azonban az ő értékeik az alsóbb tartományban voltak (4 µg/ml MIC, 2-4 µg/ml MIC) [125, 126].

Kilenc készítményben volt *E. faecium*, amelyekben mind a 19-féle ARG megtalálható volt. Xia és mtsai. *E. faecium* törzsben 18 ARG-t azonosítottak, amelyek közül egyik sem volt MGE [127], ezzel ellentétben mi két gén esetén (*aph(3')-Ia*, *tetS*) írtuk le a mobilitás valószínűségét. Az általuk leírt gének közül mi is azonosítottuk az *aac(6')-Ii* gént (aminoglikozidok, enzimatikus inaktiváció) és az *msrC* gént (makrolidok, efflux pumpa), amelyek közül utóbbi gén esetén tapasztaltuk a legtöbb esetben annak kifejeződését fenotípusosan a MIC-értékek tükrében, egy készítményben pedig plazmidon volt megtalálható ez a gén. Uershev és mtsai. szintén leírták az *aac(6')-Ii* gén jelenlétét [79].

Zaghloul és mtsai. 11 ARG-t azonosítottak és több esetben a fenotípusos kifejeződést is alátámasztották, hozzánk hasonló módon leírták az *aac(6')- Ii* gén, az *msrC* gén és a *ef-Tu* gén (fuzidinsav; célpontvédelem) jelenlétét [128]. Farkas és mtsai. antropogén eredetű környezeti mintákból azonosított *E. faecium* törzseket tanulmányoztak, annak antimikrobiális rezisztencia terjesztésében betöltött szerepét nézve, megállapították, hogy a törzsek 20%-a legalább egy ARG-t hordozott, a gének legtöbb esetben a rezisztencia fenotípusos kifejeződésével összekapcsolhatóak voltak, a leggyakrabban előforduló gének a *tetM* (tetraciklinek; célpontvédelem) gén és az *ermB* (makrolidok, linkózamidok; célpont módosítás) gén volt [129], mely géneket mi is kimutattuk. Ugyanezt a gént Pan és mtsai. is azonosították, ami plazmidon volt megtalálható [66], amelyet szintén plazmidon detektáltunk mi is. Eredményeinkhez hasonlóan Thumu és mtsai. *tetM* gént és *ermB* gént (makrolidok, linkózamidok; célpont módosítás) azonosítottak, mely gének *Streptococcus* törzsekből voltak eredeztethetők a metagenomikai vizsgálatok alapján és fenotípusosan is kimutatták a gének okozta rezisztenciát [130], ellenben mi fenotípusos kifejeződést nem tapasztaltuk, viszont plazmidon volt megtalálható a gén. Ture és mtsai. 13 ARG-t azonosítottak, a vizsgált törzsek többségében kimutatták a *tetD* gén (tetraciklinek; efflux pumpa) jelenlétét [131], amit mi is azonosítottunk egy készítményben. Hummel és mtsai. probiotikus törzsekből *cat*-géneket azonosítottak [95], vizsgálataink során *catA8* (fenikolok; enzimatikus inaktiváció) gént azonosítottunk, ami viszont *Lactobacillus* spp. eredetűnek bizonyult. Urhev és mtsai. pedig *msrC* gént (makrolidok; célpont védelem) azonosítottak [79], vizsgálatunk során minden *Enterococcus* spp. esetén kimutattuk ennek a génnek a jelenlétét.

Nawaz és mtsai. *L. plantarum* vizsgálata során azonosítottak *ermB* gént és *tetM* gént, melyek génátvitelét *Enterococcus* izolátumba kísérletes körülmények között sikeresen kivitelezték [59], a mi vizsgálataink során a *L. plantarum* törzset is tartalmazó készítmények esetén azonosított *ermB* gén minden esetben *Enterococcus* spp. eredetűnek bizonyult. Pan és mtsai. szintén kimutatták a *tetM* gén jelenlétét, ami plazmidon volt megtalálható [66], vizsgálataink során *Enterococcus* eredetűnek azonosítottuk a gént, viszont mi is plazmidon találtuk azt meg. Thumu és mtsai. pedig az *ermB* gén jelenlétét mutatták ki [130]. Aristimuño és mtsai. *cat* gént azonosítottak [89], az általunk azonosított *catA8* gén metagenomikai vizsgálata alátámasztotta annak *Lactobacillus* eredetét és plazmidon volt megtalálható. Aristimuño és mtsai, valamint Thumu és mtsai. is leírták a *tetS* gén (tetraciklinek, célpont védelem) jelenlétét [89, 93], mely gént mi is kimutattuk, viszont *Streptoccous* eredetűnek

bizonyult, plazmidon volt megtalálható, és a ProPet paszta esetén mobilis gén volt. Chang és mtsai a *tetM* gént azonosították [98], ami viszont a mi esetünkben *Enterococcus* eredetű volt és plazmidon volt megtalálható.

Thumu és mtsai. elsőként azonosították az *msrC* gént *P. pentasaccus* fajban, de kimutatták az *ermB* gén és *msrC* gén jelenlétét is [130], bár vizsgálataink során mindkét gént több készítményben kimutattuk, de a metagenomikai vizsgálatok alapján ezek a gének *Enterococcus* spp. eredetűek voltak, viszont fenotípusosan az általa meghatározott rezisztencia kifejeződését tapasztaltuk. Shani és mtsai. nem tudtak kimutatni probiotikus törzsekből ARG-t [132], vizsgálataink során mi sem azonosítottunk a készítményekben található törzsekből származó ARG-t. Thumu és mtsai. egy másik vizsgálatukban *ermB* és *msrC* gének jelenlétét mutatták ki, *ermB* gén esetén pedig kísérletes körülmények között bizonyították annak géntranszferjét *Enterococcus faecalis* törzsbe [133], a mi vizsgálataink során ezek a gének mind *Enterococcus* spp. eredetűnek bizonyultak.

Összességében elmondhatjuk, hogy a probiotikus törzsek közül a legtöbb rezisztencia gént az *E. faecium* baktérium hordozza, a szakirodalmi adatok és a mi eredményeink alapján is. A *Lactobacillus* és a *Pediococcus* fajoknál a szakirodalomban leírt ARG-k közül mi a legtöbb esetben *Enterococcus* törzsekben azonosítottuk ezeket a rezisztencia géneket. Kimutattunk olyan rezisztenciáért felelős *L. plantarum* eredetű gént (*efmA*), amit korábban más nem írt le. A legtöbb azonosított ARG (57,9%) plazmidon volt megtalálható; két készítmény esetében, a Pro-Pet paszta (*tetS* gén) és a Probicol-H paszta (*APH(3')-Ia* gén) esetén azonosítottunk plazmidon található MGE gént. Előbbi esetében tetraciklin hatóanyagokkal szembeni célpont védelemért; utóbbi esetében aminoglikozidokkal szembeni enzimatikus inaktivációért felelnek ezek a gének, megteremtve a horizontális géntranszfer lehetőségét. Meglehetősen szegényes az összehasonlításra alkalmas, probiotikus törzsek ARG készletét feltáró szakirodalmi munka a társállatoknak szánt probiotikus készítményekben található törzsek esetében. Eredményeink alátámasztják a létjogosultságát az ilyen jellegű vizsgálatok végzésének és megfontolandó a forgalmazás feltételeként jogszabályilag ilyen jellegű vizsgálatok előírása; mint ami gazdasági haszonállatoknak szánt készítmények esetén már megvalósult.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjaink egyik legfőbb egészségügyi problémája az antimikrobiális rezisztencia széleskörű terjedése. A rezisztenciagének terjedése elsősorban az antimikrobiális szerek nem előírásszerű túlhasználatához kötődik. Az antibiotikum terápia kiegészítésére, kiváltására használt probiotikus készítmények is hordozhatnak a rezisztencia kialakulásáért felelős géneket. A társállatoknál használt készítmények esetében nincs jogszabályi előírás ennek vizsgálatára, ennélfogva az erről szóló szakirodalom is szegényes.

Kutatásunk célja a hazánkban, társállatok részére felhasználható probiotikus készítmények antimikrobiális rezisztencia génkészletének (ARG) vizsgálata, minimális gátló koncentráció (MIC) értékek meghatározásának segítségével pedig annak vizsgálata, hogy ezek a gének fenotípusosan kifejeződnek-e. A készítményekből a legtöbb esetben *Enterococcus faecium* törzset izoláltunk, ezen kívül sikeresen azonosítottunk *Lactobacillus plantarum, Pediococcus pentasaccus* és *Pediococcus acidilactici* törzseket. Összesen 19 ARG-t sikerült azonosítanunk, közülük 11 gén plazmidon volt megtalálható (57,9 %) ami megnöveli a gének mobilitásának az esélyét. Az *APH(3')-Ia* gén (aminoglikozidok; enzimatikus inaktiváció) és a *tetS* gén (tetraciklinek; célpontvédelem) esetében azokat mobilis genetikai elemként (MGE) azonosítottuk, tehát transzferábilis gének voltak. A rezisztencia gének jelenléte aminoglikozidok, fenikolok, fluorokinolonok és diaminopirimidinek esetén támasztották alá a rezisztencia fenotípusos kifejeződését. A legtöbb ARG-t (15) a Pro-pet pasztában mutattuk ki, a Canius készítményben azonban nem találtunk rezisztenciáért felelős géneket. Eredményeink alapján a probiotikus törzsek közül a legtöbb rezisztenciagént az *Enterococcus faecium* hordozta, amit a szakirodalmi adatok is alátámasztanak. Esőként írtunk le egy *Lactobacillus plantarum* eredetű ARG-t (*efmA*), amely a makrolidok és fluorokinolonokkal szembeni rezisztenciáért felelős.

Összességében elmondhatjuk, hogy eredményeink több esetben egybevágtak a mások által szakirodalomban leírt eredményekkel, de néhány esetben eltérő vagy új eredményeket is kimutattunk. A gének nagyarányú plazmidon történő elhelyezkedése és a mobilitás kimutatása alátámasztják a létjogosultságát annak, hogy nemcsak az élelmiszertermelő állatok számára szánt probiotikumos készítmények esetén lenne szükség azok szűrésére a közegészségügyi szempontból fontos hatóanyagokra, hanem a társállatok számára szánt probiotikus készítményeknél is jogilag szükséges lenne szabályozni ilyen vizsgálatok elvégzését. A jövőben érdemes újszerű megközelítéssel vizsgálni a probiotikumok biztonságosságát.

8. SUMMARY

One of today's major health problems is the wide spread of antimicrobial resistance. The spread of resistance genes is mainly linked to the unregulated overuse of antimicrobials. Probiotics used to supplement or replace antibiotic therapy may also carry the genes responsible for the development of resistance. There is no legal requirement to test for this in companion animal products and therefore the literature on this is scarce.

The aim of our research is to investigate the antimicrobial resistance gene set (ARG) of probiotic products for companion animals in Hungary and to determine whether these genes are phenotypically expressed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) values. In most cases, *Enterococcus faecium* strains were isolated from the preparations, and *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentasaccus* and *Pediococcus acidilactici* strains were also successfully identified. In total, 19 ARGs were identified, 11 of which were found on plasmids (57.9%), increasing the chances of gene mobility. For the *APH(3')-Ia* gene (aminoglycosides; enzymatic inactivation) and the *tetS* gene (tetracyclines; target protection), they were identified as mobile genetic elements (MGEs) and were therefore transferable genes. The presence of resistance genes for aminoglycosides, phenicols, fluoroquinolones and diaminopyrimidines supported the phenotypic expression of resistance. Most ARGs (15) were detected in Pro-pet paste, but no genes responsible for resistance were found in the Canius formulation. Based on our results, *Enterococcus faecium* carried the highest number of resistance genes among the probiotic strains, which is supported by the literature. We described an ARG of *Lactobacillus plantarum* origin (*efmA*) as an event responsible for resistance to macrolides and fluoroquinolones.

In conclusion, our results are in several cases in agreement with those reported by others in the literature, but in some cases, we have also shown different or new results. The high prevalence of genes on plasmids and the demonstration of mobility support the need to screen probiotic products not only for food-producing animals for active substances of public health concern, but also to regulate the performance of such tests for probiotic products intended for companion animals. In the future, a novel approach to the safety of probiotics should be considered.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Alós J-I (2015) Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 33:692–699. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004
2. Munita JM, Arias CA (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiology Spectrum 4:4.2.15. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
3. Global antimicrobial resistance forum launched to help tackle common threat to planetary health. https://www.who.int/news-room/articles-detail/global-antimicrobial-resistance-forum-launched-to-help-tackle-common-threat-to-planetary-health. Accessed 14 May 2023
4. O'Neill J (2016) Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Government of the United Kingdom
5. World Health Organization (2015) Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization, Geneva
6. Lack of innovation set to undermine antibiotic performance and health gains. https://www.who.int/news/item/22-06-2022-22-06-2022-lack-of-innovation-set-to-undermine-antibiotic-performance-and-health-gains. Accessed 14 May 2023
7. van Duijkeren E, Schink A-K, Roberts MC, Wang Y, Schwarz S (2018) Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. Microbiology Spectrum 6:10.1128/microbiolspec.arba-0019–2017. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0019-2017
8. Schwarz S, Chaslus-Dancla E (2001) Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Vet Res 32:201–225. https://doi.org/10.1051/vetres:2001120
9. Lerminiaux NA, Cameron ADS (2018) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. Canadian Journal of Microbiology. https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275
10. Gama JA, Zilhão R, Dionisio F (2018) Impact of plasmid interactions with the chromosome and other plasmids on the spread of antibiotic resistance. Plasmid 99:82–88. https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2018.09.009
11. Hawkey PM (1998) The origins and molecular basis of antibiotic resistance. BMJ 317:657–660
12. Krašovec R, Jerman I (2003) Bacterial multicellularity as a possible source of antibiotic resistance. Medical Hypotheses 60:484–488. https://doi.org/10.1016/S0306-9877(02)00394-8
13. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A (2011) Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. Medicina (Kaunas) 47:137–146
14. Bennett PM (2008) Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. Br J Pharmacol 153:S347–S357. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607
15. Alekshun MN, Levy SB (2007) Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. Cell 128:1037–1050. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004
16. Themes UFO (2017) Attacking the enemy: antimicrobial agents and chemotherapy. In: Basicmedical Key. https://basicmedicalkey.com/attacking-the-enemy-antimicrobial-agents-and-chemotherapy/. Accessed 31 Jul 2023
17. Bush K, Jacoby GA (2010) Updated Functional Classification of β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother 54:969–976. https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09
18. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 39:1211–1233
19. Vatopoulos A (2008) High rates of metallo-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in Greece - a review of the current evidence. Eurosurveillance 13:7–8. https://doi.org/10.2807/ese.13.04.08023-en
20. Didi S (2008) Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects
21. Tenover FC (2006) Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine 119:S3–S10. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011
22. Weisblum B (1995) Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrob Agents Chemother 39:577–585

23. Martínez-Martínez L, García I, Ballesta S, Benedí VJ, Hernández-Allés S, Pascual A (1998) Energy-Dependent Accumulation of Fluoroquinolones in Quinolone-Resistant Klebsiella pneumoniae Strains. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42:1850. https://doi.org/10.1128/aac.42.7.1850

24. Lambert PA (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. J R Soc Med 95:22–26

25. van Veen HW, Konings WN (1997) Multidrug transporters from bacteria to man: similarities in structure and function. Seminars in Cancer Biology 8:183–191. https://doi.org/10.1006/scbi.1997.0064

26. Nikaido H (2003) Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. Microbiol Mol Biol Rev 67:593–656. https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003

27. Quinn JP, Dudek EJ, DiVincenzo CA, Lucks DA, Lerner SA (1986) Emergence of Resistance to Imipenem During Therapy for Pseudomonas aeruginosa Infections. The Journal of Infectious Diseases 154:289–294. https://doi.org/10.1093/infdis/154.2.289

28. Wilson DN, Hauryliuk V, Atkinson GC, O'Neill AJ (2020) Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. Nat Rev Microbiol 18:637–648. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0386-z

29. Burdett V (1991) Purification and characterization of Tet(M), a protein that renders ribosomes resistant to tetracycline. Journal of Biological Chemistry 266:2872–2877. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)49928-0

30. Roberts MC (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiology Letters 245:195–203. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.034

31. Sharkey LKR, Edwards TA, O'Neill AJ (2016) ABC-F Proteins Mediate Antibiotic Resistance through Ribosomal Protection. mBio 7:e01975-15. https://doi.org/10.1128/mBio.01975-15

32. Cox G, Thompson GS, Jenkins HT, Peske F, Savelsbergh A, Rodnina MV, Wintermeyer W, Homans SW, Edwards TA, O'Neill AJ (2012) Ribosome clearance by FusB-type proteins mediates resistance to the antibiotic fusidic acid. Proc Natl Acad Sci U S A 109:2102–2107. https://doi.org/10.1073/pnas.1117275109

33. Wilkins T, Sequoia J (2017) Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. Am Fam Physician 96:170–178

34. Jones RJ, Hussein HM, Zagorec M, Brightwell G, Tagg JR (2008) Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. Food Microbiology 25:228–234. https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.11.001

35. Paredes Paredes M, Flores-Figueroa J, Dupont H (2011) Advances in the Treatment of Travelers' Diarrhea. Current gastroenterology reports 13:402–7. https://doi.org/10.1007/s11894-011-0208-6

36. Dickinson B, Surawicz CM (2014) Infectious Diarrhea: An Overview. Curr Gastroenterol Rep 16:399. https://doi.org/10.1007/s11894-014-0399-8

37. Gedek (1999) Adherence of Escherichia coli serogroup 0 157 and the Salmonella Typhimurium mutant DT 104 to the surface of Saccharomyces boulardii. Mycoses 42:261–264. https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.1999.00449.x

38. Kumar S, Pattanaik AK, Sharma S, Jadhav SE, Dutta N, Kumar A (2017) Probiotic Potential of a Lactobacillus Bacterium of Canine Faecal-Origin and Its Impact on Select Gut Health Indices and Immune Response of Dogs. Probiotics Antimicrob Proteins 9:262–277. https://doi.org/10.1007/s12602-017-9256-z

39. Grześkowiak Ł, Endo A, Beasley S, Salminen S (2015) Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. Anaerobe 34:14–23. https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.04.002

40. Department of Molecular Biotechnology, Faculty of Chemistry, University of Gdansk, 80-308, Gdańsk, Poland, Jezewska-Frackowiak J, Seroczynska K, GRUPA INCO S.A., , Warszawa, Poland, Banaszczyk J, GRUPA INCO S.A., , Warszawa, Poland, Wozniak D, GRUPA INCO S.A., , Warszawa, Poland, Skowron M, BioVentures Institute Ltd.,60-141, Poznan, Poland, Ozog A, Department of Molecular Biotechnology, Faculty of Chemistry, University of Gdansk, 80-308, Gdańsk, Poland, Zylicz-Stachula A, Department of Molecular Biotechnology, Faculty of Chemistry, University of Gdansk, 80-308, Gdańsk, Poland, Ossowski T, Department ofAnalytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Gdansk,80-308, Poland, Skowron PM, Department of Molecular Biotechnology, Faculty of Chemistry, University of Gdansk, 80-308, Gdańsk, Poland (2017) Detection of endospore producing Bacillus

species from commercial probiotics and their preliminary microbiological characterization. JEB 38:1435–1440. https://doi.org/10.22438/jeb/38/6/MRN-478

41. He Y, Li F, Zhang W, An M, Li A, Wang Y, Zhang Y, Fakhar-e-Alam Kulyar M, Iqbal M, Li J (2022) Probiotic Potential of Bacillus amyloliquefaciens Isolated from Tibetan Yaks. Probiotics & Antimicro Prot. https://doi.org/10.1007/s12602-022-10027-5

42. Tang Y, Manninen TJK, Saris PEJ (2012) Dominance of Lactobacillus acidophilus in the Facultative Jejunal Lactobacillus Microbiota of Fistulated Beagles. Appl Environ Microbiol 78:7156–7159. https://doi.org/10.1128/AEM.01975-12

43. Tang Y, Saris PEJ (2013) Strain-specific detection of orally administered canine jejunum-dominated Lactobacillus acidophilus LAB20 in dog faeces by real-time PCR targeted to the novel surface layer protein. Lett Appl Microbiol 57:330–335. https://doi.org/10.1111/lam.12117

44. Rajput K, Dubey RC, Kumar A (2022) Probiotic potential and immunomodulatory properties in Enterococcus faecium GMB24 and Enterococcus hirae SMB16 isolated from goat and sheep milk. Arch Microbiol 204:619. https://doi.org/10.1007/s00203-022-03217-w

45. BS S, Thankappan B, Mahendran R, Muthusamy G, Femil selta DR, Angayarkanni J (2021) Evaluation of GABA Production and Probiotic Activities of Enterococcus faecium BS5. Probiotics & Antimicro Prot 13:993–1004. https://doi.org/10.1007/s12602-021-09759-7

46. Probiotic characteristics of bacteriocin-producing Enterococcus faecium strains isolated from human milk and colostrum | SpringerLink. https://link.springer.com/article/10.1007/s12223-019-00687-2. Accessed 22 Jul 2023

47. Jaiswal S, Pradhan SN, Jain D, Dhassiah Peter MP, Antony U (2022) Probiotic and Functional Characterization of Pediococcus acidilactici Isolated from Bhaati jaanr, Traditional Fermented Rice Porridge. Appl Biochem Biotechnol 194:5734–5747. https://doi.org/10.1007/s12010-022-04041-0

48. Barbosa J, Borges S, Teixeira P (2015) Pediococcus acidilactici as a potential probiotic to be used in food industry. International Journal of Food Science & Technology 50:1151–1157. https://doi.org/10.1111/ijfs.12768

49. Rima H, Steve L, Ismail F (2012) Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts: From Fundamental to Novel Applications. Frontiers in Microbiology 3:

50. Lokesh J, Fernandes JMO, Korsnes K, Bergh Ø, Brinchmann MF, Kiron V (2012) Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or β-Glucan and challenged with Vibrio anguillarum. Fish & Shellfish Immunology 33:626–631. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.06.017

51. Siesto G, Pietrafesa R, Infantino V, Thanh C, Pappalardo I, Romano P, Capece A (2022) In Vitro Study of Probiotic, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities among Indigenous Saccharomyces cerevisiae Strains. Foods 11:1342. https://doi.org/10.3390/foods11091342

52. Osmanagaoglu O, Kiran F, Ataoglu H (2010) Evaluation of in vitro Probiotic Potential of Pediococcus pentosaceus OZF Isolated from Human Breast Milk. Probiotics & Antimicro Prot 2:162–174. https://doi.org/10.1007/s12602-010-9050-7

53. Du H, Yao W, Kulyar MF-A, Ding Y, Zhu H, Pan H, Li K, Bhutta ZA, Liu S, Li J Effects of Bacillus amyloliquefaciens TL106 Isolated from Tibetan Pigs on Probiotic Potential and Intestinal Microbes in Weaned Piglets. Microbiol Spectr 10:e01205-21. https://doi.org/10.1128/spectrum.01205-21

54. Islam MI, Seo H, Redwan A, Kim S, Lee S, Siddiquee M, Song H-Y (2022) In Vitro and In Vivo Anti-Clostridioides difficile Effect of a Probiotic Bacillus amyloliquefaciens Strain. J Microbiol Biotechnol 32:46–55. https://doi.org/10.4014/jmb.2107.07057

55. Zeng Z, Zhang J, Li Y, Li K, Gong S, Li F, Wang P, Iqbal M, Kulyar MF-A, Li J (2022) Probiotic Potential of Bacillus licheniformis and Bacillus pumilus Isolated from Tibetan Yaks, China. Probiotics & Antimicro Prot 14:579–594. https://doi.org/10.1007/s12602-022-09939-z

56. Dindhoria K, Kumar S, Baliyan N, Raphel S, Halami PM, Kumar R (2022) Bacillus licheniformis MCC 2514 genome sequencing and functional annotation for providing genetic evidence for probiotic gut adhesion properties and its applicability as a bio-preservative agent. Gene 840:146744. https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146744

57. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK (1998) Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology 84:759–768. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00407.x

58. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK (2001) Gradient Diffusion Antibiotic Susceptibility Testing of Potentially Probiotic Lactobacilli. Journal of Food Protection 64:2007–2014. https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.12.2007

59. Nawaz M, Wang J, Zhou A, Ma C, Wu X, Moore JE, Cherie Millar B, Xu J (2011) Characterization and Transfer of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Food Products. Curr Microbiol 62:1081–1089. https://doi.org/10.1007/s00284-010-9856-2

60. Belletti N, Gatti M, Bottari B, Neviani E, Tabanelli G, Gardini F (2009) Antibiotic Resistance of Lactobacilli Isolated from Two Italian Hard Cheeses. Journal of Food Protection 72:2162–2169. https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.10.2162

61. Coppola R, Succi M, Tremonte P, Reale A, Salzano G, Sorrentino E (2005) Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. Lait 85:193–204. https://doi.org/10.1051/lait:2005007

62. Zdolec N, Filipović I, Fleck ZC, Marić A, Jankuloski D, Kozačinski L, Njari B (2011) Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages and raw cheese. Veterinarski Arhiv 81:133–141

63. Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal PK, Gill HS (2005) Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains. International Journal of Food Microbiology 98:211–217. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.011

64. Blandino G, Milazzo I, Fazio D (2008) Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products available in Italy. Microbial Ecology in Health and Disease 20:199–203. https://doi.org/10.1080/08910600802408111

65. Mater DDG, Langella P, Corthier G, Flores M-J (2007) A Probiotic Lactobacillus Strain Can Acquire Vancomycin Resistance during Digestive Transit in Mice. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 14:123–127. https://doi.org/10.1159/000106091

66. Pan L, Hu X, Wang X (2011) Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods. Food Control 22:1316–1321. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.02.006

67. Çataloluk O, Gogebakan B (2004) Presence of drug resistance in intestinal lactobacilli of dairy and human origin in Turkey. FEMS Microbiology Letters 236:7–12. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.05.010

68. Ammor MS, Flórez AB, van Hoek AHAM, de los Reyes-Gavilán CG, Aarts HJM, Margolles A, Mayo B (2007) Molecular Characterization of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 14:6–15. https://doi.org/10.1159/000106077

69. Feld L, Bielak E, Hammer K, Wilcks A (2009) Characterization of a small erythromycin resistance plasmid pLFE1 from the food-isolate Lactobacillus plantarum M345. Plasmid 61:159–170. https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2009.01.002

70. Hossain TJ (2022) Functional genomics of the lactic acid bacterium Limosilactobacillus fermentum LAB-1: metabolic, probiotic and biotechnological perspectives. Heliyon 8:e11412. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e11412

71. Kim H, Lee Y-S, Yu H-Y, Kwon M, Kim K-K, In G, Hong S-K, Kim S-K (2022) Anti-Inflammatory Effects of Limosilactobacillus fermentum KGC1601 Isolated from Panax ginseng and Its Probiotic Characteristics. Foods 11:1707. https://doi.org/10.3390/foods11121707

72. Zhao M, Liu K, Zhang Y, Li Y, Zhou N, Li G (2023) Probiotic characteristics and whole-genome sequence analysis of Pediococcus acidilactici isolated from the feces of adult beagles. Front Microbiol 14:1179953. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1179953

73. Yang Q, Lü Y, Zhang M, Gong Y, Li Z, Tran NT, He Y, Zhu C, Lu Y, Zhang Y, Li S (2019) Lactic acid bacteria, Enterococcus faecalis Y17 and Pediococcus pentosaceus G11, improved growth performance,

and immunity of mud crab (Scylla paramamosain). Fish & Shellfish Immunology 93:135–143. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.07.050

74. Mathur S, Singh R (2005) Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. International Journal of Food Microbiology 105:281–295. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008

75. van den Braak N, van Belkum A, van Keulen M, Vliegenthart J, Verbrugh HA, Endtz HP (1998) Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant Enterococci from Hospitalized Patients and Poultry Products in The Netherlands. J Clin Microbiol 36:1927–1932

76. Huys G, D'Haene K, Collard J-M, Swings J (2004) Prevalence and Molecular Characterization of Tetracycline Resistance in Enterococcus Isolates from Food. Appl Environ Microbiol 70:1555–1562. https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1555-1562.2004

77. Poloni V, Salvato L, Pereyra C, Oliveira A, Rosa C, Cavaglieri L, Keller KM (2017) Bakery by-products based feeds borne-Saccharomyces cerevisiae strains with probiotic and antimycotoxin effects plus antibiotic resistance properties for use in animal production. Food and Chemical Toxicology 107:630–636. https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.02.040

78. 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

79. 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

80. Cerdá P, Goñi P, Millán L, Rubio C, Gómez-Lus R (2007) Detection of the aminoglycosidestreptothricin resistance gene cluster ant(6)-sat4-aph(3 ')-III in commensal viridans group streptococci. Int Microbiol 10:57–60

81. Oka A, Sugisaki H, Takanami M (1981) Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. J Mol Biol 147:217–226. https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90438-1

82. Tauch A, Krieft S, Kalinowski J, Pühler A (2000) The 51,409-bp R-plasmid pTP10 from the multiresistant clinical isolate Corynebacterium striatum M82B is composed of DNA segments initially identified in soil bacteria and in plant, animal, and human pathogens. Mol Gen Genet 263:1–11. https://doi.org/10.1007/pl00008668

83. Trieu-Cuot P, Courvalin P (1983) Nucleotide sequence of the Streptococcus faecalis plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase type III. Gene 23:331–341. https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90022-7

84. Hon W-C, McKay GA, Thompson PR, Sweet RM, Yang DSC, Wright GD, Berghuis AM (1997) Structure of an Enzyme Required for Aminoglycoside Antibiotic Resistance Reveals Homology to Eukaryotic Protein Kinases. Cell 89:887–895. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80274-3

85. Pansegrau W, Miele L, Lurz R, Lanka E (1987) Nucleotide sequence of the kanamycin resistance determinant of plasmid RP4: homology to other aminoglycoside 3'-phosphotransferases. Plasmid 18:193–204. https://doi.org/10.1016/0147-619x(87)90062-x

86. Daly M, Villa L, Pezzella C, Fanning S, Carattoli A (2005) Comparison of multidrug resistance gene regions between two geographically unrelated Salmonella serotypes. J Antimicrob Chemother 55:558–561. https://doi.org/10.1093/jac/dki015

87. Perreten V, Schwarz FV, Teuber M, Levy SB (2001) Mdt(A), a new efflux protein conferring multiple antibiotic resistance in Lactococcus lactis and Escherichia coli. Antimicrob Agents Chemother 45:1109–1114. https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1109-1114.2001

88. Nishino K, Senda Y, Yamaguchi A (2008) CRP regulator modulates multidrug resistance of Escherichia coli by repressing the mdtEF multidrug efflux genes. J Antibiot (Tokyo) 61:120–127. https://doi.org/10.1038/ja.2008.120

89. Aristimuño Ficoseco 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

90. Isnard C, Malbruny B, Leclercq R, Cattoir V (2013) Genetic basis for in vitro and in vivo resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins (LSAP phenotype) in Enterococcus faecium. Antimicrob Agents Chemother 57:4463–4469. https://doi.org/10.1128/AAC.01030-13

91. Protein biosynthesis: structural studies of the elongation cycle - Nyborg - 1998 - FEBS Letters - Wiley Online Library. https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/S0014-5793%2898%2900624-3?sid=nlm%3Apubmed. Accessed 3 Aug 2023

92. Min Y-H, Kwon A-R, Yoon E-J, Shim M-J, Choi E-C (2008) Translational attenuation and mRNA stabilization as mechanisms of erm(B) induction by erythromycin. Antimicrob Agents Chemother 52:1782–1789. https://doi.org/10.1128/AAC.01376-07

93. 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

94. Waśko 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

95. 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

96. 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

97. 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

98. 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

99. Mulcahy H, O'Callaghan J, O'Grady EP, Adams C, O'Gara F (2006) The Posttranscriptional Regulator RsmA Plays a Role in the Interaction between Pseudomonas aeruginosa and Human Airway Epithelial Cells by Positively Regulating the Type III Secretion System. Infect Immun 74:3012–3015. https://doi.org/10.1128/IAI.74.5.3012-3015.2006

100. Jacob J, Evers S, Bischoff K, Carlier C, Courvalin P (1994) Characterization of the sat 4 gene encoding a streptothricin acetyltransferase in Campylobacter coli BE/G4. FEMS Microbiology Letters 120:13–17. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07000.x

101. Jacob J, Evers S, Bischoff K, Carlier C, Courvalin P (1994) Characterization of the sat4 gene encoding a streptothricin acetyltransferase in Campylobacter coli BE/G4. FEMS Microbiol Lett 120:13–17. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07000.x

102. Peden KW (1983) Revised sequence of the tetracycline-resistance gene of pBR322. Gene 22:277–280. https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90112-9

103. Akhtar M, Hirt H, Zurek L (2009) Horizontal transfer of the tetracycline resistance gene tetM mediated by pCF10 among Enterococcus faecalis in the house fly (Musca domestica L.) alimentary canal. Microb Ecol 58:509–518. https://doi.org/10.1007/s00248-009-9533-9

104. Charpentier E, Gerbaud G, Courvalin P (1994) Presence of the Listeria tetracycline resistance gene tet(S) in Enterococcus faecalis. Antimicrob Agents Chemother 38:2330–2335. https://doi.org/10.1128/AAC.38.10.2330

105. (2018) CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 11. th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA

106. Metzker ML (2010) Sequencing technologies - the next generation. Nat Rev Genet 11:31–46. https://doi.org/10.1038/nrg2626

107. 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

108. Krueger F (2022) Trim Galore. https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore. Accessed 25 Apr 2023

109. 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

110. 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

111. 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 resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. Nucleic Acids Res 48:D517–D525. https://doi.org/10.1093/nar/gkz935

112. 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

113. 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

114. 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

115. Spanish Type Culture Collection. https://www.uv.es/uvweb/spanish-type-culture-collection/en/spanish-type-culture-collection-1285872233521.html. Accessed 1 Aug 2023

116. NCIMB | Microbiology | Analytical Services | Biomaterial Storage. https://www.ncimb.com/. Accessed 1 Aug 2023

117. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Catalogue. https://www.dsmz.de/collection/catalogue/microorganisms/catalogue. Accessed 1 Aug 2023

118. 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

119. Takeuchi K, Tomita H, Fujimoto S, Kudo M, Kuwano H, Ike Y (2005) Drug resistance of Enterococcus faecium clinical isolates and the conjugative transfer of gentamicin and erythromycin resistance traits. FEMS Microbiology Letters 243:347–354. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.022

120. Shokoohizadeh L, Mobarez AM, Alebouyeh M, Zali MR, Ranjbar R (2017) Genotyping of clinical and environmental multidrug resistant Enterococcus faecium strains. Indian Journal of Pathology and Microbiology 60:74. https://doi.org/10.4103/0377-4929.200048

121. Talebi M, Sadeghi J, Rahimi F, Pourshafie MR (2015) Isolation and Biochemical Fingerprinting of Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium From Meat, Chicken and Cheese. Jundishapur J Microbiol 8:e15815. https://doi.org/10.5812/jjm.8(4)2015.15815

122. Xu J, Gallert C, Winter J (2007) Multiple antibiotic resistances of Enterococcus isolates from raw or sand-filtered sewage. Appl Microbiol Biotechnol 74:493–500. https://doi.org/10.1007/s00253-006-0668-z

123. Maasjost J, Mühldorfer K, Jäckel SC de, Hafez HM (2015) Antimicrobial Susceptibility Patterns of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Isolated from Poultry Flocks in Germany. avdi 59:143–148. https://doi.org/10.1637/10928-090314-RegR

124. Wenzler S, Schmidt-Eisenlohr E, Daschner F (2004) Comparative in vitro Activities of Three New Quinolones and Azithromycin against Aerobic Pathogens Causing Respiratory Tract and Abdominal Wound Infections. Chemotherapy 50:40–42. https://doi.org/10.1159/000077284

125. Fung-Tomc J, Minassian B, Kolek B, Washo T, Huczko E, Bonner D (2000) In vitro antibacterial spectrum of a new broad-spectrum 8-methoxy fluoroquinolone, gatifloxacin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 45:437–446. https://doi.org/10.1093/jac/45.4.437

126. Wickman PA, Black JA, Smith Moland E, Thomson KS, Hanson ND (2006) In vitro development of resistance to DX-619 and other quinolones in enterococci. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 58:1268–1273. https://doi.org/10.1093/jac/dkl421

127. Xia M, Mu S, Fang Y, Zhang X, Yang G, Hou X, He F, Zhao Y, Huang Y, Zhang W, Shen J, Liu S (2023) Genetic and Probiotic Characteristics of Urolithin A Producing Enterococcus faecium FUA027. Foods 12:1021. https://doi.org/10.3390/foods12051021

128. Zaghloul HAH, El Halfawy NM (2022) Genomic insights into antibiotic-resistance and virulence genes of Enterococcus faecium strains from the gut of Apis mellifera. Microb Genom 8:mgen000896. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000896

129. Farkas A, Coman C, Szekeres E, Teban-Man A, Carpa R, Butiuc-Keul A (2022) Molecular Typing Reveals Environmental Dispersion of Antibiotic-Resistant Enterococci under Anthropogenic Pressure. Antibiotics (Basel) 11:1213. https://doi.org/10.3390/antibiotics11091213

130. 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

131. Ture M, Altinok I, Alp H (2018) Effects of Cage Farming on Antimicrobial and Heavy Metal Resistance of *Escherichia coli, Enterococcus faecium,* and *Lactococcus garvieae*. Microbial Drug Resistance 24:1422–1430. https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0040

132. Shani N, Oberhaensli S, Arias-Roth E (2021) Antibiotic Susceptibility Profiles of Pediococcus pentosaceus from Various Origins and Their Implications for the Safety Assessment of Strains with Food-Technology Applications. Journal of Food Protection 84:1160–1168. https://doi.org/10.4315/JFP-20-363

133. Thumu SCR, Halami PM (2019) Heterogeneity of macrolide-lincosamide-streptogramin phenotype & conjugal transfer of erm(B) in Pediococcus pentosaceus. Indian J Med Res 149:270–275. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_2055_17

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítették és lehetővé tették a dolgozatom létrejöttét. Kiváltképpen témavezetőmnek, dr. Kerek Ádámnak, aki a dolgozatom elkészülte közben mindvégig figyelmesen és türelmesen támogatott. Köszönettel tartozom továbbá dr. Jerzsele Ákos rektorhelyettes úrnak, a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék vezetőjének a TDK dolgozatom témájának befogadásáért. Köszönöm Bányai Krisztián, dr. Bali Krisztina és dr. Kaszab Eszter munkáját, akik a genom szekvenálásban voltak segítségemre. Dr. Solymosi Norbertnek és dr. Papp Mártonnak köszönöm a bioinformatikai elemzésben nyújtott segítségüket. Dr. Makrai Lászlónak köszönettel tartozom a probiotikumos készítményekből történő törzsek izolálásában nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért és szakértelméért.

Az Innovációs és Technológiai Minisztérium Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

Az RRF-2.3.1-21-2022-00001 számú projekt a Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszköz és Nemzeti Helyreállítási Alapból nyújtott támogatásával, az RRF-2.3.1-21 pályázati program finanszírozásában valósult meg.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Kerek Ádám**, mint témavezető nyilatkozom, hogy **Szabó Emese, negyedik** évfolyamos hallgató „***Társállatokban használt probiotikum készítmények antimikrobiális rezisztencia génkészletének (ARG) felmérése***” című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2023. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött TDK dolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2023. október hó 18. nap.

……

Dr. Kerek Ádám
témavezető