

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
BIOINFORMATIKAI KÖZPONT

Kutyanyálminták antimikrobiális rezisztenciagén tartalmának vizsgálata

Canine saliva as a possible source of antimicrobial resistance genes

Készítette:

Kovács Eszter Gabriella

Témavezetők:

Dr. Tóth Adrienn Gréta
PhD-hallgató

Dr. Solymosi Norbert PhD
egyetemi docens

Budapest

2022

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
Bevezetés	4
Az antimikrobiális rezisztencia	4
Társállat tartás napjainkban	5
Szakirodalmi áttekintés	7
A rezisztencia mechanizmusa	7
Az antimikrobiális rezisztenciagének megjelenési lehetőségei	7
Bakteriális rezisztencia mechanizmusok	9
A horizontális géntranszfer lehetőségei	10
Célkitűzések	13
Anyag és módszer	14
Mintagyűjtés	14
Bioinformatikai adatfeldolgozás és statisztikai elemzés	15
Eredmények	17
Metagenom	17
ARG-k és mobilis genetikai elemek	18
Megbeszélés	24
Baktériumok és rezisztenciagének	24
Társállatok és az antibiotikum használat	25
A kutyaharapás rejtett veszélyei és terápiája	26
Összefoglaló	29
Summary	31
Irodalomjegyzék	33
Köszönetnyilvánítás	38

Rövidítésjegyzék

AB	antibiotikum
AMR	antimikrobiális rezisztencia
ARG	antimikrobiális rezisztenciagén
HGT	horizontális géntranszfer
DNS	dezoxiribonukleinsav
MRSA	methicillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
NGS	új generációs szekvenálás (<i>Next Generation Sequencing</i>)
NCBI	Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
SRA	szekvencia read archívum (<i>Sequence Read Archive</i>)
PABA	para-amino-benzoésav
bp	bázispár
ORF	lehetséges leolvasási keret (<i>Open Reading Frame</i>)
CARD	átfogó antibiotikum rezisztencia adatbázis (<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>)
RGI	rezisztenciagén azonosító (<i>Resistance Gene Identifier</i>)
iMGE	integratív mobilitást elősegítő genetikai elem (<i>Integrative Mobile Genetic Element</i>)
cTn	konjugatív transzpozon (<i>Conjugative Transposon</i>)
ESVAC	Antimikrobiális Szerek Fogyasztásának Európai Felügyelete (<i>European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption</i>)
SAVSNET	Kisállat-egészségügyi Felügyeleti Hálózat (<i>Small Animal Veterinary Surveillance Network</i>)
HPCIA	legmagasabb prioritású kritikus fontosságú antibiotikumok (<i>Highest Priority Critically Important Antibiotics</i>)

Bevezetés

Az antimikrobiális rezisztencia

Az antibiotikumok (AB) lassan 100 éve gyógyítják az emberiséget és az állatvilágot [1]. Hatásukat a baktériumokon fejtik ki, megállítják a szaporodásukat vagy akár el is pusztítják azokat [2]. Ma már el sem lehet képzelni, milyen volt az élet akkor, amikor egy lágyszervi műtét után a páciens elhunyt bakteriális fertőződés miatt, mert még nem létezett antibiotikum, amit ma mindenkinek egyértelműen felírnak egy komolyabb beavatkozás után. Sajnálatosan, a globálisan elterjedt értelmetlen AB használat humán és kisállatgyógyászatban, a mezőgazdaságban és állattenyésztésben hozam fokozásra alkalmazott felhasználásuk multirezisztens baktériumtörzsek kialakulásához vezetett világszinten [3]. A nem ellenőrzött antibiotikum használat eredménye a gyógyszerek hatástalansága a kórokozókkal szemben, és ha nem sikerül a szigorításokkal kezelni ezt a köz- és állategészségügyi jelentőséggel bíró problémát, újra 1928 előtti helyzettel nézhet szembe az emberiség, mielőtt Fleming megalkotta a penicillint, és egy egyszerű foggyökérkezelés is végzetes lehet a megfelelő antimikrobiális szer hiánya miatt. A gyógyszerekkel szembeni rezisztencia kialakítására nem csak a baktériumok képesek, a daganatsejtek és paraziták egyaránt fogékonyak [2].

Az antibiotikum-rezisztencia esetén a gyógyszer elveszti a baktériumokkal szembeni hatását, melyet a baktérium védekező mechanizmus által fejt ki. A fokozódó antimikrobiális rezisztencia (AMR) kialakulásáért az antimikrobiális rezisztenciagének (ARG) felelősek [2]. Ezért a gyógyászatban értelmetlenül igénybevett használat mellett az élelmiszertermelésben szubterápiás dózisban hozamfokozásra, termelékenység és takarmányértékesítés növelésére történő alkalmazás a magyarázat [3]. Sajnos a társadalomban nem elterjedt tájékozottság a szakszerű antibiotikum-használat. A terápiás dózisonál alacsonyabb adagban, vagy rövidebb ideig használt gyógyszer a fertőzést megszüntetheti (vagy napokkal később újra kialakul), viszont a teljes baktérium populációt nem pusztítja el, azonban az ellenállóbb kórokozók mutációját és szelektálódását segíti elő [3]. Bár az Európai Unió mára már betiltotta [4], 2006. január 1-től tilos az antibiotikumok hozamfokozóként való alkalmazása az Európai Unióban, az élelmiszer-termelő állatokban rezisztómmal rendelkező bakterióta alakult ki, mely az élelmiszerlánc útján eljut az emberek és kisállatok asztalára is.

A dinamikusan mutálódó baktérium törzsekben az ARG-k terjedése két féle módon valósulhat meg. Az egyik a természetes evolúciós átalakulás, a *de novo* mutáció, mely

minden élőlényben lejátszódik, ezzel szelektálódva és alkalmazkodva a folyton változó környezethez. Az másik metódus, a horizontális géntranszfer (HGT) során egy bizonyos DNS szakasz sejtosztódási folyamat nélkül épül át transzfer mechanizmus segítségével egyik baktériumból a másikba, beépülve a genomjába integrációs mechanizmussal, így átadva neki a rezisztenciáért felelős információt, ekképpen a későbbi osztódás során, már ő maga is tovább örökítheti azt [5].

Az állategészségügyi szabványok folyamatos fejlődésével a rendszeres antibiotikum használat egyre nagyobb teret hódít [6]. A kutya és az ember szoros kapcsolatának és együttélésének eredményeképpen gyakoriak a kutyaharapások és az egyéb véletlenszerűen bekövetkező érintkezések a kutyanyállal, például a tulajdonos száján, bőrön nyalása [7]. A 2020 és 2021-ből származó 26 darab mintát tartalmazó új generációs kutyanyál szekvenálási adatkészleten alapuló metagenom vizsgálataink szerint, amelyekhez az NCBI Sequence Read Archive (SRA) The 10000 Dog Genome Consortium és a Broad Institute Darwin bárkája projektet használtuk forrásul, a kutyanyál gazdag olyan baktériumtörzsekben, amelyek potenciális antimikrobiális rezisztencia génekkel (ARG) rendelkeznek.

Társállat tartás napjainkban

Az elmúlt évtizedekben a társállat tartás száma folyamatosan emelkedett [8]. A társállattartás népszerűsége mellett, az ember-kutya kapcsolat minősége is megváltozott. Az Amerikai Állatorvosi Egyesület felmérése szerint a társállattartók 70%-a családtagként, 17%-a társaként és 3%-a tulajdonként tekint kiskedvencére [7]. A házi kedvencek szerepe alapvetően szociális társaságként határozható meg. Napjainkban a háziállat-emberi együttélésben tapasztalható fizikai közelség elterjedt és általánosnak számít, kisállatok gyakran alszanak együtt gazdáikkal, és nyalogatják arcukat és sebeiket [9]. Ebből kifolyólag sajnos a kutyatartás miatt a kutyaharapások esete is igen magas. 2005 és 2013 között az évi átlagos kutyaharapások száma, mely sürgősségi ellátást igényelt, 337103 volt az Egyesült Államokban [10]. Érdekesképpen, 5-ből 3 esetben a harapás saját kutyától származik, nem pedig kóbor kutyától [11].

A modern gondolkodásmód, mely által házi kedvenceink rendszeres állatorvosi ellátást kapnak, és legközelebbi környezetünkben tartjuk őket, nagyban hozzájárulhat az AMR fajok közötti terjedéséhez.

TDK kutatásom során arra a kérdésre kerestük a választ, rejt-e veszélyt a társállatok mikrobiomjának emberi szervezettel való találkozása antibiotikum rezisztencia gének

átadása szempontjából. Ehhez az internet segítségével a fellelhető és elérhető kutyanyálminták genomját átvizsgáltuk, rezisztenciagének után kutatva. Korábban, haszonállatoktól származó élelmiszerrel közvetetten terjesztett AMR kapott nagyobb figyelmet, viszont nem készült még ilyen tanulmány, amely ezzel a kérdéskörrel foglalkozik, milyen ARG készlet lelhető fel a velünk élő háziállatok szájüregében, és ezek közvetlen potenciális antibiotikum rezisztencia forrás lehet-e gazdájuk számára.

Vizsgálatunk célja az volt, hogy feltárjuk az Egyesült Államokból származó 26 kutya nyálminta ARG-tartalmát, csatoljuk az ARG-eket a baktériumfajok listájával, amelyekből származnak, és beszámoljunk az ARG-k terjedési képességéről a fent említett jelenség mérlegeléséhez. Ebből a célból szabadon hozzáférhető, következő generációs szekvenálási (NGS) shotgun adatkészleteket töltöttünk le, és bioinformatikai elemzést végeztünk.

Szakirodalmi áttekintés

A rezisztencia mechanizmusa

A baktériumok a Föld legellenségebb környezetében is képesek a túlélésre és szaporodásra, és eme tulajdonságuk titka abban rejlik, hogy felismerték a képességet a többé-kevésbé távoli élőlényekből származó genetikai anyag integrációjában. Ez az evolúciót segítő mechanizmus a horizontális géntranszfer (HGT). A baktériumok citoplazmáját, amelyben a genom található, egy vagy több membrán izolálja hatékonyan a külső tápközegtől, baktériumcsoportoktól függően. A DNS nem képes passzívan átjutni ezeken az akadályokon. Speciális mechanizmusok léteznek, amelyek megkönnyítik az idegen DNS hozzáférést a genomhoz.

A baktériumok ellen megalkotott antibiotikumok széleskörű felhasználásának következménye a szer hatásosságának nagymértékű visszaesése, mivelhogy a baktériumok az évek alatt adaptálódtak és ellenállóvá váltak az antibakteriális gyógyszerekkel szemben [1]. Megkülönböztetünk kétféle rezisztenciát, a szerzett és az *ab ovo* rezisztenciát. A szerzett rezisztencia esetén a mikroorganizmusok kialakítottak védekező mechanizmusokat és elvesztették érzékenységüket az antibakteriális szerrel szemben. Ezen mechanizmus terjedése több úton is megvalósulhat. Terjedhet baktériumok közötti géncserével, genomon belüli rezisztenciagén átrendeződéssel és szervezetek közötti rezisztens baktériumok átadásával. *Ab ovo* rezisztenciával jellemezzük azokat a mikroorganizmusokat, amelyekre soha nem is voltak hatásosak az antibiotikumok, valamilyen morfológiai okból kifolyólag. *Ab ovo* rezisztenciára példa a *Mycoplasma* faj, amely nem rendelkezik sejtfallal, ezáltal a penicillinek hatástalanok vele szemben [2].

Az antimikrobiális rezisztenciagének megjelenési lehetőségei

A rezisztenciát genetikus úton, kromoszómálisan vagy extrakromoszómálisan lehet átadni. A gyakoribb előfordulás a kromoszóma mutáció, erre példa a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA). A rezisztencia vertikálisan és horizontálisan képes a terjedésre. Az előbbi spontán mutáció által generációról generációra terjed, míg a horizontális transzmisszió baktériumok közötti rezisztenciagén átadása révén történik [2].

Az extrakromoszómális rezisztencia terjedés plazmidok útján is megvalósulhat. A baktériumok citoplazmájában előforduló extrakromoszómális genetikai elemek, néhány kivételtől eltekintve, kettős szálú DNS-ből felépülő plazmidokat tartalmazhatnak. Ezek a

genetikai elemek képesek több gént tartalmazni, illetve függetlenül replikálódni. Ilyen példa az R-plazmid, amely antibiotikum rezisztencia terjedésért felelős gént hordoz [2].

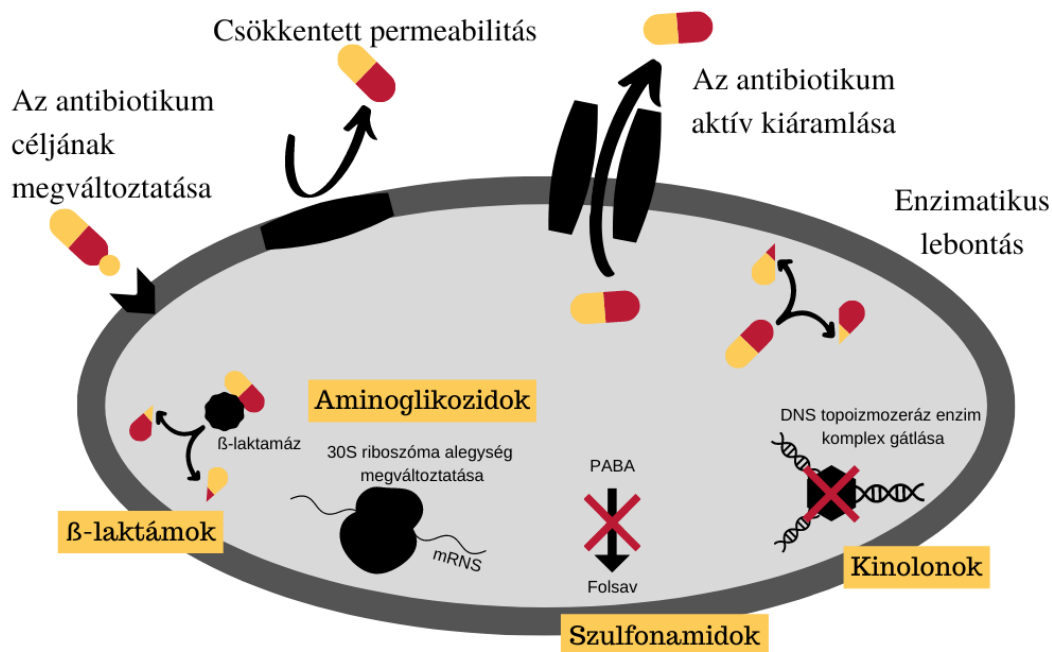
A genomon belüli rezisztenciagén átrendeződésében nagy szerepet játszanak a transzpozonok, amelyek integron nevű DNS-fragmens által integrálja az antibiotikum rezisztenciagéneket, így kialakítva az ellenállóképességet több antibiotikummal szemben is [12]. Az így létrejött DNS szakaszok beépülhetnek plazmidokba, ezáltal más fajú baktériumba is. A transzpozonok habár önállóan nem képesek a replikációra, a gazda plazmidjába vagy kromoszómájába bejutva ott képesek sokszorozódni, így megalapozva a nem rokon fajok közötti rezisztenciagén terjedést. Génkazetták és integronok is lehetőséget kínálnak a rezisztenciagének terjedésére a transzpozonok mellett. A génkazetta esetén rezisztenciagének tapadnak felismerős szakaszokhoz integráz enzim segítségével, majd ezek az egységek nagyobb blokkot alkotva hozzák létre az integront. A "multidrug" rezisztencia, egyszerre több gyógyszerrel szembeni ellenállás terjedésében nagy szerepet játszanak ezek a hordozók [2].

A baktériumok közötti rezisztencia átadása három úton, konjugáció, transzformáció és transzdukción történik. A konjugáció olyan sejtek közötti kapcsolat, amely létrejöttéhez bakteriális plazmahidak, úgynevezett "konjugatív plazmid" szükségesek, ezen keresztül áramlik a genetikai örökítőanyag két baktérium között, ha azok fizikailag kötődtek. Transzformáció esetén baktérium a környezetből sejtmembránon keresztül veszi fel a DNS szakaszt, ezután beépíti a saját genomjába. Transzdukción keresztül pedig egy bakteriofág, baktériumot megtámadó vírus juttatja a genetikai információt a fogadó baktériumba géncsatorna eszközeként, így megváltoztatva annak genetikai anyagát. Ez a HGT forma *Staphylococcusok* és *Streptococcusok* közötti rezisztencia terjedésben is fontos szerepet játszik [2, 5, 13, 14].

Az állatorvosi kezelésen átesett, ARG készlettel rendelkező baktériumokat hordozó kutya harapása vagy nyállal való közeli érintkezése után rezisztens baktériumok kerülhetnek be az emberi szervezetbe, majd a HGT útján antimikrobiális rezisztenciát hordozó faktorok cserélődhetnek ki a gazda bakteriómjával.

Bakteriális rezisztencia mechanizmusok

Rezisztenciát a baktériumok az antibiotikumok ellen biokémiai mechanizmusok által alakíthatnak ki. Ezen mechanizmusok a különböző AB csoportokban a gyógyszerek hatás kifejtésére adaptálódtak. A következőkben a leggyakrabban előforduló mechanizmusokat részletezem, és mutatom be csoportonként az általános rezisztencia mechanizmusokkal együtt (1. ábra).



1. ábra Általános rezisztencia és antibiotikum mechanizmusok

A β-laktám antibiotikumok csoportja ellen a rezisztens baktérium β-laktamáz enzimet termel, ezzel elhasítva a gyógyszer molekula vázát, a β-laktám gyűrűjét és hatástalanítva azt. Ilyen baktériumokra példa a *Staphylococcusok* és a Gram-negatív baktériumok [2].

Az aminoglikozidok esetén az adaptálódó baktérium a kromoszóma mutáció következtében a gyógyszer célpontját és kötőhelyét, a 30S riboszóma alegységet változtatja meg, ezáltal az AB nem tud kötődni, és nem tudja a szaporodást gátolni. Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok által termelt enzimek okozta foszforiláció, adeniláció és acetiláció során mehet végbe az inaktiválódás [2].

A szulfonamidok a baktériumok nukleinsav termeléséhez szükséges PABA (para-amino-benzoésav) beépülését gátolják, ezáltal a folsav szintézist fékezik meg. Az elterjedt

folyamat során rezisztencia kialakításáért felelős információt plazmidok útján adják át egymásnak, melynek háttérében a baktérium membránjának lecsökkent permeabilitása és enzimatisz folyamatok állhatnak [2].

A kinolonok olyan koncentrációfüggő baktericidek, amelyek célpontja a DNS topozimeráz enzim komplex gátlása, ezzel megállítva a DNS szintézist, az mRNS-transzkripciót és a sejtosztódást. Az ellene világszerte elterjedt rezisztens baktériumok az enzim kötőhelyét megváltoztatják, így hatástalanítva az antibiotikumot [2].

Az itt felsorolt rezisztencia mechanizmusokon kívül számos egyéb általános védekezési módszer létezik az antibiotikum hatása ellen, például az enzimatisz lebontás, az antibiotikum céljának megváltoztatása, a sejtmembrán permeabilitásának csökkentése vagy az antibiotikum aktív kiáramoltatása a sejtéből [2, 15].

A citoplazmába kerülve a DNS-nek számos lehetséges sorsa van. A gazdaszervezet citoplazmájában jelenlévő DNS-lebontó rendszerek, restrikciós enzimek, DNS-ázok elpusztíthatják, vagy autonóm replikatív entitásokként, például plazmidokként fennmaradnak. Végül a DNS egésze vagy egy része integrálódhat a gazda kromoszómájába. Ez az integráció számos tényezőtől függ, például a gazdaszervezet genomialis DNS-ével való hasonlóság mértékétől, vagy más, integrálódni képes szekvenciáktól, például bakteriofág génekkel való fizikai asszociációtól. Ha homológ rekombináció történik, az idegen DNS-szekvencia helyettesíti a meglévő homológ szekvenciákat a gazda genomjában. Más esetben, amikor a DNS-t más módon integrálják a genomba, gyakran egyszerűen beépül, mint teljesen új gén [16].

A horizontális géntranszfer lehetőségei

A horizontális géntranszfer valódi evolúciós szerepe és hatása az élet evolúciójára csak a közelmúltban, a genomszekvenálás megjelenésével ismerték fel. A fenti mechanizmusok viszonylag alacsony specifikitásúak, így lehetővé teszik a genetikai információ mozgását még távoli fajok között is, ezáltal mélyreható következményt érnek el az adaptációs lehetőségekben és a baktériumfajok között [17]. A horizontális géntranszfer meglehetősen drasztikus alkalmazkodásra kínál lehetőséget. Ez a fejlődési mód azonban messze nem kérdőjelezi meg a darwini evolúció elvet, hanem hangsúlyozza annak fontosságát, figyelembe veszi a szelekció különböző szintjeit a genomok evolúciójának megértéséhez. Sok bakteriális genomban jelenlévő gén profágokból származik, és ezért más megkötések mellett fejlődött ki, mint a genom többi része [16]. Mindazonáltal a bakteriális

genomok többször is kiválasztották a funkciókat genomi parazitáiktól [18, 19]. Azt is felvetették, hogy a bakteriális genomok operonjaiban, a funkcionálisan rokon gének csoportjaiban és átírt formáiban való szerveződés a koreguláció szükségességéből, valamint az olyan gének szelekciós nyomásából fakadhat, amelyek kölcsönhatásba lépnek egy funkció betöltése érdekében [16]. Ez a modell „önző operonként” ismert [20, 21]. A vízszintes géntranszfer a prokariótákban a fajok meghatározásának gátjaként is tekintették [16].

Az eukariótákban a szexuális úton történő genetikai csere elméleti előnyei a káros mutációk kiküszöbölése és a kedvezőek kombinációja. A vízszintes géntranszfer ugyanezeket az előnyöket nyújtja, ha a DNS-t fajtársaktól szerzik be, bár a rekombináció nem kapcsolódik a szaporodáshoz. A genetikai információ ilyen mozgása azonban jóval túlmutat a fajok határain. A horizontális transzferek számos esetét leírták, különösen új funkciók megszerzésével kapcsolatban [16]. Kiemelendő, hogy egyes baktériumtörzsek képesek virulenciagéneket vagy antibiotikum-rezisztenciát szerezni, ez továbbra is jelentős egészségügyi probléma. A horizontális transzfer olyan mechanizmus, amely kulcsszerepet játszik a prokarióták evolúciójában [16].

A vízszintes transzfer adaptív szerepe a baktériumokban jól megalapozott. A genomban vannak olyan hosszú szakaszok, amelyeket „szigeteknek” neveznek. Ezek csak szórványosan vannak jelen egy adott fajban, és patogenitással, egy másik szervezettel való szimbiózissal vagy más ökológiai jellemzőkkel járnak együtt [22]. Ezeknek a géneknek szigetekben való csoportosítása valószínűleg annak a következménye, hogy olyan mobil elemekkel kapcsolódnak egymáshoz, amelyek hajlamosak rekombinálódni, ekképpen egymás közvetlen közelébe helyeződnek, elősegítve azok egyidejű kialakulását és átvitelét egyik genomból a másikba [16].

A horizontális géntranszfer egy erőteljes evolúciós erő, amely lehetővé teszi a molekuláris funkciók kombinációját fajhatárokon túl. Sikerét, mint folyamat, azonban az evolúció biológusok régóta az evolúciós minták rekonstrukciójának gátjaként tekintik. A legújabb fejlemények lehetővé teszik az oldalirányú géntranszfer információként való felhasználását az élettörténet rekonstrukciójához. E tekintetben a géntranszfer még előre nem látott lehetőségeket is feltár olyan régóta fennálló kérdések megválaszolására, mint az életfejlődés időzítésének rekonstrukciója vagy az életfa gyökere [16].

A kutatásunk során használt új generációs szekvenálás (NGS) ad alapot a mikrobiom összetételének alapos vizsgálatához. Ezen módszer alkalmazása lehetővé teszi a körülményesen tenyésztethető mikroorganizmusok kimutatását és azonosítását, tenyésztettől

független stratégia segítségével. Jelenleg az NGS felhasználása a rutin klinikai diagnosztikában epidemiológiai célú mikrobiális törzstipizálásra is kiterjed, mivel a mikrobiom elemzésre történő alkalmazása klinikailag fontos információkkal szolgálhat[23].

Célkitűzések

Vizsgálatunk egyik célja a 26 kutyanyálmintában található baktériómnak az összetételének a felmérése volt.

Emellett cél volt annak a felmérése is, hogy az azonosított baktériumoknak mekkora az egymáshoz viszonyított mennyisége.

Továbbá tanulmányoztuk a mintákban a meghatározott baktériumok antimikrobiális rezisztenciagén készletét, és azonosítottuk azokat, illetve vizsgáltuk az ezekhez köthető mobilitást elősegítő elemeknek a készletét.

Anyag és módszer

Mintagyűjtés

A minták gyűjtéséhez szekvenált kutyanyál adatkészleteket kerestünk az NCBI (National Center for Biotechnology Information) oldalán, ezen belül a Sequence Read Archive (SRA) adattárat használtuk. Ezen az oldalon a megfelelő szűrők beállításával, fajspecifikus kereséssel 26 mintát gyűjtöttünk, amely a kritériumoknak eleget tett minden szempontból. 2021 májusában találtunk két shotgun metagenomikai bioprojektet (PRJNA648123 - The 10,000 Dog Genome Consortium és PRJNA683923 – Broad Institute, Darwin’s Ark project), amelyek mintánként több mint 100 000 000 páros végű leolvasással rendelkeztek (**1. táblázat**). A minták medián read száma (interkvartilis tartomány, IQR) $177,7 \times 10^6$ ($26,6 \times 10^6$) és $417,7 \times 10^6$ ($90,1 \times 10^6$) volt a PRJNA648123 és PRJNA683923 adatkészletekben.

1. táblázat Az NCBI oldalról gyűjtött analizált minták listája. A 'Run' oszlop tartalmazza az NCBI SRA futtatási azonosítóit. A bakteriális read számok jelzik azokat a read-eket, amelyeket taxonómiailag bármelyik baktériumhoz lehetett sorolni.

ID	BioProjekt	Run	Bakteriális read szám
1	PRJNA648123	SRR12330029	2,900,387
2		SRR12330041	16,153,172
3		SRR12330042	13,072,781
4		SRR12330043	13,774,332
5		SRR12330044	6,123,646
6		SRR12330045	16,707,766
7		SRR12330098	18,826,266
8		SRR12330104	27,598,592
9		SRR12330220	9,938,948
10		SRR12330260	17,642,933
11		SRR12330298	17,277,697
12		SRR12330356	13,988,719
13		SRR12330364	17,378,513
14		SRR12330377	12,155,726
15		SRR12330378	34,183,357
16		SRR12330382	22,353,314
17		SRR12330383	22,886,951
18		SRR12330384	18,328,656
19		SRR12330385	6,631,504

20	PRJNA683923	SRR13340534	0
21		SRR13340535	6,752,169
22		SRR13340537	8,245,374
23		SRR13340538	41,212,470
24		SRR13340539	13,028,655
25		SRR13340540	6,964,460
26		SRR13340541	6,279,921

Bioinformatikai adatfeldolgozás és statisztikai elemzés

A rövid szekvenciák minőség alapú kiszűrését és kiválogatását a TrimGalore (v.0.6.6) programmal hajtottuk végre, melynek a küszöbértéke 20-as beállítás volt. Egyedül azokat a szekvenciákat tartottuk meg és klasszifikáltuk taxonómiailag, amelyeknek a hossza több volt, mint 50 bázispár (bp). A klasszifikációhoz a Kraken2 (v2.1.1) [24] programot és az NCBI RefSeq-en elérhető archeális, bakteriális, virális és növényi genomokat használtuk. A taxon meghatározáshoz a konfidencia paraméternél 0.5-ös értéket állítottunk be, ezzel lehetőséget teremtve a még precízebb fajmeghatározáshoz. Az eredményeket az R statisztikai szoftverrel (v4.1.0) [25] dolgoztuk fel, phyloseq (v1.36.0) [26] és microbiom (v4.1.0) [27] csomagok függvényeinek segítségével. Az előkészített szekvenciákat az alapbeállítások használatával összeállítottuk kontigokká a MEGAHIT (v1.2.9) programban [28]. A kontigok szintén taxonómiailag klasszifikációra kerültek a fent említett adatbázis segítségével a Kraken2 (v2.1.1) [24] programban. A kiválogatott kontigokból, melynek hossza meghaladta az 500 bp-t, az összes lehetséges leolvasási keretet (open reading frame, ORF) összegyűjtöttük a Prodigal szoftverrel (v2.6.3) [29] és fehérjeszekvenciákat származtattunk. Ezeket a fehérjeszekvenciákat összehasonlítottuk a CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) (v.3.1.3) adatbázis [30, 31] ARG szekvenciáival a Resistance Gene Identifier (RGI, v5.2.0) és Diamond program segítségével [32]. Az illeszkedés minősége szerint a perfect vagy a strict osztályztú ORF-eket 90%-os referenciaszekvenciával való hosszbeli egyezőség és 90% szekvenciabeli bázisegyezőség szerint tovább szűrtük. A nudged besorolású találatokat kizártuk. Integratív mobilitást elősegítő genetikai elemeket (intergrative mobile genetic element, iMGE) kerestünk az ARG-ket tartalmazó kontigokban és analizáltuk őket a MobileElementFinder (v1.0.3) szoftverrel [33]. Johansson és társai koncepcióját követve, azoknak a baktérium törzseknek a

homológiáját értékeltük, amelyeknek a távolság kritériuma az iMGE és ARG határon belül volt [33]

A MobileElementFinder adatbázisban (v1.0.2) a *Bacteroides* nemzetség számára a leghosszabb összetett transzpozon (cTn) a *Tn6186* volt. Ennek a nemzetségnek a hosszát (8505 bp) vettük a határértéknek. Az *Enterococcus* és *Klebsiella* nemzetségek esetében a *Tn6246* (5147 bp) és a *Tn125* (10098 bp) adta a küszöbértéket. Az *E. coli* esetében ez a határ a *Tn1681* transzpozon hossza volt, nevezetesen 24 488 bp, míg a *P. aeruginosa* esetében a *Tn6060* (25 440 bp). Mivel az adatbázis sem fajszintű, sem nemzetség szintű cTn adatokat nem tartalmaz a többi fajra vonatkozóan, ezért ezen fajok kontigjaira általános küszöbértéket választottunk. Ezt az értéket az adatbázisban szereplő fajonkénti leghosszabb cTn-ek mediánjaként határoztuk meg (10 098 bp). Az ARG-t tartalmazó kontigok plazmideredetét a PlasFlow (v.1.1) szoftver segítségével vizsgáltuk [34]. A kapott kontigok fág tartalmát a VirSorter2 (v2.2.3) szoftverrel elemeztük [35]. A találatokat tovább szűrtük dsDNS fágok és ssDNS segítségével. Minden adatkezelési eljárást, analízist és ábrázolást az R környezetben végeztük (v4.1.0) [25].

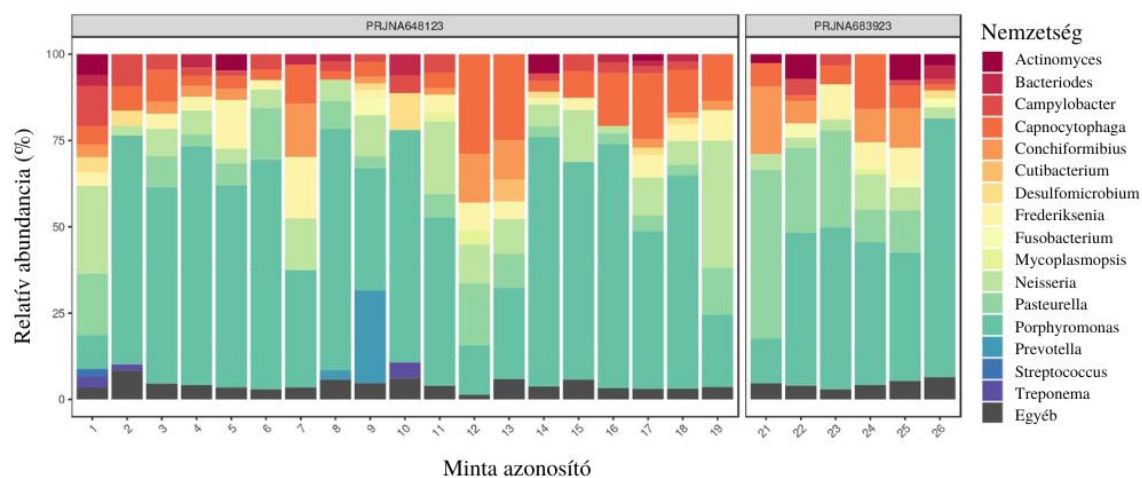
Eredmények

Metagenom

Összesen 26 mintát találtunk, amely elvárásainknak és kritériumunknak eleget tett, melyek a bemutatásra kerülő rezisztenciagéneket tartalmazták.

Az adatbázisból nyerhető, rendelkezésünkre álló mintákban számos ARG szekvenciát tudunk azonosítani.

Taxon klasszifikáció szerint, a bakteriális genomokhoz igazodó read-eknek a száma különbséget mutatott az egyes mintákban. A nyál mintákban a bakteriális read-ek mediánja 4.3×10^6 (IQR: 3.4×10^6) volt. Összesen 16 olyan aerob és anaerob baktérium törzset tudunk izolálni a nyálmintákból, amelyek gyakran kerülnek azonosításra fertőzött kutyaharapás mintákból. Azon nemzetségek relatív abundanciája, amelyek több mint 1%-ot értek el a bakteriális találatokban bármelyik nyálmintában, a 2. ábrában láthatók összefoglalva (2. ábra).



2. ábra Nyál magbakteriom. Azon nemzetségek relatív abundanciája, amelyek több mint 1%-ot értek el a bakteriális találatokban bármelyik nyálmintában.

A nyálmintákban a domináns nemzetségek (közepes prevalenciával) csökkenő sorrendben a következők voltak: *Porphyromonas* (49%), *Prevotella* (15%), *Pasteurella* (12%), *Neisseria* (10%), *Capnocytophaga* (9%), *Conchiformibius* (7%), *Frederiksenia* (7%), *Cutibacterium* (6%), *Actinomyces* (5%), *Campylobacter* (4%), *Desulfomicrobium* (4%), *Bacteriodes* (3%), *Fusobacterium* (3%), *Mycoplasmopsis* (3%), *Treponema* (3%), *Streptococcus* (2%). A 20. mintában nem volt klasszifikálható baktérium read (leolvasás).

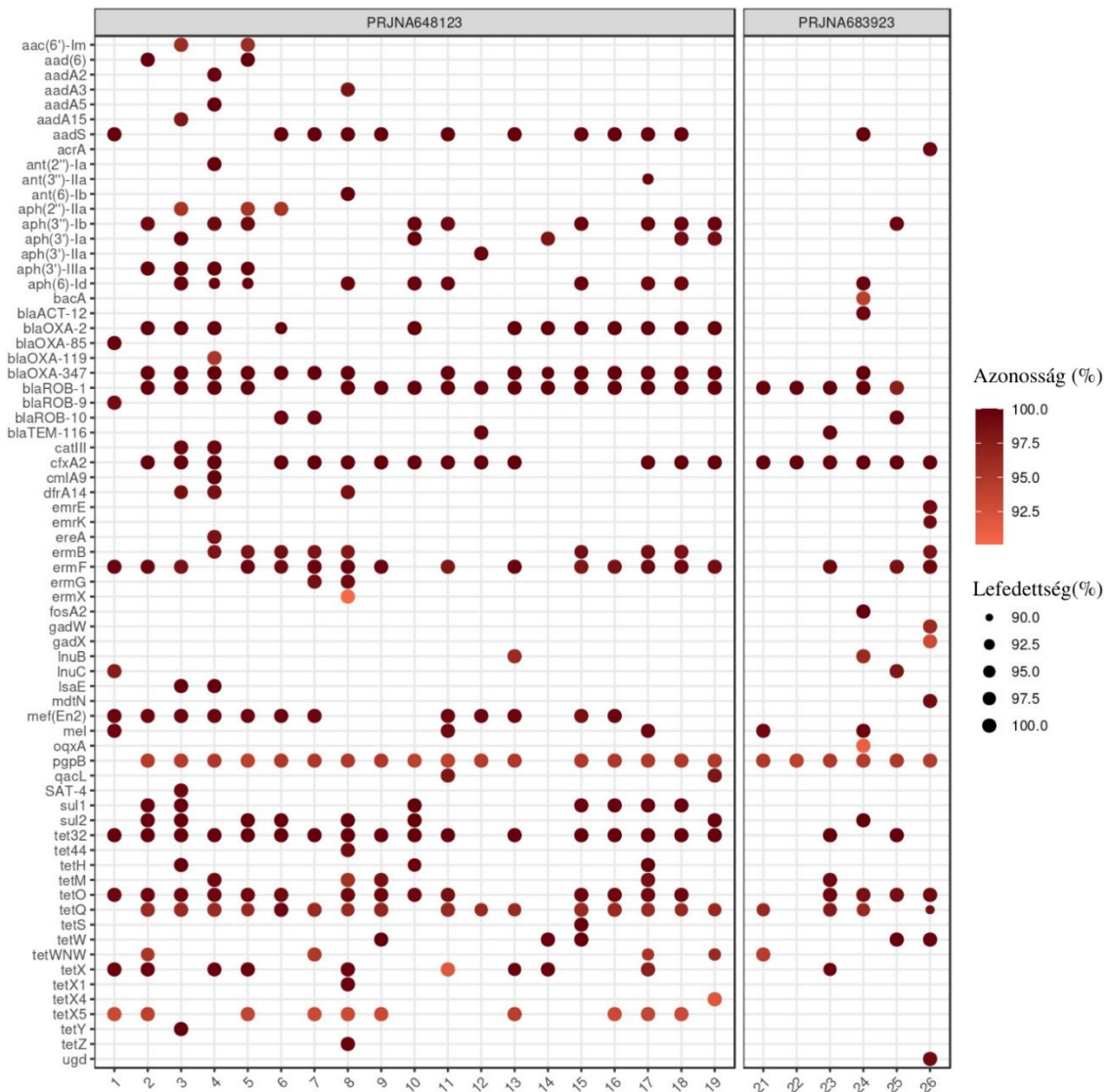
ARG-k és mobilis genetikai elemek

A fent említett szűrési feltételeket alkalmazva 69 ARG-t tudunk azonosítani, amelyeket a mintákon belül előfordulási aránnyal és az érintett gyógyszer csoportokkal együtt mutatunk be a **2. táblázatban**. Ezen ARG-k lefedettsége és szekvenciaazonossága mintánként kerül bemutatásra a **3. ábrában**. A rezisztencia mechanizmusok arányát az ARG diverzitás alapján számítottuk ki. Az azonosítás során az antibiotikum rezisztencia gének domináns mechanizmusai az antibiotikum inaktiválás (47,69%), az antibiotikum célpont védelem (23,41%), az antibiotikum célpont megváltoztatása (15,90%), az antibiotikum efflux (7,8%) és az antibiotikum célpont helyettesítés (5,20%) voltak.

2. táblázat Azonosított antimikrobiális rezisztencia gének (ARG) és az általuk érintett gyógyszer osztályok. A frekvencia oszlopok azt mutatják, hogy hány mintában fordultak elő a gének.

ARG	Frekvencia n	%	Antibiotikum kategória
<i>aac(6')-Im</i>	2	7.7	aminoglikozidok
<i>aad(6)</i>	2	7.7	aminoglikozidok
<i>aadA2</i>	1	3.8	aminoglikozidok
<i>aadA3</i>	1	3.8	aminoglikozidok
<i>aadA5</i>	1	3.8	aminoglikozidok
<i>aadA15</i>	1	3.8	aminoglikozidok
<i>aadS</i>	12	46.2	aminoglikozidok
<i>acrA</i>	1	3.8	cefalosporinok, fluorokinolonok, glicilciklin, penámok, fenikolok, rifamicin, tetraciklin, triklozán
<i>ant(2'')-Ia</i>	1	3.8	aminoglikozidok
<i>ant(3'')-IIa</i>	1	3.8	aminoglikozidok
<i>ant(6)-Ib</i>	1	3.8	aminoglikozidok
<i>aph(2'')-IIa</i>	3	11.5	aminoglikozidok
<i>aph(3'')-Ib</i>	10	38.5	aminoglikozidok
<i>aph(3')-Ia</i>	5	19.2	aminoglikozidok
<i>aph(3')-IIa</i>	1	3.8	aminoglikozidok
<i>aph(3')-IIIa</i>	4	15.4	aminoglikozidok
<i>aph(6)-Id</i>	10	38.5	aminoglikozidok
<i>bacA</i>	1	3.8	peptidek
<i>blaACT-12</i>	1	3.8	karbapenemek, cefalosporinok, cephamicin, penámok
<i>blaOXA-2</i>	12	46.2	karbapenemek, cefalosporinok, penámok
<i>blaOXA-85</i>	1	3.8	karbapenemek, cefalosporinok, penámok
<i>blaOXA-119</i>	1	3.8	karbapenemek, cefalosporinok, penámok
<i>blaOXA-347</i>	16	61.5	karbapenemek, cefalosporinok, penámok
<i>blaROB-1</i>	21	80.8	cefalosporinok, penámok
<i>blaROB-9</i>	1	3.8	cefalosporinok, penámok
<i>blaROB-10</i>	3	11.5	cefalosporinok, penámok
<i>blaTEM-116</i>	2	7.7	cefalosporinok, monobaktámok, penámok, penemek
<i>catIII</i>	2	7.7	fenikolok
<i>cfxA2</i>	20	76.9	cefamicin

<i>cmlA9</i>	1	3.8	fenikolok
<i>dfrA14</i>	3	11.5	diaminopirimidin
<i>emrE</i>	1	3.8	makrolidok
<i>emrK</i>	1	3.8	tetraciklinek
<i>ereA</i>	1	3.8	makrolidok
<i>ermB</i>	9	34.6	linkóزامid, makrolidok, sztreptogramin
<i>ermF</i>	18	69.2	linkóزامid, makrolidok, sztreptogramin
<i>ermG</i>	2	7.7	linkóزامid, makrolidok, sztreptogramin
<i>ermX</i>	1	3.8	linkóزامid, makrolidok, sztreptogramin
<i>fosA2</i>	1	3.8	foszfomicin
<i>gadW</i>	1	3.8	fluorokinolonok, makrolidok, penámok
<i>gadX</i>	1	3.8	fluorokinolonok, makrolidok, penámok
<i>lnuB</i>	2	7.7	linkóزامidok
<i>lnuC</i>	2	7.7	linkóزامidok
<i>lsaE</i>	2	7.7	linkóزامidok, makrolidok, oxazolidinon, fenikolok, pleuromutilinek, sztreptogramin, tetraciklinek
<i>mdtN</i>	1	3.8	akridin festék, fertőtlenítő szerek és interkaláló festékek, nukleozidok
<i>mef(En2)</i>	12	46.2	makrolidok
<i>mel</i>	5	19.2	linkóزامidok, makrolidok, oxazolidinon, fenikolok, pleuromutilinek, sztreptogramin, tetraciklinek
<i>oqxA</i>	1	3.8	diaminopirimidinek, fluorokinolonok, glicilciklin, nitrofuránok, tetraciklinek
<i>pgpB</i>	23	88.5	peptidek
<i>qacL</i>	2	7.7	fertőtlenítő szerek és interkaláló festékek
<i>SAT-4</i>	1	3.8	nukleozidok
<i>sul1</i>	7	26.9	szulfonamidok
<i>sul2</i>	8	30.8	szulfonamidok
<i>tet32</i>	19	73.1	tetraciklinek
<i>tet44</i>	1	3.8	tetraciklinek
<i>tetH</i>	3	11.5	tetraciklinek
<i>tetM</i>	5	19.2	tetraciklinek
<i>tetO</i>	18	69.2	tetraciklinek
<i>tetQ</i>	20	76.9	tetraciklinek
<i>tetS</i>	1	3.8	tetraciklinek
<i>tetW</i>	5	19.2	tetraciklinek
<i>tetWnw</i>	5	19.2	tetraciklinek
<i>tetX</i>	10	38.5	glicilciklin, tetraciklinek
<i>tetX1</i>	1	3.8	tetraciklinek
<i>tetX4</i>	1	3.8	glicilciklin, tetraciklinek
<i>tetX5</i>	10	38.5	tetraciklinek
<i>tetY</i>	1	3.8	tetraciklinek
<i>tetZ</i>	1	3.8	tetraciklinek
<i>ugd</i>	1	3.8	peptidek



3. ábra Azonosított antimikrobiális rezisztenciagének (ARG) mintáinként. Minden minta ARG tartalmának csak a legjobb eredményét ábrázoltuk. A pontok mérete és színe összefüggésben van a lefedettséggel és szekvencia azonossággal a referencia géneken. A 20. mintában nem volt azonosítható ARG. A túl hosszú géneveket lerövidítettük: *acrA*-*Escherichia coli*; *emrE*-*E. coli emrE*.

Az azonosított ARG-ket számos esetben iMGE-kkel, fágokkal vagy plazmidokkal is összefüggésbe hoztuk. Számos gén az említett mobilitási csoportokon belül kettőhöz is kapcsolódhatott egy adott faj genomján belül, beleértve az *Enterococcus faecium* baktériumban megtalálható aminoglikozidokkal szemben rezisztenciát kialakító *aad(6)* és *aph(3'')IIIa* rezisztenciagénben együtt megjelenő iMGE és fágokat. Szintén ideértjük a *Corynebacterium sp. 1959* és *Klebsiella quasipneumoniae*-ban található *aph(3'')-Ia* génben megjelenő iMGE és plazmidot, a *Variovorax sp. SRS16*-ban található *aph(3'')-Ia* és *aph(6)-Id* géneket, a *Variovorax sp. PAMC28562*-ben fellelhető *aph(3'')-Ib* gént, az *Enterococcus faecalis*-ban tetraciklin rezisztenciát kódoló *tetM* gént, az *Enterococcus sp.*

FDAARGOS_375-ben található makrolidok, linkózamidok és sztreptogramin ellen rezisztenciát kialakító *ermB* génben együttesen megjelenő fágokat és plazmidokat. Az amoxicillin-klavulánsavval szemben rezisztenciát kialakító *blaOXA-2*, *blaOXA-347* és *blaTEM-116* gének több faj plazmidjában megjelentek, továbbá a *blaOXA-2* rezisztenciagén a *Pseudomonas aeruginosa* genomjában található iMGE-hez és plazmidhoz is társult.

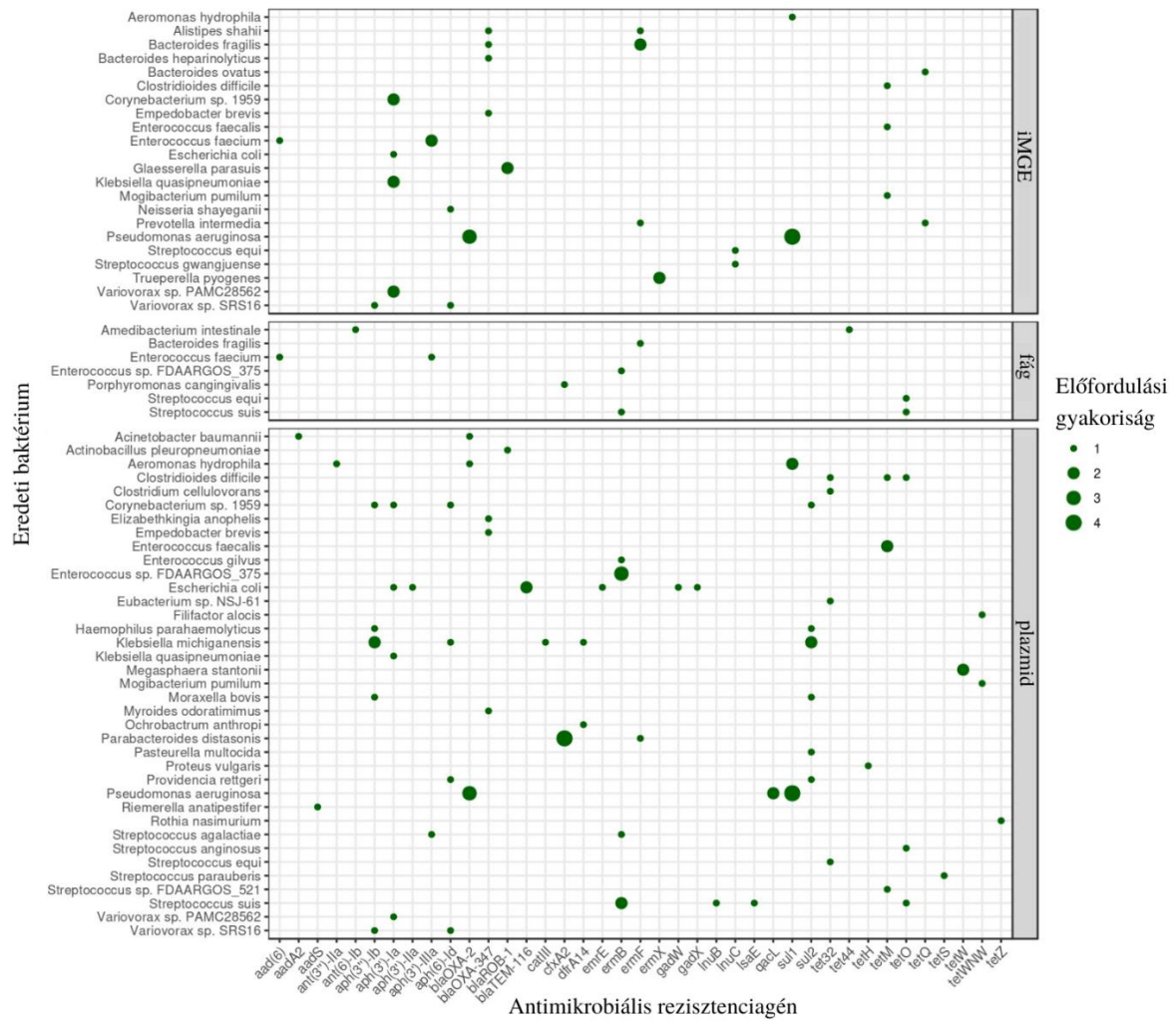
Az ARG-tartalmú kontigok fajszerű klasszifikációjának eredményét a **3. táblázat** mutatja be.

3. táblázat Azonosított antimikrobiális rezisztenciagének (ARG) és a megjósolt eredetű baktérium fajok. Tíz gén (*aadA5*, *aadA15*, *ant(2'')-Ia*, *bacA*, *blaACT-12*, *cmlA9*, *fosA2*, *oqxA*, *tetX1*, *tetY*) esetében nem kaptunk fajszerű előrejelzést a gént hordozó kontig bakteriális eredetére vonatkozóan.

ARG	Eredeti baktériumok
<i>aac(6')-Im</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
<i>aad(6)</i>	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>aadA2</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>aadA3</i>	<i>Neisseria animaloris</i>
<i>aadS</i>	<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Capnocytophaga</i> sp. H2931, <i>Capnocytophaga</i> sp. H4358, <i>Capnocytophaga stomatis</i> , <i>Chryseobacterium indologenes</i> , <i>Riemerella anatipestifer</i>
<i>acrA</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ant(3'')-IIa</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>ant(6)-Ib</i>	<i>Amedibacterium intestinale</i>
<i>aph(2'')-IIa</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
<i>aph(3'')-Ib</i>	<i>Corynebacterium</i> sp. 1959, <i>Haemophilus parahaemolyticus</i> , <i>Klebsiella michiganensis</i> , <i>Moraxella bovis</i> , <i>Variovorax</i> sp. SRS16
<i>aph(3')-Ia</i>	<i>Corynebacterium</i> sp. 1959, <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> , <i>Variovorax</i> sp. PAMC28562
<i>aph(3')-IIa</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>aph(6)-Id</i>	<i>Corynebacterium</i> sp. 1959, <i>Klebsiella michiganensis</i> , <i>Neisseria shayeganii</i> , <i>Providencia rettgeri</i> , <i>Variovorax</i> sp. SRS16
<i>blaOXA-2</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>blaOXA-85</i>	<i>Fusobacterium ulcerans</i>
<i>blaOXA-119</i>	<i>Geobacter sulfurreducens</i>
<i>blaOXA-347</i>	<i>Alistipes shahii</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Bacteroides heparinolyticus</i> , <i>Capnocytophaga</i> sp. H2931, <i>Capnocytophaga</i> sp. H4358, <i>Capnocytophaga stomatis</i> , <i>Chryseobacterium</i> sp. POL2, <i>Elizabethkingia anophelis</i> , <i>Empedobacter brevis</i> , <i>Myroides odoratimimus</i> , <i>Riemerella anatipestifer</i>
<i>blaROB-1</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> , <i>Conchiformibius steedae</i> , <i>Glaesserella parasuis</i> , <i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>blaROB-9</i>	<i>Glaesserella parasuis</i>
<i>blaROB-10</i>	<i>Bibersteinia trehalosi</i>
<i>blaTEM-116</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>catIII</i>	<i>Klebsiella michiganensis</i>
<i>cfxA2</i>	<i>Capnocytophaga cynodegmi</i> , <i>Parabacteroides distasonis</i> , <i>Porphyromonas Cangingivalis</i> , <i>Porphyromonas crevioricanis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Tannerella forsythia</i>
<i>dfrA14</i>	<i>Klebsiella michiganensis</i> , <i>Ochrobactrum anthropi</i>
<i>emrE</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>emrK</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ereA</i>	<i>Geobacter daltonii</i>
<i>ermB</i>	<i>Enterococcus gilvus</i> , <i>Enterococcus</i> sp. FDAARGOS_375, <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus suis</i>
<i>ermF</i>	<i>Alistipes shahii</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Capnocytophaga stomatis</i> , <i>Chryseobacterium indologenes</i> , <i>Parabacteroides distasonis</i> , <i>Porphyromonas cangingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Riemerella anatipestifer</i>

<i>ermG</i>	<i>Clostridioides difficile</i>
<i>ermX</i>	<i>Trueperella pyogenes</i>
<i>gadW</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>gadX</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>lnuB</i>	<i>Streptococcus suis</i>
<i>lnuC</i>	<i>Streptococcus equi</i> , <i>Streptococcus gwanguense</i>
<i>lsaE</i>	<i>Streptococcus suis</i>
<i>mdtN</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>mef(En2)</i>	<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Porphyromonas cangingivalis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i>
<i>mel</i>	<i>Streptococcus pluranimalium</i>
<i>pgpB</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>qacl</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>SAT-4</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>sul1</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>sul2</i>	<i>Corynebacterium</i> sp. 1959, <i>Haemophilus parahaemolyticus</i> , <i>Klebsiella michiganensis</i> , <i>Moraxella bovis</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Providencia rettgeri</i>
<i>tet32</i>	<i>Blautia hansenii</i> , <i>Bulleidia</i> sp. zg-1006, <i>Clostridioides difficile</i> , <i>Clostridium cellulovorans</i> , <i>Eubacterium maltosivorans</i> , <i>Eubacterium</i> sp. NSJ-61, <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Lachnoanaerobaculum umeaense</i> , <i>Peptoclostridium acidaminophilum</i> , <i>Roseburia intestinalis</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Streptococcus equi</i>
<i>tet44</i>	<i>Amedibacterium intestinale</i>
<i>tetH</i>	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas putida</i>
<i>tetM</i>	<i>Clostridioides difficile</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Mogibacterium pumilum</i> , <i>Streptococcus</i> sp. FDAARGOS_521
<i>tetO</i>	<i>Clostridioides difficile</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Murdochiella vaginalis</i> , <i>Streptococcus acidominimus</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Streptococcus equi</i> , <i>Streptococcus suis</i>
<i>tetQ</i>	<i>Alistipes indistinctus</i> , <i>Bacteroides dorei</i> , <i>Bacteroides heparinolyticus</i> , <i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Bacteroides</i> sp. HF-5287, <i>Phocaeicola coprophilus</i> , <i>Porphyromonas crevioricanis</i> , <i>Prevotella fusca</i> , <i>Prevotella intermedia</i>
<i>tetS</i>	<i>Streptococcus parauberis</i>
<i>tetW</i>	<i>Enterocloster boltea</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Megasphaera stantonii</i> , <i>Streptococcus suis</i>
<i>tetWNW</i>	<i>Filifactor alocis</i> , <i>Mogibacterium pumilum</i>
<i>tetX</i>	<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Parabacteroides distasonis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Riemerella anatipestifer</i>
<i>tetX4</i>	<i>Riemerella anatipestifer</i>
<i>tetX5</i>	<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Capnocytophaga stomatis</i> , <i>Riemerella anatipestifer</i>
<i>tetZ</i>	<i>Rothia nasimurium</i>
<i>ugd</i>	<i>Escherichia coli</i>

Az iMGE-k, fágok és plazmidok ARG-kkel társult gyakoriságát baktérium eredet szerint a **4. ábra** mutatja be.



4. ábra Mobilis antimikrobiális rezisztenciagének gyakorisága az eredeti baktériumokban. A pontok mérete az adott gén előfordulási gyakoriságát jelzi az iMGE-vel kiegészítve, plazmidban vagy fágban elhelyezve.

Megbeszélés

Baktériumok és rezisztenciagének

A kutyanyálminták bakterióm, rezisztóm és mobilom analízise során nagyszámú eredmények születtek, melyek a kisállategészségügyi szektort a humán egészségügyi rendszer perspektívájával vetik össze.

A nyálmintákból több aerob és anaerob nemzetség is izolálódott a fertőzött kutyaharapásból. A kutyaharapás fertőzései általában polimikrobiális eredetűek, a harapás okozta sebek baktériumai pedig az állatok szájüregéből, a recipiens bőréből és a környezetből származó baktériumokból állnak. A kutyaharapások leggyakoribb kórokozói a *Pasteurella spp.* (*P. canis* és *P. multocida*), *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.* és *Corynebacterium spp.* [36], amelyek mind megjelentek az elemzett nyálmintákban. Néhány más, viszonylag nagyobb klinikai jelentőségű baktériumcsoportot, amelyeket a nyálmintákban mutattak ki, beleértve az *Enterococcus spp.*, *Moraxella spp.*, *Neisseria spp.*, *Prevotella spp.*, *Pseudomonas spp.*, gyakran izolálják a kutyaharapás okozta sebfertőzésekben is. A mintákban izolált egyéb nemzetségek túlnyomó többsége a korábbi publikációkban változó abundancia aránnyal szerepelt a kutyanyálban [37, 38]. Annak ellenére, hogy a *Clostridium spp.*-t kimutattuk a mintákban, a tetanuszért felelős baktériumot, a *C. tetani* genom fragmentumait nem azonosítottuk.

A kimutatott ARG-k száma viszonylag magas volt a nyál bakteriómában. Ezek a gének mobilitásuknak köszönhetően, számos géntranszfer módot kihasználva tudnak terjedni a baktériumok között, antibiotikummal szemben ellenállóvá téve magukat, ezáltal súlyosbítva a rezisztencia terjedését és csökkentve a gyógyszerek hatékonyságát. Nyolc nemzetség (*Pasteurella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.* és *Corynebacterium spp.*) vizsgálata bizonyult más szerzők által a legrelevánsabbnak a kutyaharapások fertőzéseit illetően [36, 38]. Aminoglikozidok, karbapenemek, cefalosporinok, glicilciklinek, linkozamidok, makrolidok, oxazolidinon, penámok, fenikolok, pleuromutilinek, sztreptograminok, pleuromutilinek, szulfonamidok és tetraciklinek ellen rezisztenciát okozó géneket tudtunk azonosítani, míg más antibiotikum csoportokban, beleértve a fluorokinolonokat, viszonylag kisebb klinikai jelentőségű baktériumokat, ideértve az *Escherichia coli*-t.

Társállatok és az antibiotikum használat

A kutyák nyálmintáihoz kapcsolódó ARG-k és potenciálisan érintett antibiotikum csoportok ilyen nagy száma és széles spektruma összefügghet a kisállat-állatorvosi praxis antibiotikum-használatával. Az antibiotikum fogyasztási arányokat a háziállat területen meglehetősen nehéz értékelni. Létezik azonban néhány rendszer a társállatok antibiotikum felhasználás nagyságrendjének felügyeletére, mint például az Állatgyógyászati Antimikrobiális Szerek Fogyasztásának Európai Felügyelete (ESVAC) [39], a VetCompass [40] vagy a Small Animal Veterinary Surveillance Network (SAVSNET) [41], ám ezek az arányok még mindig kevésbé dokumentáltak. Ezenkívül sok országban az antimikrobiális szerek felhasználását gyakran csak hozzávetőleges értékesítési adatok alapján becsülik meg [42]. Ennek ellenére a két brit felügyeleti rendszer (VetCompass a Royal Veterinary College-től és a SAVSNET, a Liverpool Egyetemtől) és egy európai jelentés (ESVAC) szerint a kisállat klinikákon meglehetősen gyakran írnak fel antibiotikumot. Egy tanulmány szerint az Egyesült Királyságban négyből 1 kutyát kezelnek antibiotikumokkal két éven keresztül [43]. Annak ellenére, hogy az állatorvosok túlnyomó többsége tisztában van azzal a ténnyel, hogy a nem megfelelő antibiotikum használat hozzájárul az antimikrobiális rezisztencia szelekciójához, és hogy az AMR jelentős probléma az országos felmérések szerint [44, 45], az állatorvosok antibiotikum felírási preferenciát számos tényező befolyásolja az antimikrobiális kezelés szempontjai mellett. Egy Ausztráliában végzett tanulmány szerint az állatorvosok gyakran arról számolnak be, hogy az egyik legjelentősebb faktor, ami miatt nem tudják limitálni az antibiotikum használatot, a kliensek általi nyomás, amely hatására kénytelenek antibiotikumokat felírni [46]. A közepes jövedelmű országokban, például Dél-Afrikában, a költségek is befolyásolhatják az antibiotikumok kiválasztását [47]. Ezzel szemben az Egyesült Államokból [48], az Egyesült Királyságból [49], Hollandiából [50], vagy Ausztráliából [51] származó más kutatócsoportok által végzett tanulmányokban a klinikai gondolkodást sokkal fontosabbnak minősítették, mint az ügyfelek követeléseit. A szélesspektrumú amoxicillin-klavulánsavat, a kutyákon alkalmazott antimikrobiális szerek zászlóshajóját számos országban használják, miközben az első generációs cefalosporinokat is rutinszerűen alkalmazzák [42, 52, 53]. A linkózamidokról (klindamicin), makrolidokról, tetraciklinekről (doxiciklin), nitroimidazolokról és trimetoprim-szulfonamidokról szintén beszámoltak, hogy a kisállatok kezelésekor gyakran használják [42]. A harmadik és negyedik generációs cefalosporinokat, fluorokinolonokat és polimixineket, amelyek az Európai Gyógyszerügynökség [39] szerint a B kategóriájú, „végső megoldás” vagy a

legmagasabb prioritású kritikus fontosságú antibiotikumok (HPCIA) kategóriába tartoznak, kerülni kell, ha csak előtte nem végeznek érzékenységi vizsgálatot, és semmilyen más antibiotikum nem bizonyul hatékonynak. Becslések szerint ennek ellenére a HPCIA kategóriába tartozó gyógyszereket az összes antibiotikum használatakor az esetek körülbelül 5-6%-ában írják fel. A HPCIA kategóriából a leggyakoribban a fluorokinolonokat veszik igénybe kutyákon, amely az összes antibiotikum felírás 4-5%-át teszi ki [54].

A kutyaharapás rejtett veszélyei és terápiája

A jelenlegi irodalomban a kutyaharapással összefüggő emberi fertőzések pontosabban és gyakrabban dokumentáltak, mint az arcnyalás által terjedő fertőzések útvonala. A kutyaharapások esete 3-30%-a fertőzéshez vezet [37].

A harapás kezelése két pilléren nyugszik: a helyi sebkezelésen és a megfelelően alkalmazott szisztémás kezelésen. A lokális terápia nélkülözhetetlen eleme a szemle, a sebtisztítás, az esetleges idegen testek eltávolítása, pl. fogak, és leöblítése sóoldattal. Továbbá radiológiai diagnosztikát kell elvégezni a törés kizárása érdekében, és ha klinikailag indokolt. A seb elsődleges vagy késleltetett zárására vonatkozó ajánlások és a következményes fertőzések megjelenésének kockázatára vonatkozó elemzések ellentmondásosak, mivel vizsgálatok azt mutatják, hogy az emlősöknek a harapása legalább 6-8%-a befertőződik az elsődleges zárás után. Másrészt egy randomizált vizsgálat szerint az arc sebének alacsony a fertőzésveszélye a kiváló vérellátás miatt, még az elsődleges zárás után is profilaktikus antibiotikumok alkalmazása nélkül [55, 56]. A végtagokon lévő késleltetett megjelenésű sebeket nyitva kell hagyni [57]. Friss harapott sebek tenyésztésével a tályog jeleinek megjelenése előtt a súlyos cellulitisz vagy szepszis megelőzhető és kezelhető [58].

Ami a szisztémás terápiát illeti, mindig mérlegelni kell a tetanusz emlékeztető adását, ha az elmúlt évben nem adták, és a veszettség profilaxisát. Vizsgálatunkban a tetanusz kórokozóját, a *Clostridium tetani* genom fragmentumait egyik vizsgált nyálmintában sem mutattuk ki. Az antibiotikumok harapott sebek kezelésére való alkalmazásában még nem sikerült konszenzusra jutni. Megfontolandó a profilaktikus antibiotikumok használat, kivéve, ha a seb nagyon felületes és tiszta. Az antibiotikum profilaxis vagy terápia kifejezetten javallott a harapás után legalább 8 órával, a felülfertőzés egyértelmű jelei esetében, közepesen súlyos vagy súlyos sebek zúzódásos sérüléseinél vagy műtétet igénylő devitalizált szövetek, mély szúrt sebek, az epidermisz rétegét meghaladó, ízületekhez közeli

sebek, diabetes mellitus, asplenicus vagy immunhiányos állapot, alkoholfogyasztás, vagy a nemi szervek, az arc vagy a kéz érintettségekor [58–62]. A fenti esetek hiányában előfordulhat, hogy az antibiotikum terápia nem szükséges. Érdekes módon a sérülések általában a fejen, a nyakon és az arcon találhatók gyermekeknél, míg a felnőtteknél a kézen vagy a felső végtagon a támadó kutyával való magasságarány miatt [37, 63].

A megfelelően megválasztott antibiotikum várhatóan hatásosnak bizonyul az anaerob baktériumok (*Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.* stb.), valamint *Staphylococcus*, *Streptococcus* és *Pasteurella* fajok ellen. A profilaktikus kezelés általában 3-5 napig tart, míg fertőzött seb esetén 10 napos vagy hosszabb gyógyszeres kezelés javasolt. Az orális terápia első vonalbeli választása az amoxicillin-klavulánsav, amelyet nagy kockázatú betegeknél intravénás antibiotikum, például ampicillin-szulfaktám, ticarcillin-klavulánsav, piperacillin-tazobaktám vagy karbapenem kísér. Az amoxicillin-klavulánsavat gyakran kombinálják metronidazollal vagy klindamicinnel, és esetenként helyettesítik cefalosporinokkal is, pl. cefuroxim, cefotaxim, ceftriaxon, vagy amoxicillin, fluorokinolonok, szulfametoxazol és trimetoprim vagy, bár kevésbé hatékony, azitromicin vagy doxiciklin kombinációban [58, 62]. A magas rezisztencia miatt a flucloxacillin, az eritromicin és a cefalosporinok gyakran hatástalanok a *Pasteurella* fertőzésekben, ezért inkább kerülendők [60].

Számos országban általános irányzatként az antibiotikumok állatgyógyászati felhasználása fokozatosan csökken [39, 46, 54, 64, 65]. A humán gyógyászatban az antibiotikumok értékesítése 65%-kal nőtt az alacsony és közepes jövedelmű országokban, és kismértékben, 4%-kal csökkent a magas jövedelmű országokban 2000 és 2015 között, ami a globális antibiotikum fogyasztási ráták növekedését jelenti [66, 67]. Feltételezhető, hogy a kutyák nyálbakteriómájában számos, klinikailag fontos antibiotikum csoportokkal szemben rezisztenciát biztosító gén található, amelyek az emberben a baktériumok genomjába olvadhatnak. A kutyanyállal és a kutyaharapással való találkozás fajok közötti platformként szolgálhat a baktériumok és az antimikrobiális rezisztencia gének vándorlásához. Az átvitt baktériumok klinikai tüneteket okozhatnak, és az általuk hordozott ARG-k rezisztenciát eredményezhetnek a klinikai jelentőségű antibiotikumokkal szemben.

A harapás kezelésekor alkalmazott antibiotikum profilaxis eredményére vonatkozó adatok korlátozottak, és meglehetősen ellentmondásosak. Míg 8 randomizált vizsgálat metaanalízise az antibiotikum profilaxis előnyeit mutatta [68], egyes tanulmányok arra a következtetésre jutottak, hogy az antibiotikum profilaxis nem eredményez statisztikailag szignifikáns különbséget a sebfertőzések kezelt és a kezeletlen betegcsoportjai között,

kivéve a kézen lévő sebek esetén [69]. Más publikációk alapján az antibiotikum profilaxis csak a magas kockázatú betegcsoportok számára javasolt [70, 71].

Az amoxicillin-klavulánsav, a kisállatgyógyászatban leggyakrabban használt antibiotikum, a kutyák harapásos sebeinek első számú választása, a széles spektrumú penicillinek tagja, amely egy globális tanulmány szerint 2000 és 2018 között a magas jövedelmű szuperrégiókban a leggyakrabban fogyasztott kulcsfontosságú antibiotikum csoport volt [66]. Összességében 23 ARG-típust mutattunk ki a kutya nyálmintákban, amely amoxicillin-klavulánsavval szembeni rezisztenciát válthat ki, ezek a *blaTEM* vagy az *OXA* család tagjai voltak [72, 73]. A *TEM-116* gént az *E. coli*-ban azonosították, míg az *OXA* család különböző tagjai számos nemzetségben megjelentek, beleértve az *Acinetobacter baumannii*, *Bacteroides spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Fusobacterium ulcerans* és *Pseudomonas spp.* nemzetséget is, amelyek nagy klinikai jelentőséggel bírhatnak a kutyaharapás fertőzéseiben.

A mobil ARG-t hordozó baktériumok nyál útján történő átvitele a kutyákban nehezítheti és el is lehetetlenítheti az antibiotikum használatot a humán egészségügyben, és hozzájárulhat az AMR terjedéséhez, a háziállatokból származó baktériumból az emberben megjelenő baktériumok felé.

Ennek dacára, a kutyanyálát a múltban a gyors gyógyulás elősegítésére és a bakteriális szennyeződés csökkentésére használták az etnoveterinár és etnomedicinális gyakorlatokról szóló jelentések szerint [74, 75]. A kutyanyálnak többek között a tiocianát, lizozim és közvetve nitrát tartalma által kiváltott antimikrobiális és gyulladásgátló hatása [76, 77] még alacsony koncentrációban is megjelenhet [78]. Azonban megállapításaink szerint a kutyanyál közegészségügyi kockázatokkal is összefüggésbe hozható, mivel a nyálbaktériumok szennyezhetik az ember környezetét, és megtelepedhetnek az emberi bőrön és a nyálkahártyán is. Ily módon az emberben és a körülötte jelenlévő ARG-ben gazdag baktériumoknak még csak nem is feltétlenül kell átvinniük ARG-eket, hogy súlyos károkat okozhassanak különböző immunrendszeri gyengeségekkel küzdő embereknél, pl. időseknél vagy beteg embereknél.

Összefoglaló

Az antimikrobiális rezisztencia (AMR) napjainkban egyre nagyobb teret hódít, magában hordozva a köz- és állategészségügyi veszélyt, az antimikrobiális szerek hatástalanságának lehetőségét és közvetve a halál okát. A hatékonynak bizonyuló antibiotikumok köre szűkül és nem tart lépést a multirezisztens baktériumok megjelenésével, ezzel okozva minden évben több ezer életveszélyes gyógyíthatatlan fertőzést.

A humán- és állatgyógyászatban értelmetlenül igénybevett antibiotikumok mellett a világ egyes részein a hozamfokozásra történő alkalmazást lehet felelőssé tenni a jelenség gyorsuló üteméért. A folyamatot a baktériumok között megvalósuló horizontális géntranszfer (HGT) is lehetővé teszi, mely útján egymás között szabadon cserélhetik ki a baktériumok az antimikrobiális rezisztenciagéneket (ARG) megfelelő triggerrek jelenlétében.

A számos országban egyre népszerűbbé váló társállat tartás mellett, a házi kedvencek és gazdáik közötti kapcsolat szorosabbá formálódása is szignifikáns faktor a rezisztens baktériumok és gének vándorlásának tekintetében. A kutyák gyakran alszanak együtt tulajdonosaikkal, és a gazda megnyalása, vagy sajnos a kutyaharapási eset sem ritka, ami nagyban hozzájárul az AMR fajok közötti terjedéséhez.

A dolgozatban arra kerestük a választ, rejt-e veszélyt a társállatok mikrobiomjának emberi szervezettel való találkozása antibiotikum rezisztencia gének átadása szempontjából. Az Egyesült Államokból származó interneten elérhető kutyanyálminták genomját megvizsgáltuk, kimutatva ezzel a mintában található rezisztenciagéneket.

A vizsgálatok során 26 kutyanyálminta új generációs szekvenálási módszerrel előállított metagenom adathalmazát bioinformatikailag elemeztük. A mintákban számos baktérium taxont, ARG-t és ARG mobilitást elősegítő genetikai elemet tudtunk azonosítani. A nyálmintákban leggyakrabban előforduló baktérium nemzetség a *Porphyromonas*, *Prevotella* és a *Pasteurella*, a detektált ARG-k által befolyásolt antibiotikum csoportok pedig az aminoglikozidok, karbapenemek, cefalosporinok, glicilciklinek, linkózamidok, makrolidok, oxazolidion, penámok, fenikolok, pleuromutilinek, sztreptograminok, szulfonamidok és tetraciklinek voltak.

A kutyák nyálmintáihoz kapcsolódó antimikrobiális rezisztenciagének és a potenciálisan érintett antibiotikum csoportok száma nagy. A horizontális géntranszfer, amely a terjedő antimikrobiális rezisztencia alapjául szolgál, valamint a kisállatokkal való

szoros együttélés lehetőséget teremt az antimikrobiális rezisztenciagének kutyáról tulajdonosra vándorlására.

A leírt eredmények jelentőségének pontosabb megítéléséhez további vizsgálatokra van szükség, viszont eme esettanulmány rámutat arra, milyen potenciális veszélyforrás rejtőzik a kutyanyálban, és ha az ember szoros kapcsolatban él a társállatokkal.

Summary

Antimicrobial resistance (AMR) is becoming more and more common these days, posing a threat to public and animal health, the possibility of the ineffectiveness of antimicrobial agents and, indirectly, the cause of death. The range of effective antibiotics is narrowing and not keeping up with the rise of multi-resistant bacteria, causing thousands of life-threatening incurable infections every year.

In addition to the irresponsible use of antibiotics in human and veterinary medicine, their use in the food industry to increase yields, can be held responsible for the globally developed and widespread resistance. The process is made possible by horizontal gene transfer (HGT) between bacteria, through which bacterial populations can freely exchange antimicrobial resistance genes (ARG) among themselves.

In addition to the increasing number of companion animals, the change to a closer relationship is also a significant factor in the migration of resistant bacteria and genes from the pet to the owner. Dogs often sleep with their owners and lick their faces, and unfortunately dog bites are also not uncommon, that contributes greatly to the interspecies spread of AMR.

In the thesis, we looked for the answer to whether the contact of the microbiome of companion animals with the human body is a danger from the point of view of the transfer of antibiotic resistance genes. We screened and sequenced the genomes of dog saliva samples available on the Internet from the United States, revealing resistance genes hidden in the sample.

We collected 26 samples, which were filtered and selected in a specific way, compiled into contigs, and then taxonomically classified. We were able to identify several ARG sequences in the samples. The most frequently occurring bacterial genera in the saliva samples were *Porphyromonas*, *Prevotella* and *Pasteurella* and ARGs against aminoglycosides, carbapenems, cephalosporins, glycylicyclines, lincosamides, macrolides, oxazolidinone, penams, phenicols, pleuromutilins, streptogramins, sulfonamides and tetracyclines could have been identified.

A large number of antimicrobial resistance genes associated with dog saliva samples and potentially affected antibiotic groups show a correlation. Horizontal gene transfer, spreading antibiotic resistance and close cohabitation with small animals create an opportunity for resistance genes to migrate from dog to owner.

Further investigations are needed to assess the significance of the described results more precisely, but this case study points to the potential source of danger hidden in dog saliva and behind keeping close companion animals.

Irodalomjegyzék

1. Howard M. (2013) The real story behind penicillin. PBS News Hour Health
2. Gálfi P CGJÁ (2015) Állatorvosi gyógyszerstan III. Budapest, Robbie-Vet Kft., p.78-88 p89-112, p113-130, p131-132, p133-134, p135-154, p155-162, p201-205, p213-215, p232-243.
3. Pataky M (1970) Antibiotikumok élelmezéségszsegügyi megítelese a tejvizsgálatban. Élelmiszervizsgálati Közlem
4. (2003) 4. 2003. évi 1831/2003 /EC rendelet a takarmányozási célra felhasznált adalékanyagokról
5. Stokes H GM (2011) Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. EMS Microbiology Reviews 35(5):790-819:
6. Aarestrup FM (2000) Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. APMIS 108, 0-48.:
7. Overgaauw P VCHML (2020) A one health perspective on the human–companion animal relationship with emphasis on zoonotic aspects. Int journal environmental research public health 17(11):3789:
8. Rowan A.N. (2018) Companion animal statistics in the USA
9. Jensen HAVMA (2017) Pet Ownership and Demographics Sourcebook. American Veterinary Medical Association edn. 800.248.2862:
10. Loder RT (2019) The demographics of dog bites in the united states. Heliyon 5(3):e01360:
11. Overall K LM (2021) Dog bites to humans demography, epidemiology, injury, and risk. J Am Vet Med Assoc 218(12):1923–34:
12. Levy S MB (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat Med 10(12 Suppl):S122–9:
13. Shan G (2016) Phage Transduction. In: Clostridium difficile: Methods and Protocols. pp 177–185
14. Barna J LKTVBVSVMHPAEVT (2013) Genetikai gyakorlatok. Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest
15. Tamber S HR (2003) On the mechanism of solute uptake in Pseudomonas. Front Biosci 8:s472-83:
16. Vincent D GJ((2016) Horizontal Gene Transfer and the History of Life. Cold Spring Harb Perspect Biology 8(4): a018036:
17. Ochman H LED v (2005) Examining bacterial species under the specter of gene transfer and exchange. . . Proc Natl Acad Sci 102 Suppl 1:6595–9:
18. Canchaya C FGBH (2004) The impact of prophages on bacterial chromosomes. Mol Microbiol 53(1):9–18:
19. Bobay L-M, Touchon M, Rocha EPC (2014) Pervasive domestication of defective prophages by bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences 111:12127–12132. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405336111>
20. Price MN, Arkin AP, Alm EJ (2006) The Life-Cycle of Operons. PLoS Genet 2:e96. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020096>
21. Lawrence JG, Roth JR (1996) Selfish Operons: Horizontal Transfer May Drive the Evolution of Gene Clusters. Genetics 143:1843–1860. <https://doi.org/10.1093/genetics/143.4.1843>
22. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. Nat Rev Microbiol 2:414–424. <https://doi.org/10.1038/nrmicro884>

23. Stefan AB RJJP (2019) Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. . European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 38, 1059–10707:
24. Wood DE, Lu J, Langmead B (2019) Improved metagenomic analysis with Kraken 2. Genome Biol 20:257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
25. R Core Team. R (2021) A Language and Environment for Statistical Computing. . R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
26. McMurdie PJ, Holmes S (2013) An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS One 8:e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
27. Leo L SS (2019) S. microbiome R package
28. Li D, Liu C-M, Luo R, Sadakane K, Lam T-W (2015) MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. Bioinformatics 31:1674–1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>
29. 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>
30. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, Bhullar K, Canova MJ, de Pascale G, Ejim L, Kalan L, King AM, Koteva K, Morar M, Mulvey MR, O’Brien JS, Pawlowski AC, Piddock LJ v., Spanogiannopoulos P, Sutherland AD, Tang I, Taylor PL, Thaker M, Wang W, Yan M, Yu T, Wright GD (2013) The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. Antimicrob Agents Chemother 57:3348–3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
31. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Waglechner N, Guo P, Tsang KK, Lago BA, Dave BM, Pereira S, Sharma AN, Doshi S, Courtot M, Lo R, Williams LE, Frye JG, Elsayegh T, Sardar D, Westman EL, Pawlowski AC, Johnson TA, Brinkman FSL, Wright GD, McArthur AG (2017) CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. Nucleic Acids Res 45:D566–D573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004>
32. Buchfink B, Xie C, Huson DH (2015) Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. Nat Methods 12:59–60. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
33. 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. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 76:101–109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>
34. Krawczyk PS, Lipinski L, Dziembowski A (2018) PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. Nucleic Acids Res 46:e35–e35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1321>
35. Guo J, Bolduc B, Zayed AA, Varsani A, Dominguez-Huerta G, Delmont TO, Pratama AA, Gazitúa MC, Vik D, Sullivan MB, Roux S (2021) VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. Microbiome 9:37. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00990-y>
36. Thomas N, Brook I (2011) Animal bite-associated infections: microbiology and treatment. Expert Rev Anti Infect Ther 9:215–226. <https://doi.org/10.1586/eri.10.162>
37. Dhillon J, Hoopes J, Epp T (2019) Scoping decades of dog evidence: a scoping review of dog bite-related sequelae. Canadian Journal of Public Health 110:364–375. <https://doi.org/10.17269/s41997-018-0145-3>
38. Abrahamian FM, Goldstein EJC (2011) Microbiology of Animal Bite Wound Infections. Clin Microbiol Rev 24:231–246. <https://doi.org/10.1128/CMR.00041-10>

39. European Medicines Agency (2022) European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption.
40. McGreevy P, Thomson P, Dhand N, Raubenheimer D, Masters S, Mansfield C, Baldwin T, Soares Magalhaes R, Rand J, Hill P, Peaston A, Gilkerson J, Combs M, Raidal S, Irwin P, Irons P, Squires R, Brodbelt D, Hammond J (2017) VetCompass Australia: A National Big Data Collection System for Veterinary Science. *Animals* 7:74. <https://doi.org/10.3390/ani7100074>
41. Radford AD, Noble PJ, Coyne KP, Gaskell RM, Jones PH, Bryan JGE, Setzkorn C, Tierney Á, Dawson S (2011) Antibacterial prescribing patterns in small animal veterinary practice identified via SAVSNET: the small animal veterinary surveillance network. *Veterinary Record* 169:310–310. <https://doi.org/10.1136/vr.d5062>
42. Pomba C, Rantala M, Greko C, Baptiste KE, Catry B, van Duijkeren E, Mateus A, Moreno MA, Pyörälä S, Ružauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Kunsagi Z, Torren-Edo J, Jukes H, Törneke K (2016) Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* dkw481. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw481>
43. Buckland EL, O'Neill D, Summers J, Mateus A, Church D, Redmond L, Brodbelt D (2016) Characterisation of antimicrobial usage in cats and dogs attending UK primary care companion animal veterinary practices. *Veterinary Record* 179:489–489. <https://doi.org/10.1136/vr.103830>
44. Odoi A, Samuels R, Carter CN, Smith J (2021) Antibiotic prescription practices and opinions regarding antimicrobial resistance among veterinarians in Kentucky, USA. *PLoS One* 16:e0249653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249653>
45. Sobierajski T, Mazińska B, Chajęcka-Wierzchowska W, Śmiałek M, Hryniewicz W (2022) Antimicrobial and Antibiotic Resistance from the Perspective of Polish Veterinary Students: An Inter-University Study. *Antibiotics* 11:115. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010115>
46. Hardefeldt LY, Selinger J, Stevenson MA, Gilkerson JR, Crabb H, Billman-Jacobe H, Thursky K, Bailey KE, Awad M, Browning GF (2018) Population wide assessment of antimicrobial use in dogs and cats using a novel data source – A cohort study using pet insurance data. *Vet Microbiol* 225:34–39. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.010>
47. Samuels R, Qekwana DN, Oguttu JW, Odoi A (2021) Antibiotic prescription practices and attitudes towards the use of antimicrobials among veterinarians in the City of Tshwane, South Africa. *PeerJ* 9:e10144. <https://doi.org/10.7717/peerj.10144>
48. Jacob ME, Hoppin JA, Steers N, Davis JL, Davidson G, Hansen B, Lunn KF, Murphy KM, Papich MG (2015) Opinions of clinical veterinarians at a US veterinary teaching hospital regarding antimicrobial use and antimicrobial-resistant infections. *J Am Vet Med Assoc* 247:938–944. <https://doi.org/10.2460/javma.247.8.938>
49. Hughes LA, Williams N, Clegg P, Callaby R, Nuttall T, Coyne K, Pinchbeck G, Dawson S (2012) Cross-sectional survey of antimicrobial prescribing patterns in UK small animal veterinary practice. *Prev Vet Med* 104:309–316. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.12.003>
50. Hopman NEM, Mughini-Gras L, Speksnijder DC, Wagenaar JA, van Geijlswijk IM, Broens EM (2019) Attitudes and perceptions of Dutch companion animal veterinarians towards antimicrobial use and antimicrobial resistance. *Prev Vet Med* 170:104717. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104717>
51. Norris JM, Zhuo A, Govendir M, Rowbotham SJ, Labbate M, Degeling C, Gilbert GL, Dominey-Howes D, Ward MP (2019) Factors influencing the behaviour and perceptions of Australian veterinarians towards antibiotic use and antimicrobial resistance. *PLoS One* 14:e0223534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223534>
52. Kvaale MK, Grave K, Kristoffersen AB, Norström M (2013) The prescription rate of antibacterial agents in dogs in Norway - geographical patterns and trends during the period 2004–2008. *J Vet Pharmacol Ther* 36:285–291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2012.01425.x>

53. Tompson AC, Mateus ALP, Brodbelt DC, Chandler CIR (2021) Understanding Antibiotic Use in Companion Animals: A Literature Review Identifying Avenues for Future Efforts. *Front Vet Sci* 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.719547>
54. Singleton DA, Sánchez-Vizcaíno F, Dawson S, Jones PH, Noble PJM, Pinchbeck GL, Williams NJ, Radford AD (2017) Patterns of antimicrobial agent prescription in a sentinel population of canine and feline veterinary practices in the United Kingdom. *The Veterinary Journal* 224:18–24. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.03.010>
55. Chen E, Horing S, Shepherd SM, Hollander JE (2000) Primary Closure of Mammalian Bites. *Academic Emergency Medicine* 7:157–161. <https://doi.org/10.1111/j.1553-2712.2000.tb00519.x>
56. Paschos NK, Makris EA, Gantsos A, Georgoulis AD (2014) Primary closure versus non-closure of dog bite wounds. A randomised controlled trial. *Injury* 45:237–240. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2013.07.010>
57. Rui-feng C, Li-song H, Ji-bo Z, Li-qiu W (2013) Emergency treatment on facial laceration of dog bite wounds with immediate primary closure: a prospective randomized trial study. *BMC Emerg Med* 13:S2. <https://doi.org/10.1186/1471-227X-13-S1-S2>
58. Aziz H, Rhee P, Pandit V, Tang A, Gries L, Joseph B (2015) The current concepts in management of animal (dog, cat, snake, scorpion) and human bite wounds. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 78:641–648. <https://doi.org/10.1097/TA.0000000000000531>
59. Ellis R EC (2014) Dog and cat bites. *Am family physician* 90(4):239–43:
60. Malahias M, Jordan D, Hughes O, Khan WS, Hindocha S (2014) Bite Injuries to the Hand: Microbiology, Virology and Management. *Open Orthop J* 8:157–161. <https://doi.org/10.2174/1874325001408010157>
61. Jakeman M, Oxley JA, Owczarczak-Garstecka SC, Westgarth C (2020) Pet dog bites in children: management and prevention. *BMJ Paediatr Open* 4:e000726. <https://doi.org/10.1136/bmjpo-2020-000726>
62. Zangari A, Cerigioni E, Nino F, Guidi R, Gulia C, Piergentili R, Ilari M, Mazzoni N, Cobellis G (2021) Dog bite injuries in a tertiary care children’s hospital: A seven-year review. *Pediatrics International* 63:575–580. <https://doi.org/10.1111/ped.14484>
63. Monroy A, Behar P, Nagy M, Poje C, Pizzuto M, Brodsky L (2009) Head and neck dog bites in children. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* 140:354–357. <https://doi.org/10.1016/j.otohns.2008.11.026>
64. Borck B KHWUBFBVE-IJHRBHJLKH (2016) Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Statens Serum Institut, National Veterinary Institute, Technical University of Denmark National Food Institute, Technical University of Denmark
65. Hopman NEM, Portengen L, Heederik DJJ, Wagenaar JA, van Geijlswijk IM, Broens EM (2019) Time trends, seasonal differences and determinants of systemic antimicrobial use in companion animal clinics (2012-2015). *Vet Microbiol* 235:289–294. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.016>
66. Browne AJ, Chipeta MG, Haines-Woodhouse G, Kumaran EPA, Hamadani BHK, Zarea S, Henry NJ, Deshpande A, Reiner RC, Day NPJ, Lopez AD, Dunachie S, Moore CE, Stergachis A, Hay SI, Dolecek C (2021) Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study. *Lancet Planet Health* 5:e893–e904. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(21\)00280-1](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(21)00280-1)
67. Sutherland ME (2018) Antibiotic use across the globe. *Nat Hum Behav* 2:373–373. <https://doi.org/10.1038/s41562-018-0347-y>

68. Cummings P (1994) Antibiotics to prevent infection in patients with dog bite wounds: A meta-analysis of randomized trials. *Ann Emerg Med* 23:535–540. [https://doi.org/10.1016/S0196-0644\(94\)70073-7](https://doi.org/10.1016/S0196-0644(94)70073-7)
69. Medeiros IM, Saconato H (2001) Antibiotic prophylaxis for mammalian bites. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001738>
70. Morgan M, Palmer J (2007) Dog bites. *BMJ* 334:413–417. <https://doi.org/10.1136/bmj.39105.659919.BE>
71. Stevens DL, Bisno AL, Chambers HF, Everett ED, Dellinger P, Goldstein EJC, Gorbach SL, Hirschmann J v., Kaplan EL, Montoya JG, Wade JC (2005) Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Skin and Soft-Tissue Infections. *Clinical Infectious Diseases* 41:1373–1406. <https://doi.org/10.1086/497143>
72. di Conza JA, Badaracco A, Ayala J, Rodriguez C, Famiglietti Á, Gutkind GO (2014) β -lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant enterobacteria isolated in Buenos Aires, Argentina: A new blaTEM gene. *Rev Argent Microbiol* 46:210–217. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70075-6](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70075-6)
73. Davies TJ, Stoesser N, Sheppard AE, Abuoun M, Fowler P, Swann J, Quan TP, Griffiths D, Vaughan A, Morgan M, Phan HTT, Jeffery KJ, Andersson M, Ellington MJ, Ekelund O, Woodford N, Mathers AJ, Bonomo RA, Crook DW, Peto TEA, Anjum MF, Walker AS (2020) Reconciling the Potentially Irreconcilable? Genotypic and Phenotypic Amoxicillin-Clavulanate Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 64:. <https://doi.org/10.1128/AAC.02026-19>
74. Verrier L (1970) DOG LICKS MAN. *The Lancet* 295:615. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(70\)91650-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(70)91650-8)
75. Vallejo JR, Santos-Fita D, González JA (2017) The therapeutic use of the dog in Spain: a review from a historical and cross-cultural perspective of a change in the human-dog relationship. *J Ethnobiol Ethnomed* 13:47. <https://doi.org/10.1186/s13002-017-0175-6>
76. Benjamin N, Pattullo S, Weller R, Smith L, Ormerod A (1997) Wound licking and nitric oxide. *The Lancet* 349:1776. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)63002-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)63002-4)
77. Dhasarathan P ARBJSP (2013) Analysis of compounds and screening for anti-microbial, anti-inflammatory activity from saliva of canis lupus familiaris. *International Journal of Ethnomedicine and Pharmacological* Vol.1 Issue 1, P.1-6:
78. Akpomie O UPNOU (2011) Saliva of different dog breeds as antimicrobial agents against microorganisms isolated from wound infections. *Animal Science Journal* 2(1): 18-22:

Köszönetnyilvánítás


Köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek, Dr. Solymosi Norbertnek és Dr. Tóth Adrienn Grétának a dolgozatom létrejöttéhez nélkülözhetetlen közreműködésükért, nyitottságukért, türelmükért, segítségükért, felkészítésükért és befogadásukért, hogy általuk az elején ismeretlennek tekintett kutatási módszert megismertették velem és megtanították, és segítségükkel elkészíthettem ezt a számomra nagyon izgalmas témájú dolgozatot.

Hálával tartozom barátaimnak és Tobak Botondnak, amiért témám iránti lelkesedésemet ugyanolyan lelkesedéssel hallgatták, és motiváltak.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Tóth Adrienn Gréta, mint témavezető nyilatkozom, hogy Kovács Eszter Gabriella állatorvostan-hallgató „Kutyanyálminták antimikrobiális-rezisztenciagén tartalmának vizsgálata” c. dolgozata részt vehet az Állatorvostudományi Egyetem 2022. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján.

Budapest, 2022. 09. 22.



.....

témavezető

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Kovács Eszter Gabriella

Elérhetőség (e-mail cím): eszter.gabriella15@gmail.com

A feltöltendő mű címe: Kutanyálminták antimikrobiális rezisztenciagén tartalmának vizsgálata

A mű megjelenési adatai: TDK dolgozat, 2022

Az átadott fájlok száma: 1

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

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

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

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

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

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

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

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

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

Budapest, 2022. év 10 hó 13 nap

aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archivum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutjra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

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

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



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: Kovács Eszter Gabriella

Neptun-kódja: TX2HI6

A témavezető neve és beosztása: Dr. Solymosi Norbert PhD, egyetemi docens

Tanszék: Bioinformatikai Központ

A diplomadolgozat címe: Kutyanyálminták antimikrobiális rezisztenciagén tartalmának vizsgálata

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2021	05	05	Téma kiválasztása	<i>[Signature]</i>
2.	2021	05	06	Bevezetés az NGS adatok bioinformatikai feldolgozásába	<i>[Signature]</i>
3.	2021	05	13	Mintagyűjtés az NCBI oldalán	<i>[Signature]</i>
4.	2021	06	27	A minták futtatása elkészül	<i>[Signature]</i>
5.	2021	08	23	Kapcsolódó irodalom tanulmányozása és forrás gyűjtés	<i>[Signature]</i>

Érdemjegy az első félév végén: 5

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2021	11	20	Dolgozat írásának kezdete	<i>[Signature]</i>
2.	2022	09	21	Az absztrakt elkészül	<i>[Signature]</i>
3.	2022	10	17	A dolgozat elkészül	<i>[Signature]</i>
4.	2022	11	16	A téma a TDK konferencián bemutatásra kerül	<i>[Signature]</i>
5.					

Érdemjegy a második félév végén: 5

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: *[Handwritten signature]*

[Handwritten signature]
.....
témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása: *[Handwritten signature]*

Átvétel dátuma: *2023. 11. 03.*

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!

NYILATKOZAT

Alulírott KOVACS ESZTER nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe KUTYANYALMINTAK ANTIMIKROBIÁLIS
RESZTENCIAGÉN TARTALMAIÁK VIZSGÁLATA tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2022 évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023. 11. 09.


KOVACS ESZTER

a hallgató neve és aláírása