

TDK DOLGOZAT

Füzi Vanessza

2024

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



Házityúokban engedélyezett amoxicillin tartalmú készítmény *in vivo* hatása az antibiotikum rezisztencia kialakulására

Készítette:

Füzi Vanessza

VI. évf. ao. hallgató

Témavezető:

Dr. Kerek Ádám

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, egyetemi tanársegéd

Budapest

2024

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Az antimikrobiális rezisztencia jelentősége	5
2.2. A házityúk gazdasági jelentősége.....	9
2.2.1 Az antimikrobiális rezisztencia helyzete házityúkban.....	9
2.3. Cefalosporin keresztrezisztencia más hatóanyagcsoportokkal.....	10
2.4. A házityúk bélmikrobiom összetétele.....	11
2.5. Az amoxicillin jelentősége a házityúkban	13
3. Célkitűzések	15
4. Anyag és módszer.....	16
4.1. Az állatkísérlet körülményei.....	16
4.2. Metagenomikai vizsgálatok.....	17
4.3. Bioinformatikai elemzés.....	17
5. Eredmények.....	19
6. Következtetések.....	28
7. Összefoglalás.....	31
8. Summary.....	32
9. Irodalomjegyzék	33
10. Köszönetnyilvánítás	41

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ARG	Antimikrobiális rezisztencia gén
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Kiterjedt spektrumú β -laktamáz
HGT	Horizontális géntranszfer
MDR	Multirezisztens
MGE	Mobilis genetikai elem

1. BEVEZETÉS

Az antimikrobiális rezisztencia korunk egyik legnagyobb kihívása, ezért közös gondolkodásra van szükség az állat- és közegészségügy területén, megteremtve az Egy Egészség elvet. Az antimikrobiális rezisztencia helyzetének folyamatos monitorozása mellett figyelmet kell fordítani az olyan vizsgálatokra, amelyek az antibiotikumok használatából adódó, az egyes hatóanyagcsoportok közötti rezisztencia kilakulását indukáló folyamatok. Ezek megértéséhez elengedhetetlen konvencionális körülmények között vizsgálni többek között a bélmikrobiomra gyakorolt hatását az egyes hatóanyagoknak, amelyek változása nem csak taxonómiai szempontból, hanem az antimikrobiális génkészletben bekövetkező változások oldaláról is kiemelt jelentőséggel bírnak. A baromfiipar a sertéságazat után a második legnagyobb antibiotikum felhasználó szektor, egyúttal a legrövidebb egységnyi idő alatt a legtöbb állati eredetű fehérjét előállító ágazat. A fogyasztókkal való közvetlen kapcsolódása következtében, az Egy Egészség tükrében különösen fontos helyet foglalnak el az ezzel kapcsolatos vizsgálatok, hiszen közös érdekünk nem csak a megfelelő mennyiségű élelmiszer, hanem a megbízható és biztonságos táplálékforrás biztosítása az emberiség számára.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az antimikrobiális rezisztencia jelentősége

Az antimikrobiális szerek három fő csoportja a vírusellenes, a gombaellenes és az antibakteriális szerek. Ez utóbbi csoporton belül vannak baktérium vagy gomba fajok által termelt természetes vegyületek és szintetikusan előállított hatóanyagok (kemoterapetikumok). A természetes vegyületeket és azok félszintetikus változatait antibiotikumoknak nevezzük. Az antibiotikumok gátolják a baktériumok szaporodását (bakteriosztatikus hatásmód) vagy elpusztítják azokat (baktericid hatásmód) [1]. Egyes baktériumok azonban nem vagy kevésbé érzékenyek bizonyos antibiotikumokkal szemben, ez az ellenállóképesség lehet *ab ovo* (az adott hatóanyag sosem hatott rá), szerzett (a korábban érzékeny baktérium rezisztenssé vált) vagy adaptív módon (valamilyen specifikus környezeti tényező hatására) kialakuló [2]. *Intrinsic* rezisztencia figyelhető meg például a Gram-negatív baktériumfajok esetében a sejtfalszintézist gátló glikopeptid antibiotikumokkal szemben, mivel külső membránjuknak köszönhetően a hatóanyagok nem férnek hozzá a célpontjukhoz. A szerzett ellenállóképesség mutáció vagy horizontális géntranszfer (HGT) útján alakulhat ki [3], az adaptív rezisztencia pedig gyakran a nem terápiás dózisban alkalmazott antibiotikumok következtében jön létre [4].

A rezisztencia lehet kromoszómális vagy plazmid eredetű. A baktériumok termelhetnek antibiotikum-bontó vagy -átalakító enzimeket, megváltoztathatják a külső membránjuk permeabilitását vagy az antimikrobiális szer kötőhelyét, valamint expresszálhatnak efflux pumpákat az ellenállóképességük növelésének érdekében. Az antibiotikumokat bontó enzimek közé tartoznak például a β -laktamázok, amelyek a β -laktám gyűrű szerkezetének hasításával deaktiválják azt. Az Enterobacteriaceae család tagjai nagyon gyakran termelnek ilyen típusú enzimátikus fehérjéket [5]. Más típusú enzimek nem hasítják az adott hatóanyag molekuláját, hanem módosítják azt, például különböző szubsztitúciós csoportok hozzáadásával [6]. A β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia növelésének egy másik lehetséges módja a baktériumok külső membránjának áteresztőképesség csökkentése, az ún. csatornafehérjék számának csökkentése vagy szerkezetének módosítása által. Annak érdekében, hogy az antimikrobiális hatóanyagok koncentrációja a hatékony szint alá csökkenjen, egyes baktériumok efflux pumpákat használnak. Más baktériumok az antibiotikumok kötőhelyének megváltoztatásával érik el, hogy ezen szerek kevésbé fejtsék ki hatásukat. Ez utóbbi rezisztencia mechanizmus főleg a Gram-pozitív baktériumokra jellemző [5].

A HGT az antimikrobiális rezisztencia fő hajtóereje, a genetikai információ átadása történhet konjugációval, transzdukcióval vagy transzformációval; végbe mehet rokon fajok között, de akár különböző baktériumfajok között is, amit Zhou és mtsai. vizsgálataik során bizonyítottak [7]. Ennek oka, hogy a laterális génátadást ökológiai és funkcionális tényezők is befolyásolják, így bár gyakrabban megy végbe filogenetikailag közelebb álló fajok között, amelyek genomja hasonló, de amennyiben a mikroorganizmusok ökológia környezete hasonló, nagyobb eséllyel játszódik rendszertanilag távolabb álló baktériumok között is [8, 9]. Egy amerikai kutatás során például sikertelen volt egy plazmid átvitele *Salmonella* Heidelberg baktériumból egy másik *Salmonella* vonalba, de sikerült azt átvinni *Escherichia coli* (*E. coli*) törzsbe [10]. A HGT nagyban hozzájárul a baktériumpopulációk változó környezethez való alkalmazkodásához, a szerzett gének többek között a rezisztenciaprofil bővülését eredményezhetik [11]. Ezen felül a horizontális génátadás hatással bír a baktériumok evolúciójára is, ennek vizsgálatára naposcsibéket fertőztek *Salmonella* Heidelberg baktériummal. Az első fertőzés után az izolátumok 2%-a, a második után 40%-a szerzett rezisztenciát valamilyen antibiotikum hatóanyaggal szemben. Az új ellenállóképesség meghatározásáért felelős elemeként az *E. coli* törzsből származó pST26-IncI1 plazmidot azonosították [12].

A géntranszfer végbe mehet vertikális úton is, ilyenkor az utódokba jut a genetikai információ, ezt bizonyította egy olyan kutatás, ahol a naposcsibékből izolált *E. coli* törzsek 63,3%-a ellenállónak bizonyult valamilyen antibiotikummal szemben, sőt nagy részük multirezisztens (MDR) volt [13]. Az antimikrobiális rezisztencia megszerzése általában csökkenti a baktérium fitnessét [1], de egyes esetekben ez nem jelentős mértékű. Például egy MDR *Salmonella* vonalból a bla_{CTX-M-1} gént tartalmazó plazmid transzfere *E. coli*-ba antibiotikum jelenléte nélkül is lezajlott az esetek többségében, tehát a plazmid hordozása nem jelenthet nagy rátermettség-visszaesést [14]. Azt is kimutatták, hogy például *Campylobacter jejuni* esetében a rezisztenciagének felvétele növelheti az adott baktérium fitnessét [11].

Az antibiotikumok széleskörű használata a humán egészségügyben, a növénytermesztésben, az állattenyésztésben és az állatgyógyászatban olyan baktériumvonalak szelekcióját eredményezi, amelyek mutációs potenciálja nagyobb, így könnyebben alakul ki bennük rezisztencia [15, 16]. Továbbá az antibiotikumoknak, fémeknek, UV sugárzásnak való kitettség oxidatív stresszt jelent a baktériumok számára, ami elősegíti az antibiotikum és fém rezisztenciagének ko-szelekcióját, illetve

transzferét [17]. Ezen túl a terápiás és a szubterápiás dózisban alkalmazott antibiotikumok is hasonló hatással bírnak [18]. Ennek köszönhetően azoknál az állatoknál, amelyek antimikrobiális szert kapnak, a bélmikrobiom antimikrobiális rezisztencia gén (ARG) készlete nagyobb, mint a természetes módon takarmányozott egyedeknél [19]. Az antibiotikumok alkalmazása azonban nem csak az adott hatóanyaggal szembeni rezisztenciagének gyakoriságát növeli, hanem más hatóanyagokkal szemben is kialakíthat keresztrezisztenciát, tehát a rezisztenciagének szelekciója specifikus és nem specifikus nyomás hatására is bekövetkezik [20]. Ez magyarázza többek között azt, hogy tetraciklin kezelésben részesült csirkék bélmikrobiomjában fellelhetőek tigeziklin-ellenállóképességet meghatározó gének is annak ellenére, hogy ezt az antibiotikumot az állattenyésztésben nem használják [21]. A korábban hozamfokozásra [22] használt antimikrobiális készítmények szerepe jelentős volt a rezisztencia terjesztésében, például a klórtetraciklin alkalmazása az aminoglikozid és nukleozid rezisztenciagének, míg a bacitracin felhasználása a β -laktám- és makrolid-, linkozamid- és sztreptogramin rezisztenciagének gyakoriságát növeli [23]. Li és mtsai. kutatása során hosszútávú enrofloxacin kezelés hatására a tetraciklinekkel, amoxicillin-klavulánsavval, ampicillinnel, klóramfenikollal és szulfametoxazollal-trimetoprim hatóanyagokkal szembeni ellenállóképesség megjelenését tapasztalták [24].

Napjainkban az antimikrobiális rezisztencia terjedése az egyik fő közegészségügyi kihívás, ennek következtében a sikeres terápiás kezelések száma csökken, a korábban hatékony gyógyszerek egy része pedig hatástalanná válik. A kórházi tartózkodás alatt általában a betegek 15%-a fertőződik meg valamilyen rezisztens kórokozóval, ami kiemelt jelentőségű, mivel a rezisztens baktériumok okozta fertőzések halálozási rátája több, mint kétszerese a nem rezisztens baktériumokénak. Emellett Európában 2012 óta bizonyítottan nő az MDR mikroorganizmusok okozta megbetegedések száma [25], az Egészségügyi Világszervezet (WHO) szerint 2017-2020 között egyes antimikrobiális rezisztencia előfordulási gyakorisága 15%-kal nőtt [26]. Az antimikrobiális rezisztencia terjedése jelentős gazdasági károkat is okoz, ami az Európai Unióban évente kb. 1,5 milliárd euró veszteséget jelent [27], az USA-ban pedig évente 4-5 millió dollárt fordítanak a rezisztens baktériumok okozta fertőzések megelőzésére, valamint további 2,2 milliárd dollárt az általuk okozta fertőzések kezelésére [25]. Ezen törekvések ellenére is évente több, mint 700 ezer ember halála köthető bizonyítottan az antimikrobiális rezisztenciához, ami a legóvatosabb becslések szerint is 2050-re eléri a 10 milliót [28, 29]. Emiatt kiemelten fontos az egyes

kórokozók érzékenységének folyamatos monitorozása, illetve az egyes állatfajok szerepének megismerése az antimikrobiális rezisztencia terjesztésében.

Az ARG-k lehetnek endogének vagy exogének, kromoszómálisan kódoltak (*intrinsic*), illetve pontmutáció vagy HGT révén szerzettek [9]. Az ARG-profil kialakulását főleg a bélmikrobiom és a takarmány összetevői befolyásolják, a nehézfémek például elősegítik a rezisztenciagének kifejeződését [30], valamint a fém-rezisztenciagének gyakran kapcsolatban állnak az antibiotikum rezisztencia génekkel. Hu és mtsai. kutatásuk során megállapították, hogy az állati eredetű baktériumok a legjelentősebb ARG-források. Az ARG-átadás leggyakrabban állati és emberi baktériumok között megy végbe, valamint állati és vízi vagy szárazföldi baktériumok között többször következik be, mint az emberi és a környezetben élő baktériumok között. A legtöbb közös mobilis genetikai elemet (MGE) humán és csirke bélmikrobiomban azonosították [9]. Egy kínai kutatás során ehhez hasonló eredményeket írtak le, amelyben brojlercsirke telepen tartott madarak bélmikrobiomját vetették össze az ott és a telephez tartozó vágóhídon dolgozókéval, és bennük 14 közös MGE-t találtak, amelyek közül 11 klinikai jelentőséggel bírt [31]. A brojlercsirkék tehát fontos rezisztenciagén források az ember számára, Brogdon és mtsai. arra hívták fel a figyelmet, hogy azokban a háztartásokban élő gyerekek bélcsatornájában, amelyekben baromfit tartanak, négyszer nagyobb eséllyel található tetraciklin rezisztenciagén, mint a baromfit nem tartó háztartásokban élő emberekében [32]. Továbbá egyes élő baromfit értékesítő piaci árusok mintáiban azonosított florfenikol rezisztenciagének is bizonyítottan a madaraktól származtak, hiszen ezt a hatóanyagot nem alkalmazzák a közegészségügyben, azonban használata a baromfiágazatban széles körben elterjedt [33]. Az élő baromfi kereskedelmének az antimikrobiális rezisztencia terjesztésben betöltött szerepét bizonyítja az is, hogy egy vizsgálat során a piacokon tartott állatokból és a piacok környezetéből vett izolátumok ARG génkészlete jelentős mértékben megegyezett [34]. Ennek az egyik oka, hogy vannak olyan hatóanyag csoportok - mint például a tetraciklinek vagy a fluorokinolonok -, amelyek bélcsatornában való biológiai hasznosulása rossz. Az alkalmazott antibiotikumok nagyjából 60-90%-a változatlan formában vagy aktív metabolitként ürül a bélsárral [35]. A baromfifélék ebből a szempontból nagyobb veszélyt jelentenek, mint az emlősök, ugyanis a baromfiféléket feldolgozó vágóhidak szennyvizében jóval magasabb az antibiotikum-rezisztencia szintje, mint az emlősöket feldolgozókéban [36]. A környezetbe kerülő hatóanyag hozzájárul a környezeti antimikrobiális rezisztencia

terjedéséhez, a talaj ARG-rezervoárként működhet, ahonnan ezek a gének szélesebb körben terjedhetnek [37].

2.2. A házityúk gazdasági jelentősége

A házityúk (*Gallus gallus domesticus*) gazdasági szempontból az egyik legjelentősebb baromfiféle és egyben a legfontosabb állati fehérjeforrás az emberiség számára. Egyrészt a házityúk termel -széles körben emberi fogyasztásra alkalmas- tojást, másrészt pedig a csirkehús a legtöbbet fogyasztott hús a világon [38]. 2019-ben a világ tyúktojás-termelése nagyjából 73,2 millió tonna volt [39]. Egyes becslések szerint a globális csirkehús termelés 2025-re eléri a 8,14 billió tonnát [40]. Bolygónk népességének növekedésével párhuzamosan jelentős mértékben nőtt az igény a házityúk húására és tojására, ennek megfelelően az elmúlt 60 évben az előállított hús mennyisége 1500 %-kal [31], 2020-ban 2,6 %-kal nőtt [41]. A Föld legnagyobb csirkehús-fogyasztója Mexikó, ahol az egy főre jutó éves fogyasztás 2015-ben 30,7 kg/fő volt, ami 2021-re 4,2 kg/fő-vel nőtt és egyes becslések szerint 2030-ra elérheti a 42,3 kg/fő fogyasztást [42]. A haszonállatok közül a brojlercsirke fajlagos takarmány-felhasználása a legkedvezőbb (1,6 kg/kg). Továbbá a csirkehús mellett szól az is, hogy a többi hússal összehasonlítva előállítása a legolcsóbb, valamint sokoldalúan felhasználható és fogyasztása minden vallás által elfogadott [43].

2.2.1 Az antimikrobiális rezisztencia helyzete házityúkban

Egy, az Európai Unióban elvégzett felmérés alapján a brojlercsirkékből izolált *Salmonella* baktériumok 57,5-78%-a volt rezisztens ciprofloxacinnal, 42,2%-a tetraciklinnel, 45%-a szulfametoxazollal, 2,1%-a azitromicinnal, 2,0%-a harmadik generációs cefalosporinnal és 1,0%-a kolisztinnel szemben. A tojókból izolált szalmonellák kevésbé ellenállóak, tetraciklinre csak 7,0%-ban, szulfametoxazolra 7,2%-ban, azitromicinre pedig 0,5 %-ban voltak rezisztensek. A brojlerekből származó szalmonellák átlagosan 41,8%-a volt MDR, addig a tojókból származókéknak csupán átlagosan 1,1%-a. Ugyanezen kutatás során megállapították, hogy a *meticillin-rezisztens Staphylococcus aureus (MRSA)* izolátumok körében a penicillinnel, cefoxitinnal és tetraciklinnel szembeni multirezisztencia a leggyakoribb kombináció. Ezeket a baktériumtörzseket 2020-ban a Belgiumból származó brojlercsirke-minták 3,3%-ában sikerült kimutatni. A felmérés során továbbá egy másik fontos patogén, az *E. coli* ellenállóképességét is vizsgálták különféle antibiotikumokkal szemben. A brojlercsirkékből származó izolátumok átlagosan 52,7%-a volt rezisztens ciprofloxacinnal, 0,5%-a pedig eritromicinnal szemben. A különféle országokból származó minták átlagosan 38,3%-a bizonyult MDR-nek. Továbbá habár a

kritikusan fontos hatóanyagok közé tartozó kolisztinnel szembeni általában nem figyelhető meg rezisztencia, egyes országokban ez a 10,1 %-ot is eléri [44].

Egy másik kutatás során csirke bélsármintában lévő *Enterococcus* baktériumok rezisztenciáját vizsgálták, 100%-ban ellenállónak bizonyultak eritromicinnel szemben, 81,67%-uk tetraciklinnel, 73,33%-uk amoxicillin-klavulánsavval, 68,33%-uk ofloxacinnal, 65%-uk pedig vankomicinnel szemben mutatott rezisztenciát [45].

2.3. Cefalosporin keresztrezisztencia más hatóanyagcsoportokkal

A cefalosporinok a β -laktámok közé tartozó, időfüggő baktericid hatásmóddal rendelkező antibiotikumok, amelyek a baktériumok sejtfalszintézisének gátlásával fejtik ki hatásmechanizmusukat [46]. Öt generációjuk van, amelyek közül a harmadik és a negyedik generáció a kritikusan fontos antibiotikumok (CIA) közé [47], az Európai Gyógyszerügynökség besorolása szerint pedig az AMEG B kategóriába tartoznak. Az első két generáció pedig AMEG C kategóriás hatóanyag [48].

A cefalosporinok és más β -laktám antibiotikumok között gyakran áll fenn részleges vagy teljes keresztrezisztencia több baktériumfaj esetében is. Portugáliában például brojlércsirkéből izolált *E. coli* és *Morganella morganii* baktériumok ellenállónak bizonyultak ampicillinnel, cefotaximmal és ceftazidimmal szemben [49]. Egy másik kutatás során pedig az amoxicillin-használat elősegítette bizonyos cefalosporin rezisztenciagének szelekcióját [50]. Libanonban egyes cefalosporin-rezisztens *Salmonella* Kentucky izolátumok aztreonám hatóanyaggal szembeni rezisztenciát mutattak, Peruban pedig olyan *E. coli* baktériumokat írtak le, amelyek nem csak cefalosporinokkal szemben voltak ellenállóak, hanem meropenemmel szemben is [33].

Az azonos hatóanyagcsoportba tartozó antibiotikumokon kívül egyéb csoportok között is megfigyeltek keresztrezisztenciát. Két kutatás során [51, 52] leírtak coliform baktériumokban egy plazmidot, amely cefalosporin, tetraciklin és szulfonamid rezisztenciát kódol, valamint egy esetben sztreptomycin rezisztenciagént is megfigyeltek [53]. Ugyanakkor Laoson és mtsai. emberekből, baromfifélékből és csirkehúsból izolált cefalosporin-rezisztens *E. coli* törzsek 38,5%-a esetén egyidejűleg kolisztinnel szembeni rezisztenciát is megfigyeltek [54]. Ezen felül Deblais és mtsai. megfigyelték, hogy nő a CTXM és az *mcr-1* géneket együtt hordozó *E. coli* izolátumok száma [55], amit alátámaszt az is, hogy Belgiumban brojlércsirkék bélsarából izolált baktériumokban egyszerre mutatták ki az *mcr-1* kolisztin rezisztenciagént és β -laktám rezisztenciagéneket [56]. Egy másik belga

kutatás során a ceftiofur-rezisztencia, valamint a nalidixsavval, a neomicinnel és a trimetoprim-szulfametoxazollal szembeni ellenállóképességek között fedeztek fel kapcsolatot [50]. A cefalosporin-aminoglikozid-kinolon-tetraciklin keresztrezisztencia jelenlétét leírták Afridi és mtsai. [57], Tofani és mtsai. [58] és Jiang és mtsai. is [59]. Mindemellett a potenciált szulfonamidokkal és a cefalosporinokkal szembeni rezisztencia együttes jelenlétét megfigyelték a Fülöp-szigeteken brojlersirke telepekről származó *E. coli* izolátumokban, ezek több mint 90%-a ellenálló volt a legtöbb cefalosporin hatóanyaggal szemben, valamint a törzsek 72,46%-a szulfametoxazol-trimetoprimmal szemben is [60]. Az *E. coli* mellett számos más fajra is jellemző, hogy több antibiotikumcsoporttal szemben rezisztensek egyidejűleg, egy *Salmonella* Santpaul törzsben azonosított plazmid (pSGB23) például kilenc antibiotikum csoporttal szembeni ellenállást meghatározó rezisztenciagéneket tartalmazott, ezek az aminoglikozidok, a makrolidok, a tetraciklinek, a β -laktámok, a fluorokinolonok, a fenikolok, a foszfomicin, a szulfonamidok és a diaminopirimidinek voltak [61]. Továbbá egy portugál kutatás keretein belül különböző haszonállatok húsából származó *Acinetobacter* spp. minták 51,2%-a esetén azonosították azokat MDR-nek, 9,6%-a a mintáknak pedig kiterjedt gyógyszerrezisztens (XDR) törzs volt [62].

Megfigyelhető, hogy azok a baktériumok, amelyek kiterjedt-spektrumú β -laktamázt (ESBL) termelnek gyakran MDR-ek. Dos Santos Bersot és mtsai. például olyan ESBL-termelő *Salmonella* Heidelberg izolátumokat vizsgáltak, amelyek minimum nyolc antibiotikumcsoporttal szemben voltak ellenállóak [63]. Egy kínai kutatás során pedig majdnem minden csirkehúsból származó ciprofloxacín és ceftazidim/cefotaxim ko-rezisztens *Salmonella* törzs termelt ilyen típusú enzimet és ezeknek több mint fele kilenc, negyedük nyolc antibiotikum csoporttal, míg 17,86%-uk pedig minden vizsgált antibiotikummal szemben rezisztens volt, kivéve a karbapenemeket [64].

2.4. A házityúk bélmikrobiom összetétele

A tojásból történő kikelés után rövid időn belül az állatok béltraktusát mikroorganizmusok kolonizálják, először fakultatív anaerob baktériumok telepednek meg, majd ezeket idővel anaerob fajok váltják fel. A vakbélben az első baktériumok a *Streptococcus* és az *Enterobacter* nemzetség tagjai [65], ugyanakkor a mikrobiom összetétele csupán a nevelési időszak közepén válik relatív állandóvá [66]. Az érett csirkék vakbelében több mint 100 nemzetség és több mint 600 faj él, 10^{10} - 10^{11} nagyságrendben a vakbéltartalom minden egyes grammjában. Házityúkokban hat hetes korig nő a bélmikrobiom diverzitása [65], ami az utóbélben nagyobb, mint az előbélben [67].

Az utóbélben az anaerob baktériumok vannak többségben, míg az előbélben a *Lactobacillus* a legnépesebb nemzettség [67]. A Bacteroidetes törzs népessége az emésztőtraktusban hátrafele haladva nő, míg a Cyano- és Proteobacteria törzsek képviselői a begyben, a Firmicutes törzsé pedig az ileumban vannak a legnagyobb számban jelen [68]. A csípőbélben főként fakultatív és mikroaerofil baktériumok élnek, a jejunumban pedig az *Acinetobacter* és *Acidobacteria* genusok a dominánsak [65]. A különbségek hátterében az anatómiai és funkcionális sajátosságok állnak, a begy a táplálék tárolására szolgáló szerv, így a takarmány mikrobiális összetétele nagyban befolyásolja a bélmikrobiomot, az ileumban ellenben a takarmány tápanyagösszetétele a meghatározó, hiszen főleg itt zajlik az emésztés és a felszívás [68]. A vakbélben az anaerob környezethez való alkalmazkodóképesség a meghatározó, így itt a *Bacteroides* és *Clostridium* genusok dominánsak. Mindemellett fontos kiemelni, hogy a bélmikrobiom nem csupán a gazdaszervezet metabolizmusában tölt be fontos szerepet, hanem az immunrendszerének modulálásában és szerveinek fejlődésében is [69].

A brojlercsirkék belében élő baktériumok több, mint 88%-a a Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria vagy Actinobacteria törzsbe tartozik [67]. A teljes bélszakaszra nézve egyes források szerint a Firmicutes a legnépesebb törzs, amelyet fiatal korban a Proteobacteria, de a nevelési időszak felétől a Bacteroidetes követ [66]. Xu és mtsai. ellenben a Bacteroidetes törzset találták a legnépesebbnek, a Firmicutes a második volt [21]. A genusok közül az *Oscillospira*, a *Bacteroides*, a *Rumino-* és *Coprococcus* nemzetségek a legjelentősebbek [66]. Ami a vakbelet illeti, a domináns baktériumtörzs itt is a Firmicutes, amelyet a Bacteroides, Proteobacteria, Deferribacteres, Synergistetes és Verrucomicrobia törzsek követnek csökkenő sorrendben [70]. Egy a Bermuda szigetcsoporton folytatott kutatás szerint is a Firmicutes a leggazdagabb törzs, a második a Bacteroidetes, a harmadik pedig a Proteobacteria [71].

Tojástermelő tyúkok esetében a vakbélben a Bacteroidetes a leggazdagabb baktériumtörzs, amelyet a Firmicutes, majd a Proteobacteria törzs követ [72]. Azonban a vakbél mikrobiom összetételét a tartási körülmények is befolyásolják, ketreces tartástechnológia esetén a mikrobiom gazdagsága és összetettsége a tojásrakási periódus elején a legalacsonyabb, míg a ketrecmentes tartásnál a diverzitás nem változik jelentősen a tojástermelési időszak alatt. A β -diverzitás ellenben mindkét módszernél a tojástermelés elején a legmagasabb. Másrésről a ketreces tartástechnológiánál a három fő baktériumtörzs (Bacteroidetes, Firmicutes és Proteobacteria) relatív gyakorisága nem változik jelentősen az

idővel, de ketrecesmentes tartás esetén a Bacteroidetes törzs a tojástermelés csúcsán a legnépesebb, míg a Firmicutes törzs képviselőinek száma ekkor a legalacsonyabb. Mindkét tartástechnológia során megfigyelhető a *Fusobacteria* genus korral történő párhuzamos növekedése [73].

A bélmikrobiom összetételét nem csak genetikai, környezeti és takarmányozási tényezők, hanem különféle emberi beavatkozások is befolyásolják [67]. Brojlercsirkék egy csoportja 55 mg/ttkg penicillint kapott a takarmányba keverten. Az antibiotikum hatására a vakbélben nőtt a Firmicutes baktériumok aránya (58,15%-ról 91,5%-ra), míg a Bacteroidetes képviselők száma csökkent (31,1%-ról 2,96%-ra), tehát a Firmicutes/Bacteroidetes arány szignifikánsan megnőtt. Ez az eltérés állhat egyébként az antibiotikumok hozamfokozó hatása mögött is, amely nagyobb súlygyarapodást és fokozottabb energiatermelést jelent [74]. Egy amerikai kutatás is az antibiotikumok bélmikrobiomra gyakorolt hatását vizsgálta, a fő különbség az antibiotikum mentesen takarmányozott brojlercsirkékkel szemben az volt, hogy az ileumban a *Lactobacillus* nemzettség és az Enterobacteriaceae család népessége, valamint a bifidobaktériumok száma is csökkent, ami előnytelen a gazdaszervezet számára. Azonban az antibiotikumetetés hatására a *Campylobacter* spp. száma jelentősen csökkent. Közegészségügyi szempontból ez azért is jelentős, mert néhány *Campylobacter* faj a humán akut bakteriális gastroenteritis fő okozója és ezek fő rezervoárja a házityúk [69].

2.5. Az amoxicillin jelentősége a házityúkban

Az állattenyésztésben használt antibiotikumok egyes kutatások szerint 73%-át teszik ki a világ teljes antibiotikum-használatának [75], ez 2030-ra 105 596±3605 tonna gyógyszer felhasználását jelenti majd éves szinten [76]. Az antimikrobiális szerek élelmiszertermelő állatokban történő alkalmazásának három fő célja van: a betegségek kezelése, a betegségek megelőzése és bizonyos elmaradottabb országokban a mai napig a hozamfokozás. Az antibiotikus szerek főleg a vakbél mikrobiomjának modulálásával segítik elő az állatok súlygyarapodását és a patogén kórokozók kolonizációjának kiszorítását [77]. Az antibiotikum-felhasználás mértékét jól szemlélteti egy tanulmány, amely szerint a bangladesi farmok 41%-a esetén használtak a vizsgálatokat megelőző 24 órában, 98%-a esetén pedig az utolsó termelési időszak kezdete óta valamilyen antibiotikumot betegségkezelési vagy megelőzési céllal. A leggyakrabban használt hatóanyagok az oxitetraciklin, a doxiciklin, a ciprofloxacín és az amoxicillin voltak [78]. Világszerte pedig egy kilogramm csirkehús előállításánál átlagosan 148 µg antibiotikum kerül felhasználásra [76].

Az amoxicillin egy szélesített spektrumú penicillin, mely a Gram-pozitív baktériumok többsége mellett a Gram-negatív baktériumok ellen is számos esetben hatékony. A hatékonyságának növelése céljából gyakran kombinálják klavulánsavval, ami egy β -laktamáz inhibitor, vagyis önmagát feláldozva képes megkötni az amoxicillint bontó enzimeket. Alkalmazása önmagában és klavulánsavval kombinációban igen széleskörű, lágyrészfertőzésektől kezdve, clostridiumok okozta elhalásos bélgyulladásra át a septicémiáig terjed. Baromfiféléknek azonban az Európai Unióban klavulánsav nem adható, mivel nincs rá meghatározva maximális maradékanyag szint (*maximum residue level*, MRL) [79]. A világ legnagyobb antibiotikum-felhasználó országában, Kínában, a tyúktartó telepeken az amoxicillin a legtöbbet használt antimikrobiális szer [80]. Mianmarban ugyan az amoxicillin csupán a harmadik leggyakrabban alkalmazott antibiotikum hatóanyag, de az első helyen egy olyan készítmény áll, amely amoxicillint és kolisztin-szulfátot tartalmaz [81].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás célja, hogy egy házityúkra engedélyezett amoxicillin antibiotikum hatóanyagot tartalmazó készítmény hatását vizsgáljuk az állatok bélmikrobiomjának taxonómiai összetételére, továbbá az antimikrobiális génkészletre gyakorolt hatását és az azonosított gének plazmidon vagy fágon való hordozását és azok esetleges mobilitását is megfigyeljük. Mindezek mellett pedig nyomon követtük az állatok súlygyarapodását. A vizsgálatok célja az volt, hogy az amoxicillin normál dózisa mellett, annak $\frac{1}{4}\times$ dóziséval, mint a készítmény szubdózisának alkalmazása esetén, megfigyeljük annak hatására a bekövetkező változásokat.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Az állatkísérlet körülményei

Az állatkísérletre a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék Állatházában került sor. Az Állatorvostudományi Egyetem Munkahelyi Állattjólleti Bizottsága állásfoglalása értelmében, az 1998. évi 28. tv. 3.§ (9), valamint a 40/2013. (II. 14) Korm. rendelet 1.§ (4), c), és különösen az f) pontjai értelmében a vizsgálatok nem minősülnek az állati jóllétet hátrányosan befolyásoló vizsgálatnak, így az állatvédelmi hatóság felé projektengedélykérelem beadására annak elvégzéséhez nem volt szükség. A vizsgálat során összesen 120 db Ross-308 brojlercsirkét vontunk be a kutatásba, amelyek testtömegét napos korban, majd ezt követően hetente (7., 14., 21. és 28. naposan) mértük. Az állatokat 12, 10-10 egyedből álló csoportba osztottuk randomizált módon, az egyes csoportok külön-külön ketrecben kaptak helyet. Ezzel minden esetben három párhuzamos csoportot alakítottunk ki, a statisztikai összehasonlítás céljából. A 9-12. csoportok voltak a negatív kontrollok, amelyek nem kaptak semmiféle kezelést. Az 1-6. csoportba tartozó madarak 21. napos életkortól 10 napon keresztül (a gyártó útmutatója szerint) antibiotikum kezelésben részesültek, a 7-9. csoportba tartozó madarak pedig a készítmény vivőanyagát képező keményítőt, mint placebo kapták (**1. táblázat**). A bélmikrobiom összetételének és változásának vizsgálata céljából kloaka bélsármintavételt végeztünk az állatok érkezésekor, annak a tisztázása érdekében, hogy milyen baktériumokat és rezisztencia géneket hoztak magukkal. Ezt követően az antibiotikumos kezelést megelőző napon, majd a 10 napos kezelést követő napos ismét bélsármintákat gyűjtöttünk.

1. táblázat A tíz napos kezelés napi szinten meghatározott csoportonkénti amoxicillin hatóanyagot tartalmazó készítmény 1x és ¼ dózisa, továbbá a placeboként használt keményítő vivőanyag

Kezelés napja	Átlagos ttkg	Csoportlétszám	Dózis 1× (g)	Dózis ¼× (g)	Keményítő ½x (g)
1.	0,4	30	0,48	0,12	0,24
2.	0,6	30	0,72	0,18	0,36
3.	0,6	30	0,72	0,18	0,36
4.	0,6	30	0,72	0,18	0,36
5.	0,8	30	0,96	0,24	0,48
6.	0,8	30	0,96	0,24	0,48
7.	0,9	30	1,08	0,27	0,54
8.	0,9	30	1,08	0,27	0,54
9.	1	30	1,2	0,3	0,6
10.	1	30	1,2	0,3	0,6

Az antibiotikum adagolása a gyártó által előírt módon történt, azaz naponta 20 mg amoxicillin/ttkg, ami megfelel 4 g Vetrimoxin (Tolnagro Kft., Szekszárd, Magyarország) 50/100 ttkg-nak. A 4-6. csoport a gyártó által előírt dózist, az első 3 csoport pedig ennek negyedét kapta. A kimért adag (lásd. táblázat) 30 ml steril fiziológiás sóoldatban lett feloldva, majd 1 ml/állat begyszondán keresztül lett minden nap applikálva. A vivőanyag (keményítő) a Vetrimoxin 50%-át adja, ez alapján lett a dózisa kiszámolva. A kezelés kezdetének napján az állatok 21, míg a kezelés utolsó napján 30 naposak voltak. Az utolsó antibiotikum itatás és a mintavételek között 15 nap telt el, tehát ekkor a madarak 45 naposak voltak. Az alkalmazott Vetrimoxin 50 por belsőleges oldathoz A.U.V. élelmezés-egészségügyi várakozási ideje házityúk ehető szövetekre 3 nap.

4.2. Metagenomikai vizsgálatok

A bélsárminták Illumina NextSeq 500 rendszerrel lettek szekvenálva [82]. A DNS kivonása a gyártó protokollja alapján a QIAmp DNS kittel (Qiagen, Németország) történt, a DNS könyvtárak készítése az Illumina Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, USA) használatával történt. A DNS fragmensek egyedi jelöléséhez a Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina, San Diego, USA) indexeket használtuk, végül a minták NovaSeq PE150 platformon lettek szekvenálva [83].

4.3. Bioinformatikai elemzés

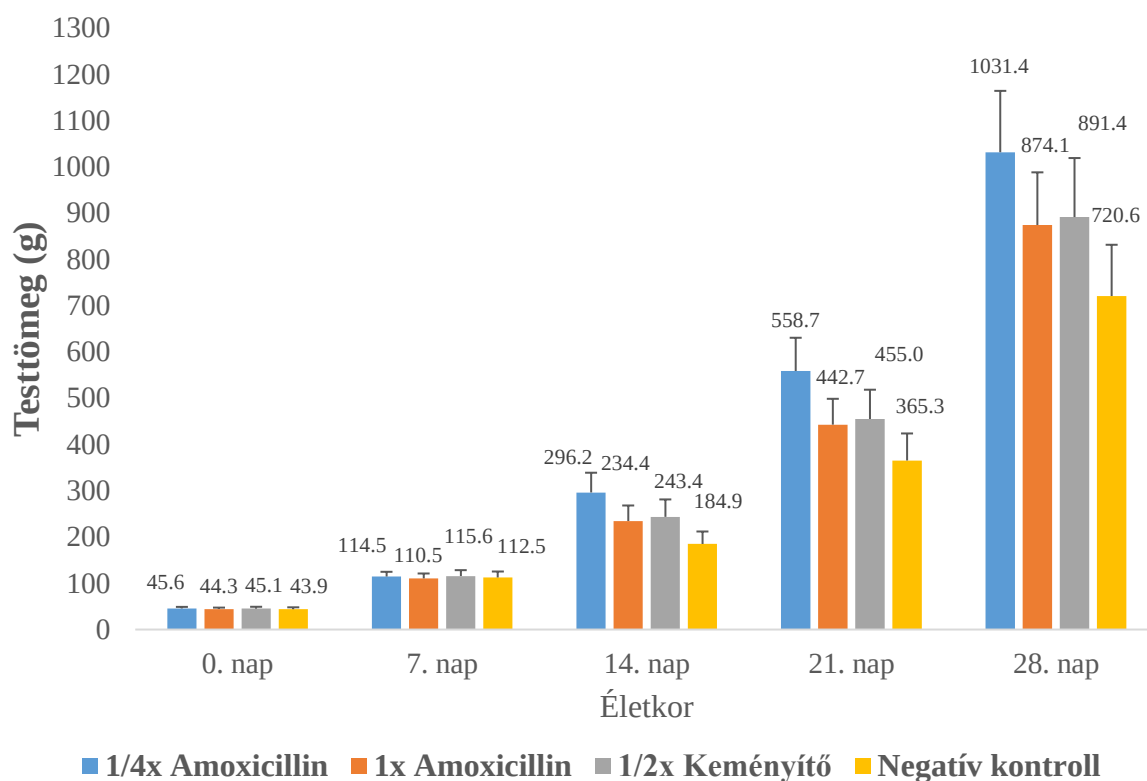
A nyers szekvenciaadatok minőségellenőrzését a FastQC v0.11.9 [84] szoftverrel végeztük. Az érvénytelen szekvenciákat a TrimGalore v0.6.6 [85] segítségével szűrtük ki. A szekvenciákat ezt követően hosszabb szekvenciákká (kontigokká) állítottuk össze a MEGAHIT v1.2.9 [86] szoftver segítségével. A kontigok minőségellenőrzését a QUAST szoftverrel [87] végeztük el. Annak érdekében, hogy kizárjuk a bélrendszeri tartalomban található házityúk genom töredékeket, a szekvenciaolvasatokat a *Gallus gallus* referenciagenomhoz (NCBI azonosító: GRCg6a) igazítottuk a Bowtie2 szoftver [88] használatával. A szekvenciák taxonómiai besorolását a Kraken2 [89] szoftverrel végeztük az NCBI nukleotid adatbázis [90] alapján. Az elemzést R-környezetben [91], a phyloseq [92] és microbiome [93] csomagok használatával végeztük el. A bakteriális eredetű szekvenciákat a metaSPAdes [94] szoftverrel állítottuk össze. A kapott kontigokból az Open Reading Frames (ORFs) meghatározása a Prodigal v2.6.3 [95] szoftver segítségével történt. Az ORF-ek közötti antibiotikum-rezisztencia géneket (ARG) a Resistance Gene Identifier (RGI) v5.1.0 programmal azonosítottuk, összehasonlítva a Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) [96] adatbázissal; csak azok a gének lettek figyelembe véve,

amelyek megfeleltek a CARD által meghatározott STRICT küszöbértéknek, és legalább 95%-os szekvenciaazonosságot és lefedettséget mutattak.

A meghatározott rezisztenciagéneket potenciális mobilitásuk alapján elemeztük a MobileElementFinder v1.0.3 [97] szoftver segítségével, figyelembe véve csak azokat az ARG-kat, amelyek a legnagyobb transzpozon távolságon belül helyezkedtek el az adott mikroorganizmus adatbázisában. A kontigok plazmid eredetét a PlasFlow v1.1 szoftver [98] segítségével vizsgáltuk, míg a gének fágon való kódolását a VirSorter v2.2.2 [99] szoftverrel értékeltük.

5. EREDMÉNYEK

Vizsgáltuk az állatok súlygyarapodásának alakulását (**1. ábra**) hetente történő egyedi súlyméréssel. Azt tapasztaltuk, hogy a kezelések hatására a 14. mérési naptól már jelentős különbségek voltak az egyes csoportok átlagos testtömegei között.



1. ábra Az állatok súlygyarapodásának átlaga kezelési csoportonként, az egyes kezelések szórásával.

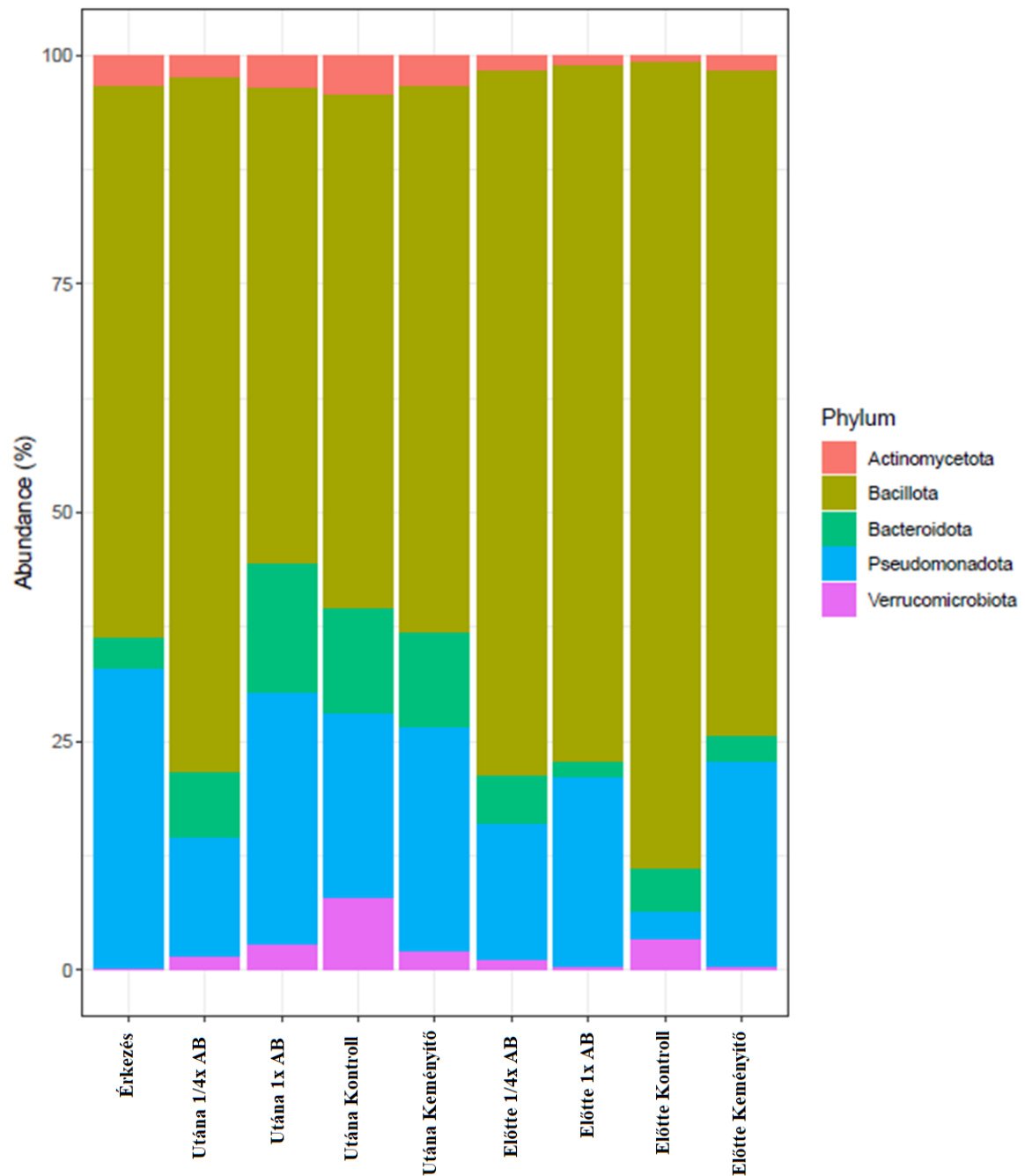
Megvizsgáltuk ANOVA teszt segítségével (**2. táblázat**), hogy van-e szignifikáns különbség az egyes kezelések és a negatív kontroll csoport között. Azt tapasztaltuk, hogy a 14. naptól kezdve az összes kezelés szignifikánsan jobb testtömeg alakulást okozott, a negatív kontroll csoporthoz képest.

2. táblázat Az egyes kezelések és a negatív kontroll csoport adott mérési napokon megfigyelt testtömegek közötti statisztikai vizsgálat ANOVA teszt segítségével.

Kezelés	0. nap	7. nap	14. nap	21. nap	28. nap
1/4× Amoxicillin	0,2890	0,9073	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
1× Amoxicillin	0,9807	0,9152	0,0003*	<0,0001*	<0,0001*
1/2× Keményítő	0,5977	0,7026	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*

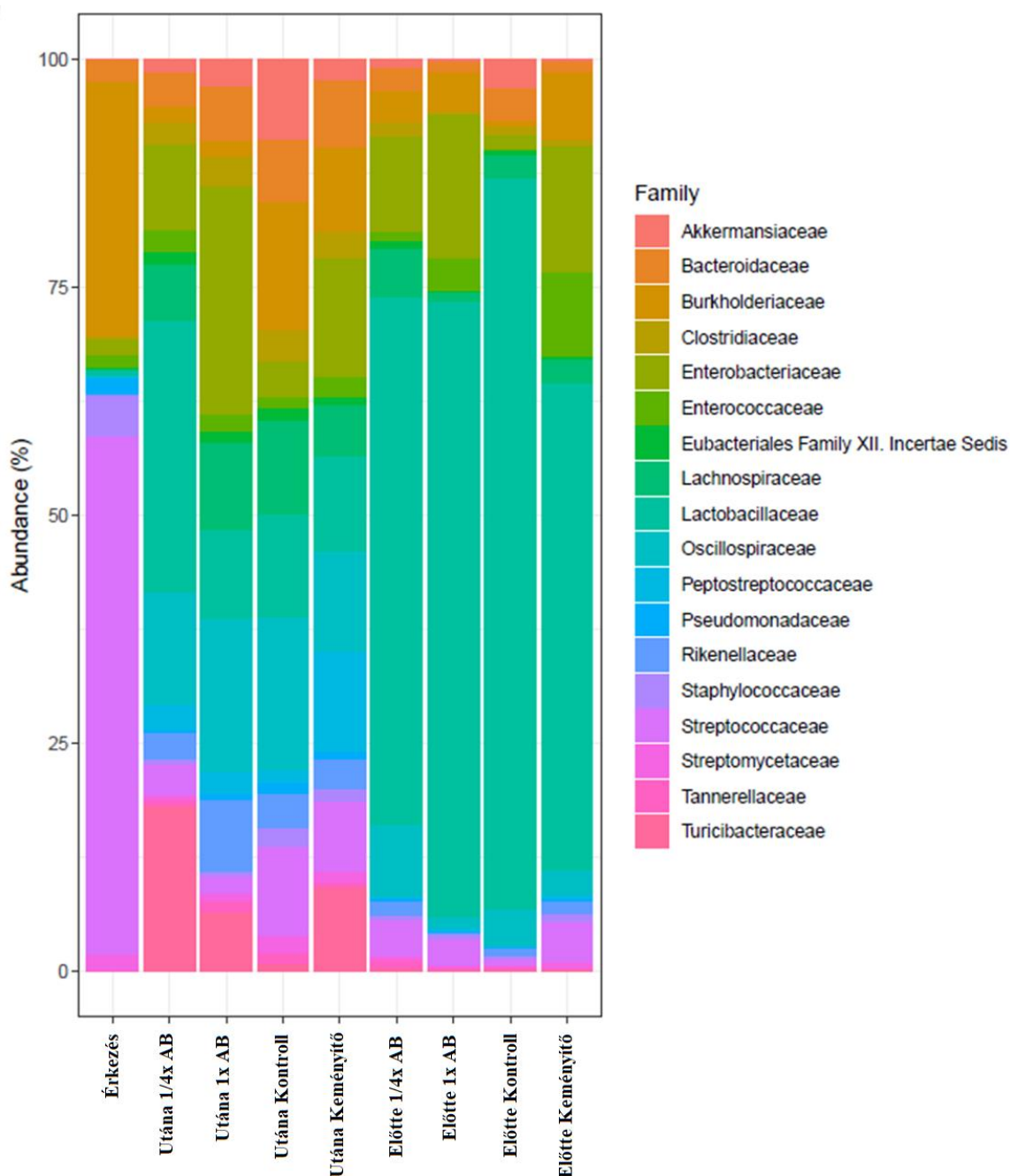
*szignifikáns különbség

A bélsárminták szekvenálását követően megvizsgáltuk az egyes kezelési csoportok esetén bekövetkező változásokat a bélmikrobiom összetételében. Törzs szintjén (2. ábra) minden esetben a Bacillota törzs volt a domináns, ezt követte naposcsibék esetén a Pseudomonadota törzs, aminek az aránya jelentős mértékben lecsökkent az életkor előrehaladtával, viszont az 1/4× amoxicillin dózissal történő kezelés kivételével jelentős mértékben eltolódott a bélmikrobiom összetétele, amely elsősorban a Bacteroidota törzs arányának jelentős növekedését mutatta.



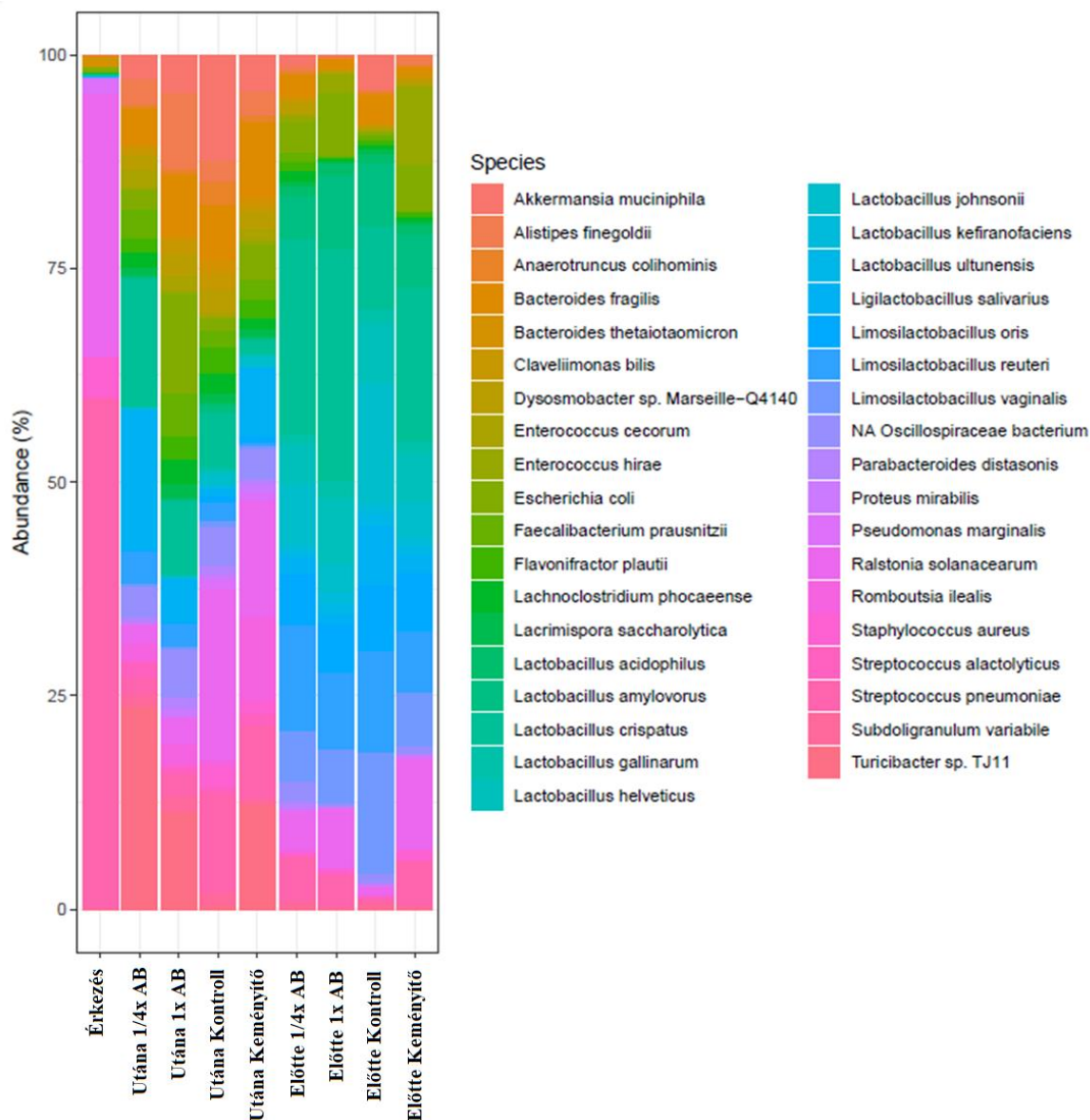
2. ábra Az egyes csoportok bélmikrobiom összetételének változása törzs szintjén, a naposcsibék, a kezelés előtti és kezelés utáni csoportok esetében, 1% abundancia és 10% prevalencia mellett.

Megvizsgáltuk a bélmikrobiom összetételének változását család szintjén is (3. ábra). A naposbaromfi esetén a domináns család a Streptococcaceae volt, majd az életkor előrehaladtával a Lactobacillaceae család vált dominánssá, az 1/4× amoxicillin hatására a Turicibacteraceae család vált dominánssá, az 1× amoxicillin hatására pedig az Enterobacteriaceae család aránya nőtt meg jelentős mértékben.



3. ábra Az egyes csoportok bélmikrobiom összetételének változása család szintjén, a naposcsibék, a kezelés előtti és kezelés utáni csoportok esetében, 1% abundancia és 10% prevalencia mellett.

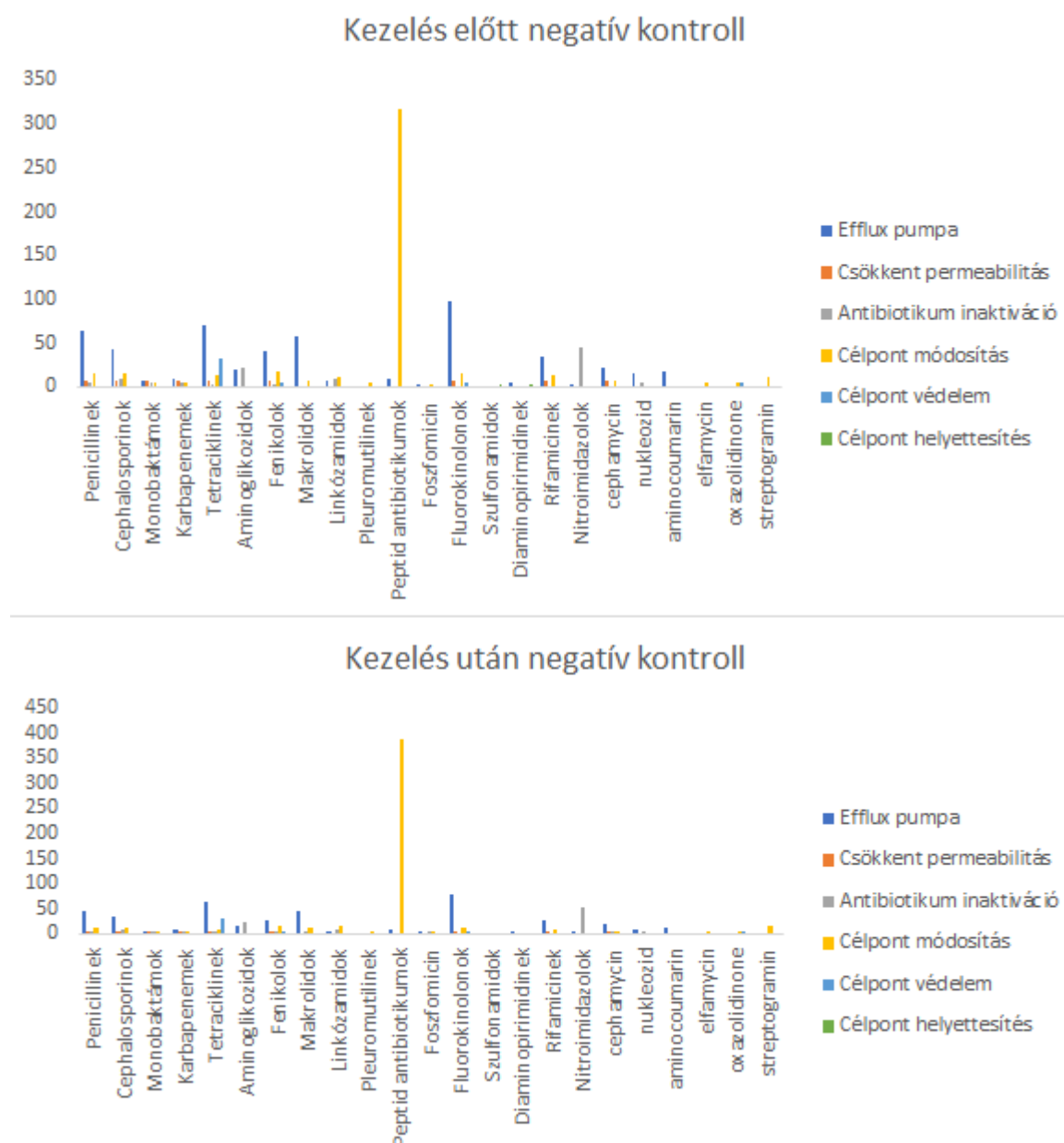
Összehasonlítottuk faj szintjén is, hogy a bélmikrobiom összetételében milyen különbségek vannak az egyes csoportok között (4. ábra). A beérkezett naposcsibék bélmikrobiomja esetén a *Streptococcus* fajok voltak többségben, az életkor előrehaladtával azonban a *Lactobacillus* fajok váltak dominánssá. Az egyes kezelések hatására azonban a *Turicibacter* fajok, a *Subdoligranulum variable* és a *Streptococcus* fajok arányának növekedését figyeltük meg, továbbá az *Akkermansia muciniphila* és az *Alistipes finegoldi* fajok aránya is jelentős mértékben nőtt.



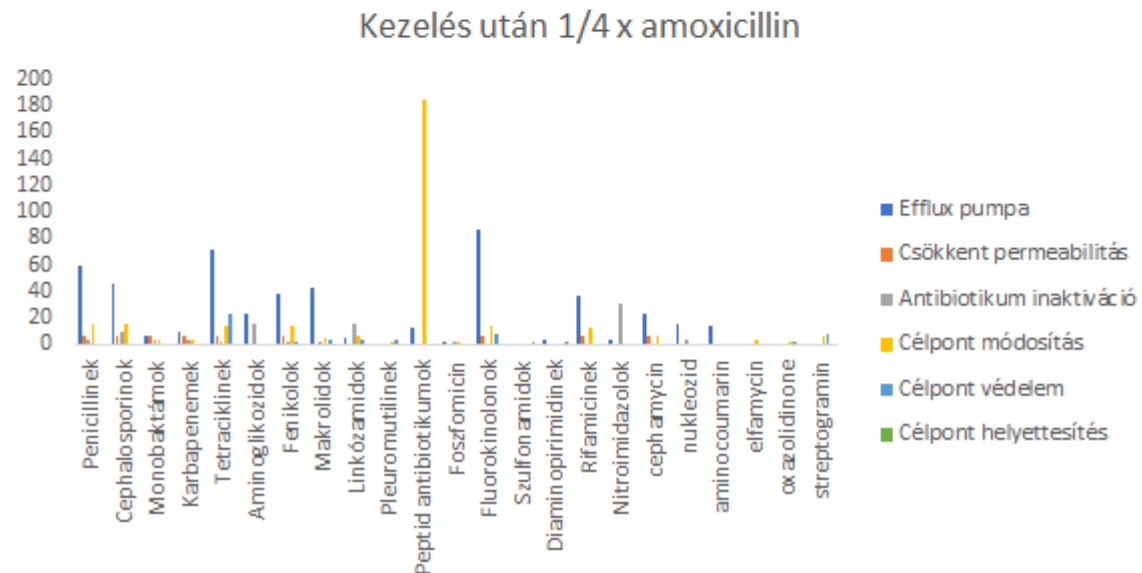
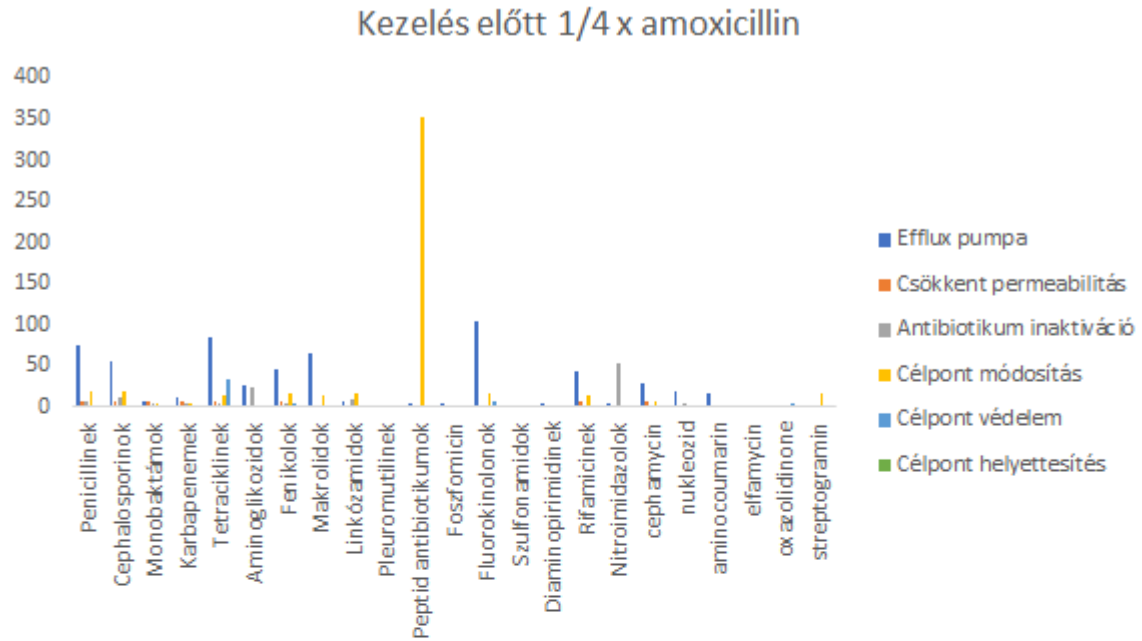
4. ábra Az egyes csoportok bélmikrobiom összetételének változása faj szintjén, a naposcsibék, a kezelés előtti és kezelés utáni csoportok esetében, 1% abundancia és 10% prevalencia mellett.

Ezt követően azonosítottuk a bélsárminták ARG készletét, 90% feletti lefedettséget és azonosságot figyelembe véve. Ez alapján a kezelés előtt összesen 781 ARG-t, a kezelést követően összesen 637 ARG-t azonosítottunk. A hatóanyagokként azonosított

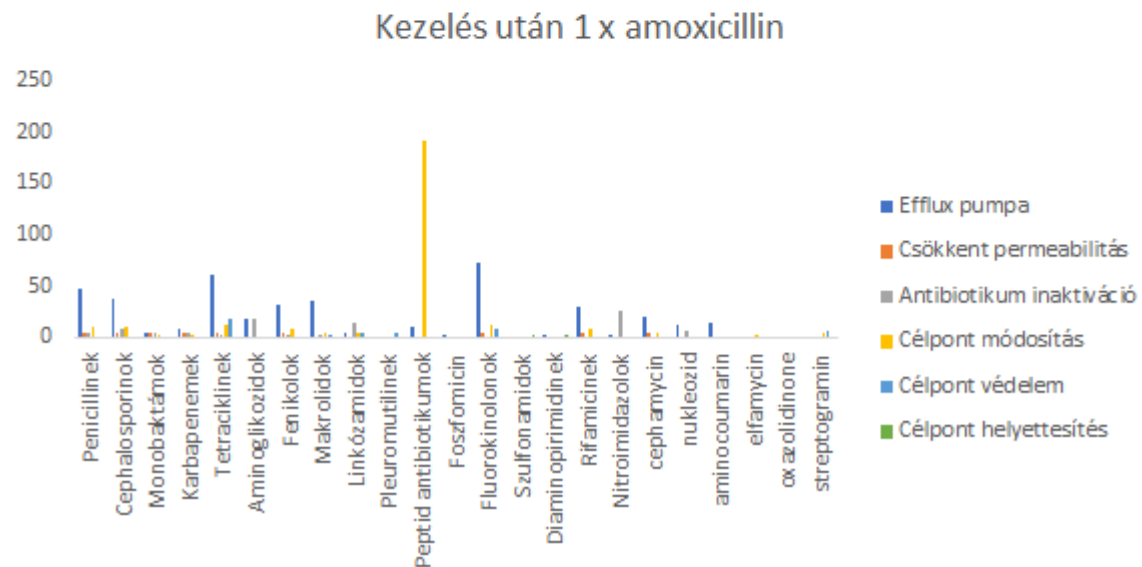
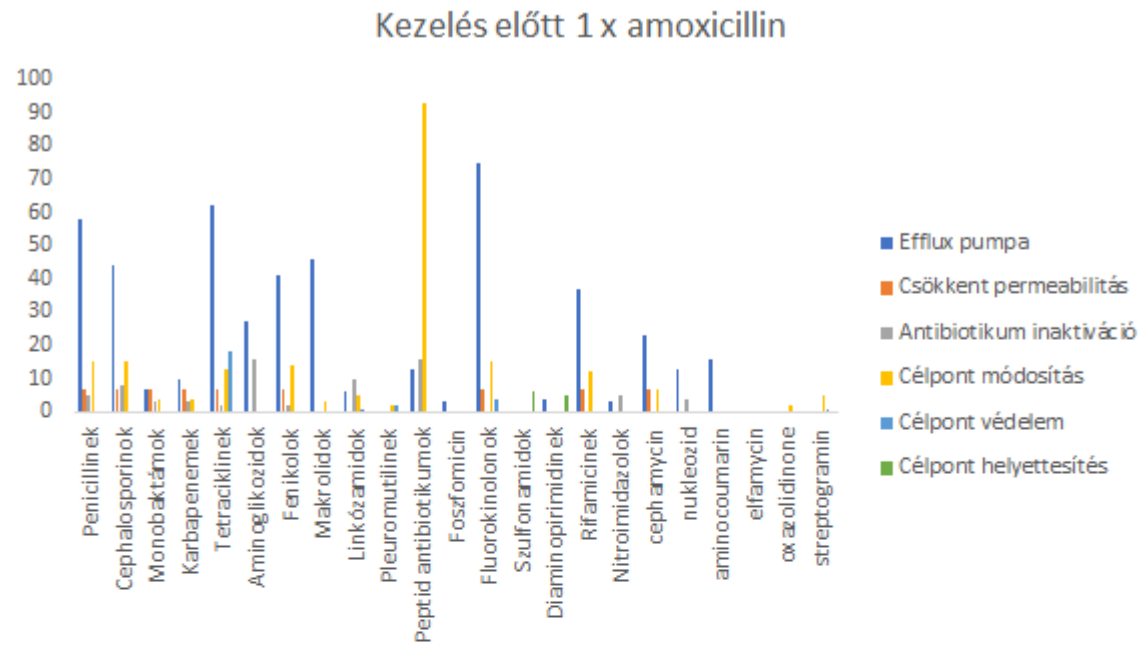
antimikrobiális rezisztencia mechanizmusok a negatív kontroll esetén etetés előtt és etetés után hasonlóan alakultak (5. **ábra**). Az 1/4× amoxicillin etetésének hatására azonban jelentősen beszűkült (6. **ábra**) a génkészlet (1386 génről 1012 génre), ami a bélmikrobiom összetételének változásával magyarázható. Az amoxicillin 1× dózisának etetésére azonban szinte nem változott a génkészlet (7. **ábra**), az 1/2× keményítő hatására kismértékű csökkenést (8. **ábra**) tapasztaltunk (987 génről 896 génre).



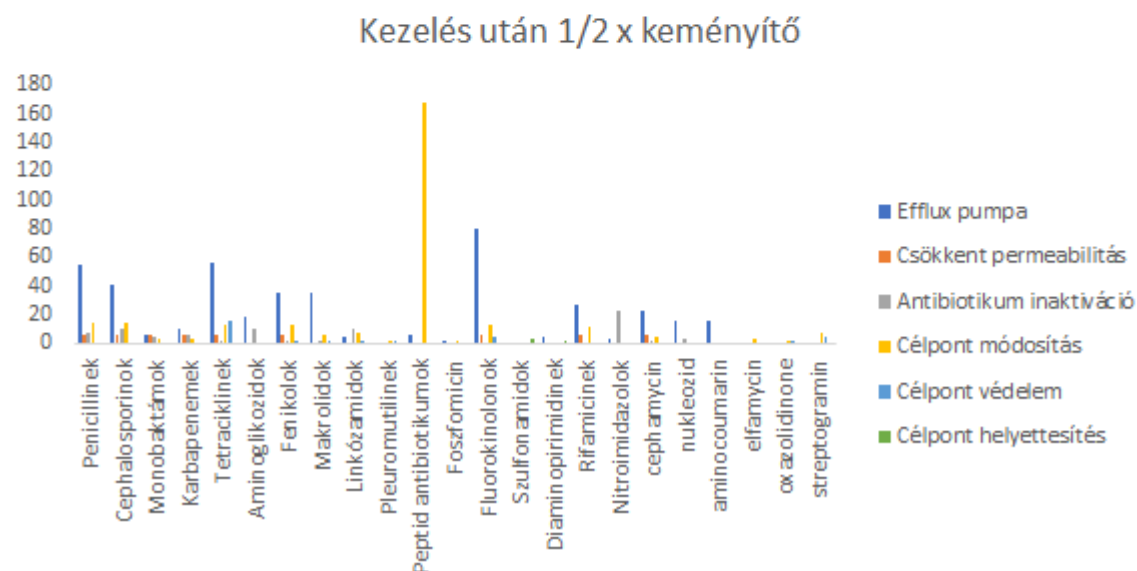
5. **ábra** A negatív kontroll csoportok antimikrobiális génkészlete hatóanyagcsoportok és rezisztencia mechanizmusok szerinti csoportosításban.



6. ábra Az 1/4× amoxicillin dózissal kezelt csoportok antimikrobiális génkészlete hatóanyagcsoportok és rezisztencia mechanizmusok szerinti csoportosításban.



7. ábra Az 1× amoxicillin dózissal kezelt csoportok antimikrobiális génkészlete hatóanyagcsoportok és rezisztencia mechanizmusok szerinti csoportosításban.



8. ábra Az 1/2× keményítő dózissal kezelt csoportok antimikrobiális génkészlete hatóanyagcsoportok és rezisztencia mechanizmusok szerinti csoportosításban.

A gének között azonosítottunk ESBL termelésért felelős gént (*CTX-M-1*), ami az 1/4× amoxicillin hatóanyaggal történő kezelést követően volt kimutatható. A szintén ESBL termelésért felelős génként számontartott *TEM-1* és *TEM-135* típusú géneknek mind a kezelés előtt, mind a kezelést követően az összes csoportban hasonló arányban mutattuk ki az arányát. Számos vankomicin rezisztenciát meghatározó gént azonosítottunk, amelyek mennyisége az 1/4× amoxicillin kezelés hatására jelentős mértékben csökkent, viszont az összes többi csoport esetében az arányuk növekedése volt megfigyelhető.

Megvizsgáltuk azt is, hogy az egyes csoportoknak hogyan alakult a kezelés előtt és után a plazmidon vagy fágon hordozott rezisztencia génkészlete, valamint az MGE aránya (**3. táblázat**). A plazmidon hordozott gének mennyiségében jelentősebb csökkenés az 1/4× amoxicillin dózissal kezelt csoportok esetén volt megfigyelhető, továbbá itt volt a legnagyobb mértékű az MGE mennyiségének a csökkenése is. Az 1/2× keményítővel kezelt csoportok esetén a fágon hordozott ARG-k mennyisége mutatott csökkenést, ugyanakkor a negatív kontroll csoportok esetében viszont növekedést.

3. táblázat A kezelésenként azonosított antimikrobiális génkészletben megfigyelt plazmidon vagy fágon, illetve mobilis genetikai elemként kódolt gének előfordulási gyakorisága, a kezelést megelőzően és után.

Kezelés	1/4× amoxicillin		1× amoxicillin		1/2× keményítő		Negatív kontroll	
	Előtt	Után	Előtt	Után	Előtt	Után	Előtt	Után
Plazmidon	105	66	66	64	59	58	110	89
Fágon	13	13	5	6	12	7	5	17
MGE*	34	19	33	36	31	22	24	27

*MGE – mobilis genetikai elem

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatásunk során baromfira engedélyezett amoxicillin tartalmú készítmény hatását vizsgáltuk a gyártó által előírt 10 napos kezelési idő során, brojlercsirkékkel itatva. A vizsgálat az amoxicillin tört dózisának ($1/4\times$) és normál dózisának ($1\times$), valamint a készítmény vivőanyagának ($1/2\times$ keményítő) súlygyarapodásra, bélmikrobiom összetételre és ezeknek az antimikrobiális génkészlet alakulására gyakorolt hatására terjedt ki. A negatív kontroll csoportokkal összevetve a súlygyarapodás tekintetében szignifikáns különbséget tudtunk kimutatni ($p < 0,0001$) az amoxicillinnel tört vagy teljes dózisban, valamint a keményítővel kezelt csoportokban is, a 14., a 21. és a 28. életnapon mért adatok esetében. Sing és mtsai. brojlercsirkék penicillinnel történő kezelésének eredményeképpen állapítottak meg, hozzánk hasonló szignifikáns súlygyarapodási különbségeket a kontroll csoporthoz viszonyítva [74].

Amennyiben megvizsgáljuk a bélmikrobiom összetételének alakulását törzs szintjén, akkor elmondhatjuk, hogy kezdetben a bélmikrobiomban a Bacillota (korábban Firmicutes) törzs volt a meghatározó (70%), amit a Pseudomonadota (korábban Proteobacteria) törzs követett (21%). A kezelések során az $1/4\times$ dózisban adagolt amoxicillin hatására a Bacillota törzs aránya megnőtt (85%-ra), a Pseudomonadota törzs aránya csökkent (9,25%-ra), az $1\times$ amoxicillin dózis hatására viszont a Bacillota törzs aránya csökkent (59,25%-ra), valamint a Pseudomonadota törzs aránya szintén csökkent (15%-ra). Vizsgáltuk továbbá a készítmény vivőanyagaként használt keményítő készítményben található $1/2\times$ arányban való etetését, aminek hatására jelentős változás nem következett be. Továbbá a negatív kontroll csoportok bélmikrobiom összetétele is hasonlóan alakult a kezelés után, mint a kezelés előtt vett mintákban. Ma és mtsai. Shannon-diverzitás eloszlás vizsgálata során a bélmikrobiom sokféleségben hozzánk hasonló módon a *Firmicutes* és a *Proteobacteria* törzseket találták dominánsnak [100].

A család szintjén a Lactobacillaceae család a kezelések előtt jellemzően 30-40% arányban volt jelen, az életkor előrehaladtával és a kezelések hatására aránya azonban jellemzően 20% alá csökkent. Az általunk megfigyelthez hasonló változás tapasztaltak Wise és Siragusa egy, a brojlercsirkék bakteriális bélflóráját vizsgáló kutatása során is [69].

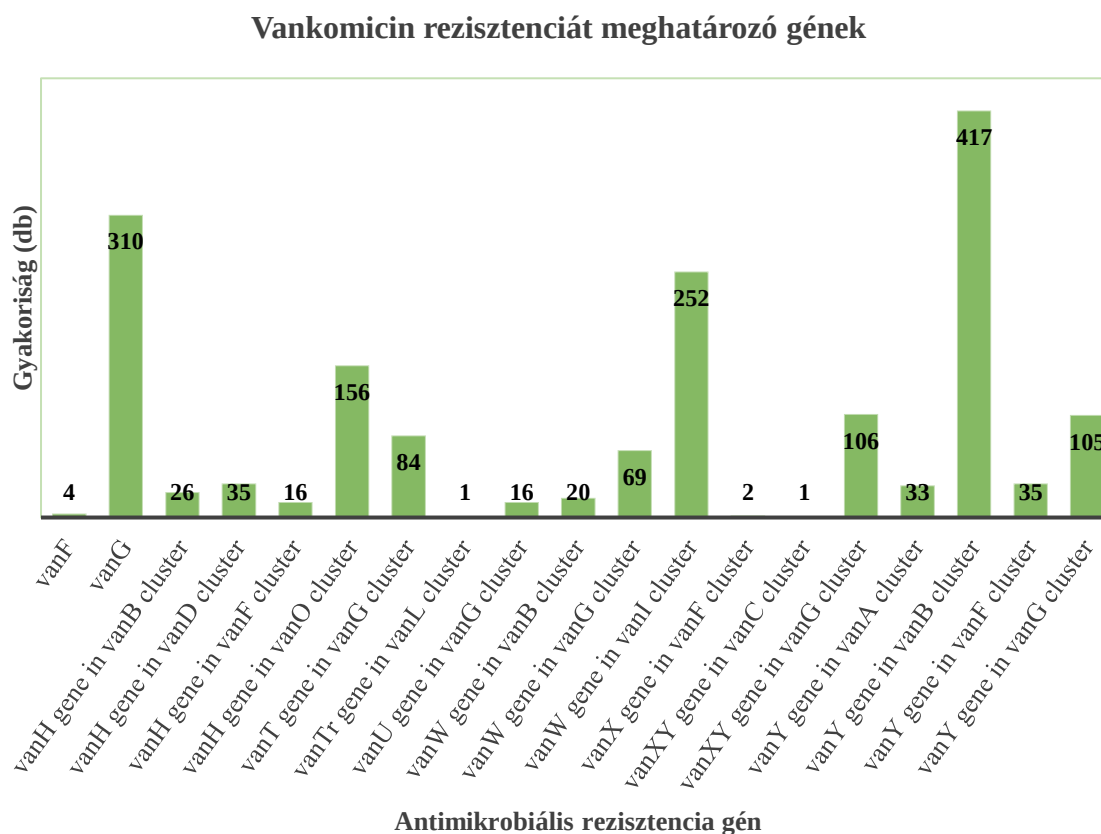
Ami a bélmikrobiom baktériumfaj-összetételét illeti, a napos állatokban a *Streptococcus* fajok, míg az idősebbekben a *Lactobacillus* fajok voltak a legnépesebbek. Az antibiotikummal történő kezelések következtében azonban a *Lactobacillus* fajok aránya csökkent, csak úgy, mint Wise és Siragusa felmérésének esetében is [69]

A bélmikrobiom összességének tekintetében az amoxicillin 1/4× dózisban való itatása jelentős mértékű bélmikrobiom eltolódást okozott, ami az antimikrobiális rezisztencia gén készletének szignifikáns mértékű beszűküléséhez vezetett, ez azonban az 1× dózisban itatott antibiotikum esetében nem volt megfigyelhető. Ugyanakkor a vivőanyagként szolgáló keményítő esetén és a negatív kontroll csoportok esetén is megfigyelhető az ARG készlet csökkenése, mely azonban nem szignifikáns mértékű. A jelentős mennyiségű rezisztencia gén, melyet a kezelések előtt és az amoxicillinnel nem itatott állatok mintáiból a kezelések után azonosítottunk, jól mutatja, hogy az antibiotikum rezisztencia jelen van az antibiotikum használatból eredő szelekciós nyomástól függetlenül is [101]. Ugyanerre a következtetésre jutottak Zhou és mtsai. kutatásuk során [7].

Vizsgálataink során a *TEM-1* és *TEM-135* gének eredete *Escherichia coli* fajra voltak visszavezethetőek, és mindegyik csoport mintáiból kimutatásra kerültek. Hassen és mtsai. egy átfogó vizsgálat során csirkéből származó bélsár és hús minták 25,8%-a esetén írták le a *TEM-1* gén jelenlétét [102]. Egy, a kiterjedt spektrumú β -laktamáz enzimeket vizsgáló kutatás során pedig megállapították, hogy a Gram-negatív baktériumok körében a *TEM-1* a leggyakrabban előforduló enzim ebben a kategóriában [103].

A β -laktamáz túltermelésért felelős *ampC* gén jelenlétét a csoportok 75%-a esetén sikerült kimutatnunk, amely szintén *Escherichia coli* eredetű volt az összes esetben. Tofani és mtsai. kutatása szerint a brojlercsirkék vakbelében nagyságrendileg $10^4/\text{g}$ *Escherichia coli* található, amely kiterjedt spektrumú β -laktamáz (ESBL) vagy *ampC* génnel rendelkezik [58].

Különösen aggasztó a vizsgálataink során azonosított 20-féle vankomicin rezisztenciáért felelős gén igen nagyarányú jelenléte, amelyek számos, a bélmikrobiom részét képező fajban megtalálhatóak voltak és amelyek aránya nem változott a kezelések hatására. Az általunk legnagyobb mennyiségben kimutatott, vankomicin elleni rezisztenciát meghatározó gének a *vanY* a *vanB* klaszterbe, a *vanG*, a *vanW* a *vanI* klaszterbe, a *vanH* a *vanO* klaszterbe, a *vanXY* a *vanG* klaszterbe és a *vanY* a *vanG* klaszterbe tartoztak. Ezek mindegyikét több, mint 100 esetben azonosítottuk (9. ábra). Gousai és mtsai. felmérése során az általuk vizsgált *Enterococcus faecium* minták több, mint 30%-a esetén volt kimutatható *vanA* gén, de nem mutattak ki *vanC*, *vanD*, *vanE* és *vanG* gént [104].



9. ábra A vizsgálat során azonosított vankomicin hatóanyaggal szemben rezisztenciát meghatározó antimikrobiális rezisztencia gének gyakorisága

A β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia mechanizmusok közül a leggyakoribb az efflux pumpát meghatározó gének jelenléte, a második legjelentősebb pedig a célpont módosítás volt az összes csoport esetében, a kezelés előtt és után is. A harmadik helyen már eltérés volt a csoportok között, az $1/4\times$ dózisú amoxicillinnel kezelt csoportok és a negatív kontroll csoportok esetében a csökkent permeabilitás volt a harmadik leggyakoribb mechanizmus, mind a kezelés előtt és után is. Az $1\times$ dózisú amoxicillinnel itatott állatok és a keményítővel kezelt állatok esetében a kezelésekek előtt a csökkent permeabilitás, a kísérlet végén azonban az antibiotikum inaktiváció állt a harmadik helyen. Fernández és mtsai. kutatása szerint a legfőbb β -laktám-rezisztencia mechanizmus az antibiotikum inaktiváció, valamint a célpont módosítás [4].

Összességében elmondhatjuk, hogy vizsgálataink az antibiotikumok bélmikrobiom összetételére gyakorolt szelekciós nyomását tükrözik, ami nagymértékben meghatározza az antimikrobiális génkészlet alakulását. A jövőben érdemes hasonló, több antibiotikum hatóanyaggal végzett kísérletet végezni és nagyobb mintaelemszámot bevonni az új generációs szekvenálással történő vizsgálatba.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjaink egyik meghatározó szemlélete az állat- és közegészségügyet összekötő Egy Egészség koncepció, amely szorosan kapcsolódik az antimikrobiális rezisztencia globális terjedéséhez. Különösen nagy jelentőséggel bír az antibiotikumok takarmányon vagy ivóvízen keresztül történő alkalmazása, mivel az ezek által okozott szelekciós nyomás nemcsak a bélmikrobiom összetételét, hanem annak antimikrobiális rezisztencia génkészletét is megváltoztatja. Célkitűzésünk az volt, hogy megvizsgáljuk a háziatyúk számára engedélyezett amoxicillin hatóanyag tört dózisának ($1/4\times$) és terápiás dózisának ($1\times$) hatását konvencionális körülmények között az állatok súlygyarapodására, a bélmikrobiom összetételére, valamint az antimikrobiális rezisztencia génkészletére.

A kezelések a 14. naptól kezdődően szignifikánsan jobb súlygyarapodást eredményeztek a negatív kontrollcsoporthoz képest. A bélmikrobiom összetételében minden esetben a *Bacillota* törzs dominált, amit a *Pseudomonadota* törzs követett, de törzsszinten jelentős változás nem történt a kezelések hatására. Családszinten viszont megfigyeltük, hogy az életkor előrehaladtával a *Lactobacillaceae* család vált meghatározóvá, és ezen a szinten a kezelések már szignifikáns összetételbeli változást eredményeztek. Az $1/4\times$ amoxicillin dózis hatására a *Turibacteriaceae* család vált dominánssá, míg az $1\times$ dózis az *Enterobacteriaceae* család túlsúlyát eredményezte.

Összesen 781 antimikrobiális rezisztencia gént azonosítottunk a kezelést megelőzően, amely a kezelést követően 637-re csökkent. Az antibiotikum-hatóanyag csoportokkal szembeni rezisztenciamechanizmusokban is jelentős változásokat tapasztaltunk az egyes kezelések hatására, ez a negatív kontrollcsoport esetében nem volt megfigyelhető. A kiterjedt spektrumú béta-laktamáz gének közül egy *CTX-M-1* gént tudtunk kimutatni az $1/4\times$ amoxicillin dózissal történő kezelés után, míg a *TEM-1* és *TEM-135* típusú gének a kezelés előtt és után is hasonló arányban fordultak elő. A plazmidon hordozott gének aránya, valamint a mobilis genetikai elemek előfordulása jelentős csökkenést mutatott az $1/4\times$ amoxicillin dózis hatására.

Összességében elmondhatjuk, hogy vizsgálataink alapján az amoxicillin dózisa jelentősen befolyásolja az antimikrobiális rezisztencia génkészlet alakulását, amely szoros összefüggésben áll az antibiotikum bélmikrobiomra gyakorolt szelekciós nyomásával. A jövőben érdemes további hatóanyagok bevonásával folytatni az ilyen vizsgálatokat, mivel az így kapott eredmények hozzájárulhatnak az antimikrobiális rezisztencia terjedésének átfogóbb megértéséhez.

8. SUMMARY

One of the defining perspectives of our time in veterinary and public health is the One Health concept, which is closely linked to the widespread dissemination of antimicrobial resistance. The use of antibiotics through feed or drinking water is particularly significant, as the resulting selective pressure not only alters the composition of the gut microbiome but also its antimicrobial resistance gene pool.

Our aim was to investigate the effect of amoxicillin, authorized for use in chickens, administered at a reduced dose (1/4×) and at a therapeutic dose (1×), under conventional conditions, on the weight gain of the animals, the composition of the gut microbiome, and the antimicrobial resistance gene pool.

From day 14, the treatments resulted in significantly better weight gain compared to the negative control group. In terms of gut microbiome composition, the Bacillota phylum was dominant in all cases, followed by the Pseudomonadota phylum, with no significant changes at the phylum level due to the treatments. However, at the family level, we observed that with age, the Lactobacillaceae family became predominant, and at this level, the treatments led to significant compositional changes. The 1/4× amoxicillin dose resulted in the dominance of the Turibacteriaceae family, while the 1× amoxicillin dose led to an overrepresentation of the Enterobacteriaceae family.

A total of 781 antimicrobial resistance genes were identified before treatment, which decreased to 637 after treatment. Significant changes in resistance mechanisms against different antibiotic classes were also observed after treatment, except in the negative control group. Among the extended-spectrum beta-lactamase genes, we detected the presence of a *CTX-M-1* gene after the 1/4x amoxicillin treatment, while the *TEM-1* and *TEM-135* genes were found in similar proportions before and after the treatments. The proportion of plasmid-borne genes, as well as mobile genetic elements, showed a significant decrease after the 1/4x amoxicillin treatment.

In summary, our findings indicate that the dose of amoxicillin significantly influences the composition of the antimicrobial resistance gene pool, which is likely linked to the selective pressure exerted by the antibiotic on the gut microbiome. In the future, it would be worthwhile to include additional active substances in similar studies, as the results obtained may contribute to a more comprehensive understanding of the spread of antimicrobial resistance.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Christaki E, Marcou M, Tofarides A (2020) Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol* 88:26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
2. Lee J-H (2019) Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population. *J Microbiol* 57:181–184. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-0718-8>
3. Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS (2020) Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep* 21:e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
4. Fernández L, Breidenstein EBM, Hancock REW (2011) Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates* 14:1–21. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.01.001>
5. Zhu Y, Huang WE, Yang Q (2022) Clinical Perspective of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *IDR Volume* 15:735–746. <https://doi.org/10.2147/IDR.S345574>
6. Spohn R (2019) A bakteriális antibiotikum rezisztencia de novo evolúciója és járulékos következményei. PhD, Szegedi Tudományegyetem
7. Zhou W, Wang Y, Lin J (2012) Functional cloning and characterization of antibiotic resistance genes from the chicken gut microbiome. *Appl Environ Microbiol* 78:3028–3032. <https://doi.org/10.1128/AEM.06920-11>
8. Lal Gupta C, Kumar Tiwari R, Cytryn E (2020) Platforms for elucidating antibiotic resistance in single genomes and complex metagenomes. *Environ Int* 138:105667. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105667>
9. Hu Y, Yang X, Li J, Lv N, Liu F, Wu J, Lin IYC, Wu N, Weimer BC, Gao GF, Liu Y, Zhu B (2016) The Bacterial Mobile Resistome Transfer Network Connecting the Animal and Human Microbiomes. *Applied and Environmental Microbiology* 82:6672–6681. <https://doi.org/10.1128/AEM.01802-16>
10. Oladeinde A, Cook K, Lakin SM, Woyda R, Abdo Z, Looft T, Herrington K, Zock G, Lawrence JP, Thomas JC, Beaudry MS, Glenn T (2019) Horizontal Gene Transfer and Acquired Antibiotic Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg following In Vitro Incubation in Broiler Ceca. *Appl Environ Microbiol* 85:e01903-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01903-19>
11. Samarth DP, Kwon YM (2020) Horizontal genetic exchange of chromosomally encoded markers between *Campylobacter jejuni* cells. *PLoS One* 15:e0241058. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241058>
12. Oladeinde A, Abdo Z, Press MO, Cook K, Cox NA, Zwirzitz B, Woyda R, Lakin SM, Thomas JC, Looft T, Cosby DE, Hinton A, Guard J, Line E, Rothrock MJ, Berrang ME, Herrington K, Zock G, Plumblee Lawrence J, Cudnik D, House S, Ingram K, Lariscy L, Wagner M, Aggrey SE, Chai L, Ritz C (2021) Horizontal Gene Transfer Is the Main Driver of Antimicrobial Resistance in Broiler Chicks Infected with *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg. *mSystems* 6:e0072921. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00729-21>
13. Jiménez-Belenguer A, Doménech E, Villagrà A, Fenollar A, Ferrús MA (2016) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated in newly-hatched chickens and effect of amoxicillin treatment during their growth. *Avian Pathology* 45:501–507. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1168515>
14. Card RM, Cawthraw SA, Nunez-Garcia J, Ellis RJ, Kay G, Pallen MJ, Woodward MJ, Anjum MF (2017) An In Vitro Chicken Gut Model Demonstrates Transfer of a Multidrug Resistance Plasmid from *Salmonella* to Commensal *Escherichia coli*. *mBio* 8:e00777-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00777-17>

15. Marshall BM, Levy SB (2011) Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews* 24:718–733. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>
16. Dhanani AS, Block G, Dewar K, Forgetta V, Topp E, Beiko RG, Diarra MS (2015) Genomic Comparison of Non-Typhoidal Salmonella enterica Serovars Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar and Kentucky Isolates from Broiler Chickens. *PLoS One* 10:e0128773. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128773>
17. Bombaywala S, Purohit HJ, Dafale NA (2021) Mobility of antibiotic resistance and its co-occurrence with metal resistance in pathogens under oxidative stress. *J Environ Manage* 297:113315. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113315>
18. Rochegüe T, Haenni M, Mondot S, Astruc C, Cazeau G, Ferry T, Madec J-Y, Lupo A (2021) Impact of Antibiotic Therapies on Resistance Genes Dynamic and Composition of the Animal Gut Microbiota. *Animals (Basel)* 11:3280. <https://doi.org/10.3390/ani11113280>
19. Hegde NV, Kariyawasam S, DebRoy C (2016) Comparison of antimicrobial resistant genes in chicken gut microbiome grown on organic and conventional diet. *Vet Anim Sci* 1–2:9–14. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2016.07.001>
20. Marosevic D, Cervinkova D, Vlkova H, Videnska P, Babak V, Jaglic Z (2014) In vivo spread of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLSB) resistance--a model study in chickens. *Vet Microbiol* 171:388–396. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.017>
21. Xu Y, Huang Y, Guo L, Zhang S, Wu R, Fang X, Xu H, Nie Q (2022) Metagenomic analysis reveals the microbiome and antibiotic resistance genes in indigenous Chinese yellow-feathered chickens. *Front Microbiol* 13:930289. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.930289>
22. Lee J-Y, Han GG, Lee H-B, Lee S-M, Kang S-K, Jin G-D, Park J, Chae BJ, Choi YH, Kim EB, Choi Y-J (2017) Prohibition of antibiotic growth promoters has affected the genomic profiles of *Lactobacillus salivarius* inhabiting the swine intestine. *PLoS One* 12:e0186671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186671>
23. Paul SS, Rama Rao SV, Hegde N, Williams NJ, Chatterjee RN, Raju MVLN, Reddy GN, Kumar V, Phani Kumar PS, Mallick S, Gargi M (2022) Effects of Dietary Antimicrobial Growth Promoters on Performance Parameters and Abundance and Diversity of Broiler Chicken Gut Microbiome and Selection of Antibiotic Resistance Genes. *Front Microbiol* 13:905050. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.905050>
24. Li J, Hao H, Dai M, Zhang H, Ning J, Cheng G, Shabbir MAB, Sajid A, Yuan Z (2019) Resistance and Virulence Mechanisms of *Escherichia coli* Selected by Enrofloxacin in Chicken. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e01824-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01824-18>
25. Battah B (2021) Emerging of bacterial resistance: an ongoing threat during and after the Syrian crisis. *The Journal of Infection in Developing Countries* 15:179–184. <https://doi.org/10.3855/jidc.13807>
26. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report: 2022. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240062702>. Accessed 19 May 2024
27. Data on antimicrobial resistance. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/ip_22_6951. Accessed 16 Apr 2023
28. Giono-Cerezo S, Santos-Preciado JI, Morfín-Otero M del R, Torres-López FJ, Alcántar-Curiel MD (2023) Antimicrobial resistance. Its importance and efforts to control it. *GMM* 156:3934. <https://doi.org/10.24875/GMM.M20000358>

29. O'Neill J (2014) Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. London
30. Xing S-C, Chen J-Y, Cai Y-F, Huang C-B, Liao X-D, Mi J-D (2021) *Bacillus coagulans* R11 consumption influenced the abundances of cecum antibiotic resistance genes in lead-exposed laying hens. *Environ Pollut* 274:116562. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116562>
31. Maciel-Guerra A, Baker M, Hu Y, Wang W, Zhang X, Rong J, Zhang Y, Zhang J, Kaler J, Renney D, Loose M, Emes RD, Liu L, Chen J, Peng Z, Li F, Dottorini T (2023) Dissecting microbial communities and resistomes for interconnected humans, soil, and livestock. *ISME J* 17:21–35. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01315-7>
32. Brogdon JM, Sié A, Dah C, Ouermi L, Coulibaly B, Lebas E, Zhong L, Chen C, Lietman TM, Keenan JD, Doan T, Oldenburg CE (2021) Poultry Ownership and Genetic Antibiotic Resistance Determinants in the Gut of Preschool Children. *Am J Trop Med Hyg* 104:1768–1770. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1384>
33. Murray M, Salvatierra G, Dávila-Barclay A, Ayzanoa B, Castillo-Vilcahuaman C, Huang M, Pajuelo MJ, Lescano AG, Cabrera L, Calderón M, Berg DE, Gilman RH, Tsukayama P (2021) Market Chickens as a Source of Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in a Peri-Urban Community in Lima, Peru. *Front Microbiol* 12:635871. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.635871>
34. Wang Y, Lyu N, Liu F, Liu WJ, Bi Y, Zhang Z, Ma S, Cao J, Song X, Wang A, Zhang G, Hu Y, Zhu B, Gao GF (2021) More diversified antibiotic resistance genes in chickens and workers of the live poultry markets. *Environ Int* 153:106534. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106534>
35. Qiu T, Wu D, Zhang L, Zou D, Sun Y, Gao M, Wang X (2021) A comparison of antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community in broiler and layer manure following composting. *Environ Sci Pollut Res Int* 28:14707–14719. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11469-6>
36. Facciola A, Virga A, Giofrè ME, Laganà P (2021) Evaluation of Antibiotic Resistance in Bacterial Strains Isolated from Sewage of Slaughterhouses Located in Sicily (Italy). *Int J Environ Res Public Health* 18:9611. <https://doi.org/10.3390/ijerph18189611>
37. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes - Riesenfeld - 2004 - Environmental Microbiology - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2004.00664.x?sid=nlm%3Apubmed>. Accessed 17 Mar 2024
38. Woyda R, Oladeinde A, Abdo Z (2023) Chicken Production and Human Clinical *Escherichia coli* Isolates Differ in Their Carriage of Antimicrobial Resistance and Virulence Factors. *Appl Environ Microbiol* 89:e01167-22. <https://doi.org/10.1128/aem.01167-22>
39. Gautron J, Dombre C, Nau F, Feidt C, Guillier L (2022) Review: Production factors affecting the quality of chicken table eggs and egg products in Europe. *Animal* 16:100425. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100425>
40. Bahri SIS, Ariffin AS, Mohtar S (2019) Critical Review on Food Security in Malaysia for Broiler Industry. *IJARBSS* 9:Pages 869-876. <https://doi.org/10.6007/IJARBSS/v9-i7/6186>
41. (2020) Meat Market Review - Emerging trends and outlook
42. Estévez-Moreno LX, Miranda-de La Lama GC (2022) Meat consumption and consumer attitudes in México: Can persistence lead to change? *Meat Science* 193:108943. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2022.108943>

43. Devi SM, Balachandar V, Lee SI, Kim IH (2014) An Outline of Meat Consumption in the Indian Population - A Pilot Review. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 34:507–515. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2014.34.4.507>
44. (2023) The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021. *EFSA J* 21:e07867. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7867>
45. Ayeni FA, Odumosu BT, Oluseyi AE, Ruppitsch W (2016) Identification and prevalence of tetracycline resistance in enterococci isolated from poultry in Ilishan, Ogun State, Nigeria. *J Pharm Bioallied Sci* 8:69–73. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.171729>
46. Lutsar I, Friedland IR (2000) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cephalosporins in Cerebrospinal Fluid. *Clin Pharmacokinet* 39:335–343. <https://doi.org/10.2165/00003088-200039050-00003>
47. Scott HM, Acuff G, Bergeron G, Bourassa MW, Gill J, Graham DW, Kahn LH, Morley PS, Salois MJ, Simjee S, Singer RS, Smith TC, Storrs C, Wittum TE (2019) Critically important antibiotics: criteria and approaches for measuring and reducing their use in food animal agriculture. *Ann N Y Acad Sci* 1441:8–16. <https://doi.org/10.1111/nyas.14058>
48. Schmerold I, van Geijlswijk I, Gehring R (2023) European regulations on the use of antibiotics in veterinary medicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 189:106473. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106473>
49. Jones-Dias D, Clemente L, Moura IB, Sampaio DA, Albuquerque T, Vieira L, Manageiro V, Caniça M (2016) Draft Genomic Analysis of an Avian Multidrug Resistant *Morganella morganii* Isolate Carrying qnrD1. *Front Microbiol* 7:1660. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01660>
50. Persoons D, Haesebrouck F, Smet A, Herman L, Heyndrickx M, Martel A, Catry B, Berge AC, Butaye P, Dewulf J (2011) Risk factors for ceftiofur resistance in *Escherichia coli* from Belgian broilers. *Epidemiol Infect* 139:765–771. <https://doi.org/10.1017/S0950268810001524>
51. Börjesson S, Bengtsson B, Jernberg C, Englund S (2013) Spread of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates in Swedish broilers mediated by an *incl* plasmid carrying bla(CTX-M-1). *Acta Vet Scand* 55:3. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-3>
52. Lambrecht E, Van Coillie E, Van Meervenne E, Boon N, Heyndrickx M, Van de Wiele T (2019) Commensal *E. coli* rapidly transfer antibiotic resistance genes to human intestinal microbiota in the Mucosal Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (M-SHIME). *Int J Food Microbiol* 311:108357. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108357>
53. Suzuki K, Yossapol M, Sugiyama M, Asai T (2019) Effects of Antimicrobial Administration on the Prevalence of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* in Broiler Flocks. *Jpn J Infect Dis* 72:179–184. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2018.277>
54. Moser AI, Kuenzli E, Campos-Madueno EI, Büdel T, Rattanavong S, Vongsouvath M, Hatz C, Endimiani A (2021) Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Strains and Their Plasmids in People, Poultry, and Chicken Meat in Laos. *Front Microbiol* 12:708182. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.708182>
55. Deblais L, Kathayat D, Helmy YA, Closs G, Rajashekara G (2020) Translating “big data”: better understanding of host-pathogen interactions to control bacterial foodborne pathogens in poultry. *Anim Health Res Rev* 21:15–35. <https://doi.org/10.1017/S1466252319000124>

56. Timmermans M, Wattiau P, Denis O, Boland C (2021) Colistin resistance genes *mcr*-1 to *mcr*-5, including a case of triple occurrence (*mcr*-1, -3 and -5), in *Escherichia coli* isolates from faeces of healthy pigs, cattle and poultry in Belgium, 2012-2016. *Int J Antimicrob Agents* 57:106350. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106350>
57. Afridi OK, Ali J, Chang JH (2020) Next-Generation Sequencing Based Gut Resistome Profiling of Broiler Chickens Infected with Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. *Animals (Basel)* 10:2350. <https://doi.org/10.3390/ani10122350>
58. Tofani S, Albini E, Blasi F, Cucco L, Lovito C, Maresca C, Pesciaroli M, Orsini S, Scoccia E, Pezzotti G, Magistrali CF, Massacci FR (2022) Assessing the Load, Virulence and Antibiotic-Resistant Traits of ESBL/Ampc *E. coli* from Broilers Raised on Conventional, Antibiotic-Free, and Organic Farms. *Antibiotics (Basel)* 11:1484. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111484>
59. Jiang H-X, Lü D-H, Chen Z-L, Wang X-M, Chen J-R, Liu Y-H, Liao X-P, Liu J-H, Zeng Z-L (2011) High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China. *Vet J* 187:99–103. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.10.017>
60. Gundran RS, Cardenio PA, Villanueva MA, Sison FB, Benigno CC, Kreausukon K, Pichpol D, Punyapornwithaya V (2019) Prevalence and distribution of blaCTX-M, blaSHV, blaTEM genes in extended- spectrum β - lactamase- producing *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. *BMC Vet Res* 15:227. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1975-9>
61. Ding Y, Zwe YH, Chin SF, Kohli GS, Drautz-Moses DI, Givskov M, Schlundt J, Schuster SC, Yuk H-G, Yang L (2018) Characterization of a novel multidrug resistance plasmid pSGB23 isolated from *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Saintpaul. *Gut Pathog* 10:20. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0249-6>
62. Carvalheira A, Casquete R, Silva J, Teixeira P (2017) Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* spp. isolated from meat. *Int J Food Microbiol* 243:58–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.001>
63. Dos Santos Bersot L, Carbonera NR, Rodrigues Valcanaia CD, Viana C, Nero LA (2021) Multidrug-Resistant and Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Salmonella enterica* Serotype Heidelberg Is Widespread in a Poultry Processing Facility in Southern Brazil. *J Food Prot* 84:2053–2058. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-140>
64. Hu Y, He Y, Wang Y, Cui S, Chen Q, Liu G, Chen Q, Zhou G, Yang B, Huang J, Yu H, Li F (2015) [Epidemic condition and molecular subtyping of ciprofloxacin and cefotaxime co-resistant *Salmonella* Indiana isolated from retail chicken carcasses in six provinces, China]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* 49:716–721
65. Aruwa CE, Pillay C, Nyaga MM, Sabiu S (2021) Poultry gut health - microbiome functions, environmental impacts, microbiome engineering and advancements in characterization technologies. *J Anim Sci Biotechnol* 12:119. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00640-9>
66. Montoro-Dasi L, Villagra A, de Toro M, Pérez-Gracia MT, Vega S, Marin C (2021) Assessment of Microbiota Modulation in Poultry to Combat Infectious Diseases. *Animals (Basel)* 11:615. <https://doi.org/10.3390/ani11030615>
67. Huang P, Zhang Y, Xiao K, Jiang F, Wang H, Tang D, Liu D, Liu B, Liu Y, He X, Liu H, Liu X, Qing Z, Liu C, Huang J, Ren Y, Yun L, Yin L, Lin Q, Zeng C, Su X, Yuan J, Lin L, Hu N, Cao H, Huang S, Guo Y, Fan W, Zeng J (2018) The chicken gut metagenome and the modulatory effects of plant-derived benzyloquinoline alkaloids. *Microbiome* 6:211. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0590-5>

68. Han GG, Kim EB, Lee J, Lee J-Y, Jin G, Park J, Huh C-S, Kwon I-K, Kil DY, Choi Y-J, Kong C (2016) Relationship between the microbiota in different sections of the gastrointestinal tract, and the body weight of broiler chickens. *SpringerPlus* 5:911. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2604-8>
69. Wise MG, Siragusa GR (2007) Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *J Appl Microbiol* 102:1138–1149. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03153.x>
70. Rashid Z, Yousaf MZ, Gilani SMH, Zehra S, Ali A, Azhar A, Galani S (2021) Comparative analysis of chicken cecal microbial diversity and taxonomic composition in response to dietary variation using 16S rRNA amplicon sequencing. *Mol Biol Rep* 48:7203–7214. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06712-3>
71. Ferrario C, Alessandri G, Mancabelli L, Gering E, Mangifesta M, Milani C, Lugli GA, Viappiani A, Duranti S, Turroni F, Ossiprandi MC, Hiyashi R, Mackie R, van Sinderen D, Ventura M (2017) Untangling the cecal microbiota of feral chickens by culturomic and metagenomic analyses. *Environ Microbiol* 19:4771–4783. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13943>
72. El Hage R, El Rayess Y, Bonifait L, El Hafi B, Baugé L, Viscogliosi E, Hamze M, Mathieu F, Matar GM, Chemaly M (2022) A national study through a “Farm-to-fork” Approach to determine *Salmonella* dissemination along with the Lebanese poultry production chain. *Zoonoses Public Health* 69:499–513. <https://doi.org/10.1111/zph.12939>
73. Van Goor A, Redweik GAJ, Stromberg ZR, Treadwell CG, Xin H, Mellata M (2020) Microbiome and biological blood marker changes in hens at different laying stages in conventional and cage free housings. *Poult Sci* 99:2362–2374. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.01.011>
74. Singh P, Karimi A, Devendra K, Waldroup PW, Cho KK, Kwon YM (2013) Influence of penicillin on microbial diversity of the cecal microbiota in broiler chickens. *Poult Sci* 92:272–276. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02603>
75. Van Boeckel TP, Pires J, Silvester R, Zhao C, Song J, Criscuolo NG, Gilbert M, Bonhoeffer S, Laxminarayan R (2019) Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science* 365:eaaw1944. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1944>
76. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
77. Lee A, Bortoluzzi C, Pilla R, Kogut MH (2020) A Role for the Microbiota in the Immune Phenotype Alteration Associated with the Induction of Disease Tolerance and Persistent Asymptomatic Infection of *Salmonella* in the Chicken. *Microorganisms* 8:1879. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121879>
78. Chowdhury S, Fournié G, Blake D, Henning J, Conway P, Hoque MdA, Ghosh S, Parveen S, Biswas PK, Akhtar Z, Islam K, Islam MdA, Rashid MdM, Pelligand L, Khan ZH, Rahman M, Tomley F, Debnath N, Chowdhury F (2022) Antibiotic usage practices and its drivers in commercial chicken production in Bangladesh. *PLoS ONE* 17:e0276158. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276158>
79. Jerzsele A, Nagy G, Lehel J, Semjen G (2009) Oral bioavailability and pharmacokinetic profile of the amoxicillin–clavulanic acid combination after intravenous and oral gavage administration in broiler chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 32:506–509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2009.01066.x>

80. Xu J, Sangthong R, McNeil E, Tang R, Chongsuvivatwong V (2020) Antibiotic use in chicken farms in northwestern China. *Antimicrob Resist Infect Control* 9:10. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0672-6>
81. Gibson JS, Wai H, Oo SSML, Hmwe EMM, Wai SS, Htun LL, Lim HP, Latt ZM, Henning J (2020) Antimicrobials use and resistance on integrated poultry-fish farming systems in the Ayeyarwady Delta of Myanmar. *Sci Rep* 10:16149. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73076-2>
82. Sahin-Tóth J, Kovács E, Tóthpál A, Juhász J, Forró B, Bányai K, Havril K, Horváth A, Ghidán Á, Dobay O (2021) Whole genome sequencing of coagulase positive staphylococci from a dog-and-owner screening survey. *PLoS One* 16:e0245351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245351>
83. Modi A, Vai S, Caramelli D, Lari M (2021) The Illumina Sequencing Protocol and the NovaSeq 6000 System. *Methods Mol Biol* 2242:15–42. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1099-2_2
84. 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
85. Krueger F (2022) Trim Galore
86. 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
87. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G (2013) QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
88. Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
89. Wood DE, Lu J, Langmead B (2019) Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology* 20:257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>
90. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR (2007) NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* 35:D61–65. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl842>
91. R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
92. McMurdie PJ, Holmes S (2013) phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8:e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
93. Lahti L, Shetty S (2012) Microbiome R Package
94. Nurk S, Meleshko D, Korobeynikov A, Pevzner PA (2017) metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Res* 27:824–834. <https://doi.org/10.1101/gr.213959.116>
95. 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>
96. 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>
97. 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>
 98. 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>
 99. 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>
 100. Ma Y, Wang W, Zhang H, Wang J, Zhang W, Gao J, Wu S, Qi G (2018) Supplemental *Bacillus subtilis* DSM 32315 manipulates intestinal structure and microbial composition in broiler chickens. *Sci Rep* 8:15358. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33762-8>
 101. D’Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WWL, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD (2011) Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477:457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
 102. Hassen B, Abbassi MS, Ruiz-Ripa L, Mama OM, Hassen A, Torres C, Hammami S (2020) High prevalence of mcr-1 encoding colistin resistance and first identification of blaCTX-M-55 in ESBL/CMY-2-producing *Escherichia coli* isolated from chicken faeces and retail meat in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology* 318:108478. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108478>
 103. Bradford PA (2001) Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* 14:933–951. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
 104. Gousia P, Economou V, Bozidis P, Papadopoulos C (2015) Vancomycin-resistance phenotypes, vancomycin-resistance genes, and resistance to antibiotics of enterococci isolated from food of animal origin. *Foodborne Pathog Dis* 12:214–220. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1832>

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kerek Ádámnak, aki hatalmas támogatást és segítséget nyújtott a kutatás során. Továbbá szeretném megköszönni a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék valamennyi munkatársának, akik bármilyen úton hozzájárultak a dolgozatom elkészüléséhez.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani a családomnak, barátaimnak és a vőlegényemnek, akik támogatása és biztatása nélkül ez a kutatás nem valósulhatott volna meg.

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 **Füzi Vanessza** **hatodik** évfolyamos hallgató **„Házityúokban engedélyezett antibiotikum tartalmú készítmények *in vivo* hatása az antibiotikum rezisztencia kialakulására”** című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2024. 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, 2024. október hó 08. nap.

.....

Dr. Kerek Ádám
témavezető