

TDK DOLGOZAT

Németh Virág Alexandra

2023

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



Szarvasmarha állomány nyerstej és nyers tejtermékeinek
antimikrobiális rezisztencia génkészlet (ARG) változásának
nyomon követése a termelés helyétől a fogyasztóig

Készítette:

Németh Virág Alexandra

V. évf. ao. hallgató

Témavezető:

Dr. Kerek Ádám

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, egyetemi tanársegéd

Budapest

2023

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	3
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. Az antimikrobiális rezisztencia globális jelentősége	5
2.2. A szarvasmarha ágazat antimikrobiális rezisztencia helyzete	6
2.3. A tej és tejtermékek szerepe az antimikrobiális rezisztencia terjesztésében	8
3. Célkitűzések	15
4. Anyag és módszer.....	16
4.1. A minták eredete	16
4.2. DNS-kivonás, könyvtárkészítés és szekvenálás	16
4.3. Bioinformatikai elemzés	17
5. Eredmények.....	19
5.1. A mintákból azonosított génkészlet.....	19
5.2. Az azonosított gének mintánkénti gyakorisága	25
5.3. Az azonosított gének hatóanyag csoportonkénti gyakorisága	28
5.4. Az azonosított gének rezisztencia mechanizmusonkénti gyakorisága.....	29
6. Következtetések.....	31
7. Összefoglalás.....	34
8. Summary.....	35
9. Irodalomjegyzék	36
10. Köszönetnyilvánítás	41

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMR	Antimikrobiális rezisztencia (<i>Antimicrobial resistance</i>)
ARG	Antimikrobiális rezisztencia gén (<i>Antimicrobial resistance gene</i>)
CARD	<i>The Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EU	Európai Unió
ESBL	Kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (<i>Extended-spectrum beta-lactamases</i>)
MGE	Mobilis genetikai elem (<i>Mobile genetic elements</i>)
MRSA	Meticillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	Polimeráz láncreakció (<i>Polymerase chain reaction</i>)
STEC	Shiga toxint termelő <i>E. coli</i> (Shiga toxin-producing <i>E. coli</i>)
TBEV	Kullancs encephalitis vírus (<i>Tick-borne encephalitis virus</i>)

1. BEVEZETÉS

A 21. század egyik meghatározó problémája az antimikrobiális rezisztencia globális terjedése, amely megfékezése közös gondolkodást igényel az állat- és humánegészségügy területén az Egy egészség tükrében. Az utóbbi évtizedekben egyre több kutatás irányul a rezisztencia genetikai szinten történő megértésére, hiszen a molekuláris genetikai módszerekkel kiegészített fenotípusos vizsgálatok jobban rávilágítanak az egyes folyamatok közötti összefüggésekre és ezáltal hatékonyabb, célzott lépések megfogalmazásában segíthetnek az így megismert új információk. Bár leggyakrabban a rezisztencia kialakulását a túlzott antibiotikum használattal társítják, azonban ez a jelenség több millió éves evolúciós folyamatokra vezethető vissza. Közös érdekünk, hogy a jövő generációi számára a globális antimikrobiális rezisztencia terjedését lassítsuk és megőrizzük a sokszor életmentő antibiotikumok hatékonyságát.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az antimikrobiális rezisztencia globális jelentősége

A különböző fertőzések okozta megbetegedések a világ vezető halálozási okai közé tartoznak. Ezt az eleve súlyos helyzetet tovább rontotta az antimikrobiális rezisztencia (AMR) gyors terjedése az utóbbi évtizedekben. A problémakör pontos hátterének felderítésével egyre több kutatás foglalkozik. Ezek főként a terjedés lehetséges útvonalainak és rezervoárjainak feltérképezésével; annak megjelenési és terjedési formáival; valamint a potenciálisan előállítható új antimikrobiális szerek és azok helyettesítésének lehetőségeivel foglalkoznak. Az AMR terjedésében nincsenek földrajzi korlátok, különböző útvonalak révén átjuthatnak a rezisztenssé váló kórokozókból más baktériumokba, ezáltal potenciális veszélyt jelentve mind az állat- és közegészségügyre nézve- egy globális problémát létrehozva. Napjaink komoly kihívása az emberekhez köthető rezervoárok egyre szélesebb körű állategészségügyi kapcsolódása, amelyben a környezetnek is meghatározó szerepe van. Egy ilyen környezeti kapcsolatot megfigyelő vizsgálat során az AMR gének diverzitását elemezték két szennyvízzel kontaminálódott, de eltérő környezetben vételezett üledékmintán (tengerpart, mangrove erdő). Az eredmények vizsgálata során azt tapasztalták, hogy a mangrovei üledék mintájában sokkal alacsonyabb AMR génkészlet figyelhető meg, mint a tengerparti mintákban [1]. Ezen vizsgálatok során legtöbbször az intrinsic gének vizsgálatára helyezik a hangsúlyt, amely arra utal, hogy a minta filogenetikai összetétele is fontos lehet. Az AMR gének terjedésének megértéséhez fontos feltárni a lehetséges átviteli utakat. Erre kiváló példa a vadon élő és vonuló madarak, amelyek számos esetben igazoltan potenciális vektorai ezeknek a géneknek, mely során földrajzilag igen változatos területekre juttathatják el a géneket. [2]. Egy Svájcban történt felmérés során rávilágítottak arra, hogy az ott befogott vonuló madarak 5,8%-a multirezisztens *Escherichia coli* (*E. coli*) baktérium rezervoárja volt, és ezek közül sokan hordoztak közegészségügyi szempontból fontos, kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) termelésért felelős géneket is, mint a CTX-M-15, CTX-M-55 vagy a CTX-M-65 [3]. Az AMR vizsgálatának egyik fő nehézsége, hogy nem áll rendelkezésre elegendő mennyiségben olyan modell, amely a terjedését mérhetővé tehetné. Szemléltetésként, egy ehhez hasonló modellt publikáltak, egy meticillin rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) baktériummal kapcsolatos kutatásban, amely segíthet megbecsülni az adott körülmények között a keresztkontamináció és a reinfekció esélyét. A vizsgálat során kiskereskedői hús felhasználásával, otthoni húsfeldolgozás során vizsgálták a konyhai munka során a kézzel, valamint a konyhai eszközök használata során történő

kórokozó átvitel esélyeit és lehetőségét. A vizsgálat fényt derített arra, hogy a rezisztens baktériumokat tartalmazó nyershús konyhakészre való sütése során az átvitel esélye alacsony szintre csökken [4, 5].

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) gondozásával működő világszintű „*One Health*” kezdeményezés keretein belül a humán-, állat- és növénygyógyászat, valamint a környezeti gazdálkodás összefogásában szigorú szabályozásokkal törekednek a AMR visszaszorítására a célzott és tudatos antibiotikum-felhasználás mellett. Az állatgyógyászatban, valamint a mezőgazdaságban elkerülhetetlenné vált a humángyógyászat számára kulcsfontosságú antibiotikumok használatának csökkentése, bizonyos esetekben mellőzése (3-4. generációs cephalosporinok, fluorokinonok, kolisztin), valamint az antibiotikumok hozamfokozás céljából történő felhasználása is betiltásra került már több évtizeddel ezelőtt. A humán egészségügyben a legfőbb célnak a betegségek megelőzését tűzték ki, mely az ellátás minőségének növelésével, a higiénia és a tisztaság magas szinten tartásával, a járványügyi szabályok betartásával érhető el, azonban szigorúan kerülendő a megelőző (profilaktikus) antibiotikummal történő kezelés alkalmazása. Mindezen szabályok betartásával abban reménykednek, hogy ezek hozzájárulnak az antibiotikumok hatékonyságának megőrzéséhez a jövő generációi számára [6].

Az Egyesült Királyságban készített 2014-es felmérés szerint évente 700 000 ember veszíti életét multirezisztens kórokozók által okozott fertőzésben, becslések szerint ez az érték 2050-re a 10 milliót is elérheti, amely főként az elmaradottabb országokra terjedhet ki. Németországban 2011-2015 között drasztikusan, 53%-kal csökkentették az évente felhasznált antibiotikum mennyiségét; majd 2014-2015 között újabb 35%-kal csökkentették a felhasznált mennyiséget, amelynek következtében jelentős mértékben elkezdett csökkenni a rezisztens baktériumok gyakoriságának a mértéke is [7].

2.2. A szarvasmarha ágazat antimikrobiális rezisztencia helyzete

Az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) négy csoportba kategorizálja az antimikrobiális szereket, figyelembe véve a humán egészségügyi felhasználásuk fontosságát. Az antibiotikumok felhasználásának a leggyakoribb indikációja a szarvasmarha ágazatban a gyulladásos megbetegedések kezelése, ezen belül is a vezető helyen a mastitis kezelése áll. A kutatók évtizedekig dolgoztak a mastitis kórokozóival szemben hatásos vakcinák fejlesztésén, azonban ezek hatékonysága a mai napig nem megfelelő. A vakcinák használata viszont a jövőben az antibiotikum felhasználás csökkentésének az egyik

meghatározó módszere lehet. Mindamellett törekedni kell a szarvasmarhák egyedi antibiotikummal történő kezelésére és a terápia szempontjából figyelembe kell venni az állat korát, a szomatikus sejtszámot, valamint az állat korábbi kezelési előzményeit [7].

A tejelő szarvasmarha telepeken az egyik leggyakoribb betegség a mastitis, amelynek a háttérében leggyakrabban a *Staphylococcus aureus*, és a β -laktám hatóanyagokkal szemben rezisztenciát kialakított MRSA áll. Világszerte egyre több tejelő telepen növekvő prevalencia figyelhető meg. Az élelmiszerrel történő fertőződés esélye általában igen csekély, tekintve, hogy az MRSA prevalenciája az állományokban meglehetősen alacsony, valamint a tejet leggyakrabban hőkezelés alá vetik a fogyasztást megelőzően. Napjainkban az MRSA gyógykezelése kiemelt fontosságú, hiszen a β -laktám antibiotikumok hatékonyságának elvesztése jelentősen beszűkíti a kezelésben rendelkezésre álló egyéb hatóanyagok körét [8]. Ahhoz, hogy fejleszthessük az MRSA elleni védekezési stratégiáinkat, létfontosságú megértenünk, hogy mely környezeti faktorok járulnak hozzá az MRSA terjedéséhez egy állományon belül, amelyek közül a legfontosabb a nem megfelelő fejési higiénia [9]. A megfigyelések alapján az MRSA prevalenciája gyakoribb a hagyományos tartástechnológiával rendelkező farmokon, mint a biofarmokon, valamint a méretben nagyobb telepeken is magasabb az előfordulás aránya, mint a kisgazdaságokban. Azokon a telepeken, ahol sertéseket is tartanak szarvasmarhák mellett, szintén sokkal nagyobb prevalenciával volt jelen a kórokozó, valamint az MRSA-t hordozó emberek aránya is nagyobb volt, akiknek szintén kiemelt szerepe lehet a terjesztésében, ezáltal komoly állat- és közegészségügyi kockázatot teremtve [10]. Aggodalomra ad okot, hogy a meticillin-rezisztens koaguláz negatív *Staphylococcus* (MR-CoNS) fajok egyre gyakrabban kerülnek izolálásra a tejelő szarvasmarha telepeken, mivel ezek a törzsek bizonyítottan nagyobb eséllyel adhatnak át rezisztenciagéneket más baktérium törzseknek [11, 12].

Egy kutatás során a borjak antibiotikum-reziduum tartalmú tejjel való itatásának hatását vizsgálták az AMR kialakulásának kockázatára nézve. A tehenek laktáció és szárazon állás alatti kezelése gyakori az Európai Unió (EU) belül. A penicillinek önmagukban vagy kombinálva aminoglikozidokkal és cefalosporinokkal rendszerint az elsődleges választású szerek ezen kezelése során. A tejben jelen levő antibiotikum reziduumszint folyamatosan csökken a szárazonállási szakasz hosszának növelésével. Amennyiben az időköz a szárazra állítási periódus kezdetétől az ellésig bezárólag legalább olyan hosszú volt, mint ahogy az antibiotikum használati útmutatójában meghatározták, a bélsárban megjelenő antibiotikum mennyisége nem emelkedett a borjakban, amennyiben azok korábban antibiotikummal

kezelt tehenekből kifejt kolosztrumot kaptak. Azoknak a teheneknek a tejének az elfogyasztása, amelyek a laktáció alatt kaptak kezelést, megnövekedett AMR reziduumot eredményezett a borjak bélsarában [13].

Egy kutatás során tehéntejből izolált, mastitist okozó *Staphylococcus aureus* törzsek genetikai diverzitását és antibiotikum érzékenységét vizsgálták, majd elektroforézissel (PFGE) különböző típusokba klasszifikálták azokat. Az eredmények alapján az izolátumok 86,3%-a volt érzékeny minden vizsgált hatóanyagra, 13,4%-a volt egy, vagy annál több antimikrobiális szerre rezisztens, 10,4%-a kizárólag penicillinre volt rezisztens, 2,5%-a penicillinre és eritromicinre, 0,6%-a tetraciklinre, valamint 0,3%-a eritromicinre volt rezisztens. Az izolátumok hét típusba voltak sorolhatóak, amely típusokat összefüggésbe lehetett hozni az antimikrobiális szerekkel szemben kialakított rezisztencia profillal. Megfigyelték, hogy azok a törzsek, amelyek rezisztenciát mutattak legalább egy hatóanyaggal szemben, alapvetően négy kategóriába voltak besorolhatók [14].

Az utóbbi időben számos olyan kutatás készült, amelyekből kiderült, hogy a szarvasmarha ágazatban az AMR prevalenciája az utóbbi évtizedekben 7%-ról 63%-ra nőtt penicillin [15, 16], 0%-ról 12%-ra nőtt oxacillin [17, 18], 0%-ról 93%-ra nőtt eritromicin [19, 20], 0%-ról 28%-ra nőtt tetraciklin [15, 16] valamint 4,5%-ról 7,5%-ra nőtt szulfadimetoxin [18, 21, 22] hatóanyagokra nézve.

2.3. A tej és tejtermékek szerepe az antimikrobiális rezisztencia terjesztésében

Az ágazat gazdasági és társadalmi jelentőségét mutatja, hogy 2021-ben az EU-ban összesen 10,4 millió tonna sajtot állítottak elő, amihez 16,4 millió tonna zsírszegény tejet, valamint ehhez hozzáadott 61,4 millió tonna teljes tejet használtak fel [23]. Az Európai Parlament az élelmiszerek higiéniájáról és azok alapvető szabályozásairól szóló 853/2004-es rendeletében definiálja a nyers tej fogalmát, miszerint a nyers tej olyan haszonállatok tejmirigye által szekretált tej, amely nem került 40°C feletti melegítésre, és nem esett át bármely olyan kezelésen, amely hasonló hatással bírt volna arra [24].

Az elmúlt két évtizedben az egészségügyi kockázatok ellenére igen jelentős mértékben megnőtt a kereslet a hőkezelés nélküli tej és tejtermékek iránt azok tápanyagösszetételét és ízét illető pozitív hatásuk miatt. Felmérések alapján az Amerikai Egyesült Államok (USA) lakosságának 3%-a fogyaszt állati eredetű pasztörizálatlan nyers tejet; ezen kívül a nyers tej legális értékesítésére való igény is folyamatosan növekszik [25]. Néhány, a közelmúltban megjelent kutatás is igazolja a pasztörizálatlan tej fogyasztásának pozitív élettani hatásait,

amit leírtak például asztmában, atópiás bőrgyulladásban, végbélrákban vagy légzőszervrendszeri megbetegedésekben szenvedő betegek esetén [26]. Ezzel ellentétben a nyers tej fogyasztása súlyos egészségügyi kockázatokkal is jár, hiszen kiváló forrása lehet a tejfogyasztással átvihető megbetegedések terjedésének, amelyek egyben az ARG-k átvitelének forrásává válhatnak. A nyers és hőkezelt tejek mikrobiomjának és antibiotikum rezisztómájának összehasonlítása során egy kutatásban 2034 tejmintát vizsgáltak. Az eredmények során kiderült, hogy a nyers tej esetén a legnagyobb az átadható baktériumok mennyisége. Mindegyik minta esetén a 4 °C-on történő tárolás során életben maradtak a benne található mikrobák, míg szobahőmérsékleten tárolva a nyers tejmintákban drasztikusan megemelkedett a baktériumszám és ezzel párhuzamosan megnőtt a rezisztóma nagysága is. Metagenomikai vizsgálatokkal kiderült, hogy a nyers tej drámaian magasabb ARG számmal rendelkezik, mint a pasztörizált tej. Összefüggést tudtak leírni egy a nyers tejben detektált ceftazidim-rezisztens génnek az elfogyasztását követő, bélmikrobiom részét képező *E. coli* baktériumba történő horizontális géntranszfere között. Így összességében kijelenthető, hogy a nyers tej rezervoárja lehet az ARG-knek [25].

Az emberi gastrointestinalis rendszer számtalan mikroorganizmusnak ad életteret, ebből legtöbbjük veszélytelen kommenzalista, egy részük pedig a patogén mikrobiom részét alkotja. A mikrobiom fontos feladata a különböző fertőző és nem fertőző megbetegedésekkel szembeni védelem, azonban kiemelkedő szerepet játszik az AMR kialakulásában is. Miután a baktériumok igen könnyen átadhatják egymásnak genetikai állományukat horizontális géntranszfer útján, a nem patogén törzsek is könnyen lehetnek az ARG-k donorjai más patogének számára [27]. A mikrobiom változatossága számos környezeti faktortól függ, mint például az étrend vagy az antibiotikumokkal szembeni kitettség. Egy egészséges felnőtt ember mikrobiótájának legnagyobb hányada a Bacteroidetes és a Firmicutes család tagjait tartalmazza, azonban az összetétel diverz és dinamikusan változó, akár enteropatogén kórokozók is jelen lehetnek [28]. A rezisztóm klasszifikálható *intrinsic* és mobil rezisztómaként is. Az *intrinsic* AMR gének viszonylag állandóak, valamint nem csak hordozzák a rezisztencia fenotípusos kifejeződését, hanem szorosan összefüggésben állnak a baktérium életműködéseivel és metabolizmusával. Feltételezik, hogy ezeket a géneket mobilis genetikai elemek (MGE) vehették közre az evolúció során, és így válhattak maguk is mobilissá [29]. Az *intrinsic* rezisztencia megértése közelebb juttathat minket az AMR kockázatának és evolúciójának becsléséhez [30]. Az emberi gasztrointesztinális környezet megfelelő lehetőséget biztosít a gének horizontális géntranszferéhez, ezáltal az AMR gének

átadódhatnak a bélmikrobiom egyéb mikroorganizmusai részére. A humán mobilis rezisztómot legtöbb esetben a Proteobacteria, a Firmicutes, az Actinobacteria és a Bacteroidetes fajok alkotják [31, 32].

Az *intrinsic* antibiotikum rezisztencia egy természetes jelenség, amely minden baktériumfajra jellemző tulajdonság. A folyamatot a baktérium külső membránja, valamint efflux pumpái mediálják. A rezisztencia kialakulását a spontán mutáció, a rekombináció, és a horizontális géntranszfer mellett a subletális dózisban alkalmazott antibiotikumok is indukálhatják [30]. Bizonyos környezeti hatásokra az antimikrobiális szerek hatásos gátlókoncentrációja megnövekedhet, az antibiotikumok mutagenetikus hatásának emelkedésével párhuzamosan [33]. Emellett kutatások alátámasztották, hogy egyéb addicionális gének és genetikai helyek is hozzájárulnak a rezisztencia fenotípusos kifejeződéséhez. Továbbá fontos kiemelni, hogy a plazmidoknak is fontos szerepe van a rezisztencia kialakulásában, például segítik a releváns rezisztenciagének terjedését, valamint promótálják a horizontális géntranszfert az egyes baktériumok között. Emellett bizonyos virulencia-faktorokat is hordozhatnak, amelyek segítik a baktériumok fennmaradását különféle környezeti hatások mellett [33]. Az állatállományokhoz (*livestock-associated*) köthető MRSA (LA-MRSA) fertőzések főként a *clonalis complex* (CC) 398-cal hozhatók összefüggésbe, amelynek fő rezervoárjai a sertés, a baromfi és a szarvasmarha, azonban szoros gazdafaj specifikusságot nem figyeltek meg, így más állatfajokat is megfertőzhet, köztük az embert is. Ez a fertőzés kórházakba bejutva életet veszélyeztető posztoperatív sebfertőzést, akár szeptikémiát is okozhat [34]. A feldolgozás nélkül elfogyasztásra kerülő állati termékek multirezisztens törzsei bizonyítottan kapcsolatba léphetnek az emberi bakteriótával és horizontális géntranszfer segítségével átadhatják a rezisztenciáért felelős géneket [35].

A nyers tej meglehetősen változatos baktériumösszetételt foglal magában, olyan patogéneket is, amelyek a fogyasztás során átvihetők az emberbe is. Az *intrinsic* fertőződés szisztematikus vagy lokalizált fertőzéstől szenvedő (pl. mastitis) állatok nyers tejének elfogyasztásából származhat. Az *extrinsic* fertőződés leginkább bélsárral való terjedéssel lehetséges, valamint jellemzően a szélesebb telepi környezetből származik. Határozott összefüggés figyelhető meg a humán *Campylobacter* spp., *Salmonella* Typhimurium, sigatoxin termelő *E. coli* (STEC), kullancsencephalitis vírus (TBEV), *Brucella melitensis* és *Mycobacterium bovis* megbetegedések és a nyers tej fogyasztása között, amelyek gyakran az egyes betegek komoly egészségkárosodásának következményével járnak. Az Európai

Élelmiszerbiztonsági Hivatal (EFSA) felkérésére a Biológiai veszélyforrások Panele (BIOHAZ Panel) felkérést kapott, hogy tudományos véleményt alkosson a nyers tej fogyasztásának kockázatairól, különös figyelmet fordítva az AMR jelenségére. Továbbá azok lehetséges forrásainak felkutatására, a releváns baktériumok megnevezésére, valamint a jelenséget promótáló veszélyforrásokra, mint például a nyers tej forgalmazása interneten vagy automatákon keresztül. Ez utóbbi két forgalmazási mód esetén 4 °C-on történik a tárolás, de fontos hangsúlyozni, hogy bár rendszerint egyértelmű utasítást adnak a csomagoláson a fogyasztás előtti megfelelő hőmérsékletre történő felforralásra, amely megszüntetné a kockázatot, azonban ennek betartása vásárlás után a fogyasztó saját felelőssége, emiatt ez a faktor nem egy ellenőrizhető kockázati tényező [36]. Egy olaszországi felmérés során kimutatták, hogy a hőkezelés nélkül elfogyasztott tejben a teleptől az felhasználásig történő hőmérsékletváltozások segítik a *Listeria monocytogenes*, a *Salmonella* Typhimurium és az STEC O157:H7 fajok multiplikációját [37]. A Panel fontos feladatául kapta, hogy tárja fel és rangsorolja a megfelelő kontroll lépéseket ezen veszélyforrások megelőzésére. A legjelentősebb mikrobiológiai veszélyforrásokat az EU tejtermelési ágazatában a baktériumok közül a *Campylobacter* spp. [38–40], a *Salmonella* spp. [41, 42], az STEC törzsek [43, 44], a *Bacillus cereus* [45, 46], a *Brucella abortus*, a *Brucella melitensis* [47–49], a *Listeria monocytogenes* [50, 51], a *Mycobacterium bovis* [52, 53], a *Staphylococcus aureus* [54–56], a *Yersinia enterocolitica*, a *Yersinia pseudotuberculosis* [57, 58], a *Corynebacterium* spp. [59, 60], a *Streptococcus suis* subsp. *zooepidemicus* [61, 62]; a paraziták közül a *Toxoplasma gondii* [63, 64], a *Cryptosporidium parvum* [65, 66]; a vírusok közül pedig a TBEV jelenti [67]. 2007-2012 között 27 megbetegedést okozó kitörési eset került bejelentésre az EU-ban, amely a nyers tej fogyasztásával állt összefüggésben, ebből 21 esetet *Campylobacter* fertőzés okozott, egyet *Salmonella* Typhimurium, kettőt STEC és hármát TBEV. A 27 esetből mindösszesen négy származott nyers kecsketejből, a fennmaradó összes többi esetet nyers szarvasmarha tej okozta [36]. Az STEC, a *Salmonella* spp. és a *Campylobacter* fajok mindenütt jelenlevő patogének, amelyek igen gyakran vannak jelen a tejtermelő állatokban, így az azok által termelt tejben is [38–41]. A *Mycobacterium bovis* és a *Mycobacterium melitensis* okozta fertőzés bár összefüggésbe hozható a nyers tej fogyasztásával, ezek a patogének azonban jóval ritkábban fordulnak elő és megjelenésük földrajzi tekintetben véve is erősen behatárolt. Ebből következően a velük szemben kialakított kontroll programok is lényegesen hatásosabbak [52, 53]. Ezen élelmiszerlánc közvetítette veszélyforrások előzetes felmérésére bizonyos országokban (Ausztrália, Új-Zéland, USA, Olaszország) létrehoztak

Kvantitatív Mikrobiológiai Kockázatbecslési Modelleket *Campylobacter* spp., *Salomonella* spp., STEC O157 fajok esetén. A *Listeria monocytogenes* kockázatát pedig nyers szarvasmarha tejminták esetében vizsgálták. A kapott kockázatbecslési eredmények azonban nem extrapolálhatóak teljes mértékben az európai helyzetre [36].

Az EU *One Health* 2020 Zoonózis Riportja a tejhez, sajthoz, valamint egyéb tejtermékekhez köthetően 8 tagországból származó, összesen 16 kitörési pontot jelentett, melyek összességében 325 megbetegedési esetet foglaltak magukban. Ebből az esetszámból 67-en szorultak kórházi ellátásra és egy fő elhunyt. A megbetegedésekkel változatos formájú sajtokat hoztak összefüggésbe, előfordult közöttük lágy, nyers tejből készült, valamint egyéb fajta sajtok is azonosításra kerültek, mint a megbetegedések forrásai. A kimutatott patogének között jelen voltak a *Salmonella enteritidis*, a *Listeria monocytogenes*, az STEC, valamint a *Staphylococcus aureus* és ezek toxinjai is. A legtöbb áldozattal járó megbetegedési hullámot 10 halálessel összefüggésben Svájcban írták le, ahol az áldozatok olyan sajtot fogyasztottak, amely *Listeria monocytogenes* serovar 4b-vel fertőződött [68].

Egy Kenyában történt vizsgálat során összehasonlították az antibiotikum reziduumok jelenlétének arányát a pasztörizált, valamint nyers (pasztörizálatlan) tejben, ezen kívül az antibiotikum rezisztens baktériumok előfordulását a hőkezeletlenül eladott nyers tejmintákban. Az *E. coli* esetén β -laktám és tetraciklin reziduumokat találtak 7,4% és 3,2% arányban a minták mindegyikében. A reziduumok szignifikánsan gyakrabban ($p=0,039$) voltak jelen a pasztörizálatlan tejben (23,8%) a pasztörizált tejmintákhoz képest (6,8%). A pasztörizálatlan tejminták 75%-a tartalmazott mérhető számú *E. coli* izolátumot és ezek 92,8%-a ampicillinre és 50%-a tetraciklinre rezisztens *E. coli* volt. Azonban nem találtak bizonyítható összefüggést az antibiotikum reziduumok jelenléte és az antibiotikum rezisztens *E. coli* jelenléte között a nyers tejben [69].

Egy másik kutatás során Dél-Tirolból származó nyers tejben előforduló ARG génkészletet vizsgáltak, amely korrelációt mutatott az antibiotikum felhasználás és a rezisztens Gram-negatív baktériumok előfordulása között. A metagenom vizsgálat feltárta, hogy a nyers tej ARG hordozásában a *Pseudomonas* spp. jelenlétének van a legnagyobb szerepe; továbbá kiemelt jelentőséggel voltak jelen a különböző tejsavbaktériumoknak, mint a *Lactobacillus* spp. és a *Lactococcus* spp. Szerepüket kimutatták az ARG-k mikrobiom részére történő horizontális géntranszferében az aminoglikozid-szteptomycin, a béta-laktám, a makrolid, a tetraciklin, a karbapenem, a cephalosporin, a peptid, a fluorokinolon, a

klóramfenikol és az elfamicin antibiotikumok esetében. A rekonstruált genom fényt derített arra, hogy a *Pseudomonas* spp. hordozták azt az *oriT* gént (*origin of transfer* gén), amely szükséges a virulens faktorok transzferéhez. Bár a *Pseudomonas* fajok gyakran előfordulnak a nyers tejben, a hőkezelés, pasztörizálási technológia segít lecsökkenteni túlélésüket. Összességében tehát érdemes vizsgálni a *Pseudomonas* fajokat, azok *intrinsic* AMR génhordozása miatt, valamint az egyéb baktériumok számára történő virulenciafaktor átadó képességük szempontjából is jelentős kockázatot hordozhatnak magukban [70].

Egy Portugáliában végzett vizsgálat során az őshonos állatokból fejt nyers tejből készült hagyományos kézműves sajtok esetén a *Listeria monocytogenes*, *E. coli* és a koaguláz pozitív *Staphylococcus* spp. jelenlétét vizsgálták. A beérkezett minták teljes genom szekvenálását követően megállapították, hogy a *Listeria monocytogenes* és a *Staphylococcus* spp. 10^4 CFU/g mennyiségben, 15,6%-os és 16,9%-os arányban, az extraintesinális *E. coli* pedig 10,1%-ban volt jelen. Ezen kívül az enterotoxinok 2,2-4,2%-os arányban voltak jelen a mintákban. AMR volt megfigyelhető az *E. coli* izolátumot tartalmazó minták 27,3%-ban, ezek közül hat minta multirezisztenciát mutatott. A teljes genom analízis rámutatott egy olyan *Listeria monocytogenes* és *Listeria innocua* csoport izolátumra, amelyek egymáshoz genetikailag szorosan kötődtek, ezek a sajtgyártás során gyakran korrelációban vannak egymással [71].

Egy Iránra kiterjedő kutatás során meghatározták a nyers, valamint pasztörizált tej, illetve a helyi sajtok patogén baktériumokkal való kontaminációját, valamint a hozzájuk köthető antibiotikum rezisztencia jelenlétének mértékét. Összesen száz, telepekről és kiskereskedőktől származó mintából tenyésztettek *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* és *Salmonella* Typhi baktériumokat, valamint felmérték a *Staphylococcus aureus* izolátumok rezisztencia profilját. A minták 10%-a esetén mutatták ki *Staphylococcus aureus* jelenlétét, azonban *Salmonella* Typhi és *Listeria monocytogenes* nem volt kimutatható. PCR vizsgálat alkalmazásakor azonban a minták 60%-ában mutatták ki a *Staphylococcus aureus*, 53%-ában a *Salmonella* Typhi és a 2%-ában *Listeria monocytogenes* genetikai állományának jelenlétét [72].

Egy 2023-as egyiptomi vizsgálat során Kairó és Giza különböző körzeteiből véletlenszerűen gyűjtött 112 tej, valamint tejtermék mintából vizsgálták az előforduló *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* jelenlétét, valamint ezek AMR profilját 11 különböző hatóanyaggal szemben. Az *E. coli* előfordulási aránya 69,64%

volt, *Staphylococcus aureus* esetén 12,5%-ot, és *Bacillus cereus* esetén 16,7%-ot figyeltek meg. Az *E. coli* izolátumok rezisztensek voltak gentamicinre (73,33%), ampicillinre (53,30%) és cefotaximre (16,66%). A multirezisztens *E. coli* törzseket (n=5) tesztelték β -laktám rezisztenciagének jelenlétére is, a *TEM* rezisztenciagént kimutatták minden izolátumból, és közülük kettő minta ezen felül hordozott *CTX-M* gént is. A *Staphylococcus aureus* izolátumok (n=10) esetén magas ampicillin (100%), tetraciklin (60%), cefotaxim (60%) és gentamicin (60%) rezisztenciát mutattak ki. Mindegyik multirezisztens *Staphylococcus aureus* törzs (n=4) hordozta a *blaZ* (penicillin rezisztencia) és *tetK* (tetraciklin rezisztencia) géneket, valamint három ezek közül *aac(6')-aph(2'')* (aminoglikozid rezisztencia) rezisztenciagént is hordozott. A *Bacillus cereus* izolátumok (n=30) rezisztenciát mutattak ampicillinre (100%), amoxicillinre (20%) és tetraciklinre (6,66%). A *blaZ* és *tetA* gének kimutathatóak voltak mindegyik multirezisztens (n=6) *Bacillus cereus* izolátumból [73].

Tóth és mtsai. kefir és joghurt minták AMR géndiverzitását vizsgálták, amely során számos hatóanyaggal és fertőtlenítőszerrel szembeni rezisztenciáért felelős gént sikerült nagy egyezőséggel azonosítaniuk. Eredményeik rávilágítottak arra, hogy a fermentációs folyamat támogatja az ARG-k feldúsulását, így a fermentálással készülő élelmiszerekhez szükséges kultúrát célszerű lenne monitorozni és szelektálni, hogy a lehető legnagyobb mértékben csökkenthessük az ARG-k mennyiségét [27].

3. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás célja, hogy egy magyarországi kislétszámú szarvasmarha állománnyal rendelkező, tejet és nyers tejtermékeket előállító és értékesítő gazdaság esetén nyomon kövessük a feldolgozás során – termőföldtől az asztalig – a termékpálya egyes kritikus pontjain vett minták esetén annak AMR génkészlet változását. Célkitűzésünk volt, hogy a nyers tejből, abból hőkezelés nélkül készített, beoltást követő nyers sajtból, valamint az egy hónapos érlelést követően a piacon értékesített, a fogyasztóhoz kerülő érlelt sajtból vett minták esetén új generációs szekvenálás segítségével feltérképezzük azok ARG hordozását. Továbbá vizsgáltuk az egyes gének kromoszomális, plazmidon vagy fagon történő hordozását és esetleges MGE tulajdonságát.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. A minták eredete

A minták egy tejtermelő kisgazdaságból származtak, Körösladányról. A mintavételezés során ügyeltünk arra, hogy egy kiindulási tétel teljes termékpályáját kövessük végig. Minden mintavételi pont során öt párhuzamos mintát vettünk, hogy eredményeink statisztikailag jól összehasonlíthatók legyenek. Az első mintavételezés a nyers elegytejből történt. A nyers elegytejből a gazdaság sajtokat készít, aminek a beoltásához saját aludttejet, valamint CHY MAX PLUS 17 ml/100ml készítményt, mint oltóenzimet használ. A beoltást követően elkészült nyers sajtból vett öt minta volt a következő kritikus pont, amit vizsgáltunk. Végezetül a nyers sajt egy hónapos érlelését követően vettünk újabb öt mintát abból. Az egy hónapos érlelés 17 °C-on, 70%-os páratartalom mellett, fenyőfa polcokon történt. Az érett sajtok piacra történő szállítása műanyag rekeszekben, csomagolása papír csomagoló anyagban történt.

A mintákat 50 ml-es centrifuga csövekben (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország), egyedi jelöléssel ellátva -80 °C-on ultramélyhűtőben tároltuk, azok feldolgozásáig. A minták személyes felszállítása minden egyes mintavételt követően közvetlenül történt.

4.2. DNS-kivonás, könyvtárkészítés és szekvenálás

A baktériumokból származó nukleinsav kivonáshoz a QIAamp Dneasy PowerFood Microbial kit (100), cat.no. 21000-100 kit-et (Qiagen, Hilden, Németország) használtuk a gyártó protokollja szerint. A tejmintákból a protokoll szerint 1,8 ml mintát használtunk fel; a sajtok esetében 0,4 grammot steril szikével aprítottunk, majd kiegészítettük 1 ml steril foszfát-puffer oldattal. Ezt követően a protokoll szerint haladva, azonban attól eltérően a rázatást Qiagen Tissue Lyzer LT készülékben, 50Hz-en, 10 percig végeztük. Végül az egyes mintákat 50 µg/ml-ben eluáltuk. Végezetül fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk Qubit® dsDNA BR Assay kit-tel (Thermo Fisher SSC, Budapest, Magyarország). A DNS-ből létrehozott párosított leolvasási szekvenciák (paired-end readok) vizsgálata Illumina NextSeq 500 szekvenátorral történt [74].

A DNS könyvtárak készítése Illumina® Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, USA) segítségével történt. A DNS fragmensek jelöléséhez a Nextera XT Index Kit v2 Set C (Illumina, San Diego, USA) indexeket használtuk. Első lépésben az amplifikált cDNS mintákat 2,5 µl végtérfogatban 0,2 ng/µl koncentrációra hígítottuk, majd

a tagmentáló reakcióhoz összekevertük 5 µl Tagment DNA pufferrel, valamint 2,5 µl AmpliconTagment Mix reagenssel. A reakcióelegyet 55°C-on 6 percig inkubáltuk GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Waltham, USA) készülékben, végül lehűtöttük 10°C-ra. Ezt követően azonnal hozzáadtunk 2,5 µl Neutralize Tagment puffert és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A DNS könyvtár készítéséhez 7,5 µl Nextera PCR Master mixet összekevertünk 2,5-2,5 µl i5 és i7 index primerrel, és a tagmentált DNS mintához adtuk, majd PCR-rel amplifikáltuk. A PCR 95°C-os 30 mp kezdeti denaturáció után 12 ciklusból állt (95°C 10 mp, 55°C 30 mp, 72°C 30 mp), amit egy 72°C-on 5 percig tartó végső elongációs lépés követett, majd a mintákat lehűtöttük 10°C-ra. Az így keletkezett indexált DNS könyvtárat Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel (Geneaid Biotech, Hszinpej, Tajvan) tisztítottuk, az oszlopos tisztítási protokollt követve; majd Qubit® dsDNA HS Assay kittel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk minőségellenőrzés céljából.

4.3. Bioinformatikai elemzés

A nyers szekvenciák minőségellenőrzését a FastQC v0.11.9 [75] szoftver segítségével, valamint TrimGalore v0.6.7 [76] segítségével a nem kielégítő minőségű szakaszok szűrését hajtottuk végre. A gazdaszervezet genetikai állományát, a *Bos taurus* genom (ARS-UCD1.3) szekvenciáit a Bowtie2 segítségével szűrtük ki [77], a nagy érzékenységi beállítások minimalizálták a fals pozitív egyezések arányát [78]. A leolvasási szekvenciákat (read-eket) hosszabb szekvenciákká (kontigokká) a MEGAHIT v1.2.9 [79] szoftver segítségével illesztettük össze. Az így kapott kontigokból meghatároztuk az összes lehetséges leolvasási keretet (ORF, *Open Reading Frame*) a Prodigal v2.6.3 segítségével [80], ezek bázissorrendje szerint származtattuk a fehérjeszekvenciákat, majd a Resistance Gene Identifier (RGI) v6.0.0 szoftver segítségével összehasonlítottuk a *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) adatbázisban [81] található ARG szekvenciákkal (letöltve: 2023.09.01). Az eredmények közül azokat hagytuk meg, melyek legalább strict minősítésűek, tehát elérik a CARD adatbázis meghatározott küszöbértékét.

Vizsgáltuk a rezisztencia gének mobilitását, ehhez a MobileElementFinder v1.1.2 szoftvert [82] használtuk, amely a kontigokon prediktálja az MGE géneket. Azokat az ARG-eket tekintettük potenciálisan mobilisnak, amelyek az MGE-khez az adatbázisban jellemző leghosszabb kompozit transzpozonok mediánjának távolságán belül voltak a kontigon megtalálhatók. Vizsgáltuk a plazmidon való hordozást a PlasFlow v1.1 szoftver

segítségével, a fág genomok kontigokon való jelenlétét pedig a VirSorter v2.2.3 [84] szoftver segítségével néztük.

Az így azonosított egyes rezisztencia gének jelentőségét a CARD adatbázisában található információkkal hasonlítottuk össze. Az adatok közül a 60% feletti lefedettséggel és szekvencia azonossággal rendelkezőket vettük figyelembe. Az adatbázisból meghatároztuk az egyes rezisztencia gének okozta rezisztencia mechanizmust, és hogy mely antibiotikum csoportok esetén vezet a gén jelenléte rezisztenciához [81].

5. EREDMÉNYEK

5.1. A mintákból azonosított génkészlet

Összesen 112-féle ARG-t azonosítottunk a mintákban, a géneket az **1-5. táblázatok** foglalják össze, azok azonosság és lefedettség mértékének tükrében, valamint, hogy milyen antibiotikum csoporttal szemben és milyen mechanizmus révén alakítanak ki rezisztenciát.

Közegészségügyi szempontból az egyik legfontosabb rezisztencia mechanizmus az enzimátikus úton történő inaktivációért felelős β -laktamáz termelés. Összesen 9-féle (*ACT*, *CMY*, *EC*, *ORN*, *OXA*, *OXY*, *PLA*, *RAHN*, *TER*) géncsaládba tartozó 19 db gént azonosítottunk, amelyek különböző mértékű β -laktamáz termelésért felelősek. Ezek közül egy olyan géncsalád volt, ami a világon széles körben elterjedt, kiterjedt spektrumú β -laktamáz termelésért felelős (*OXA*). Ez utóbbi géncsaládból egy gént (*OXA-662*) a nyers tejmintából, egy gént (*OXA-309*) pedig a friss sajtmintából sikerült kimutatnunk.

A fluorokinolonokkal szemben specifikus efflux pumpát meghatározó *abaQ* gént kizárólag a nyers tejmintákból mutattuk ki, ellenben a *emrA*, *emrB*, *emrR*, *mdtH*, *patA*, *patB* gének szinte az összes mintából a termékpálya során kimutathatóak voltak. A csökkent permeabilitásért felelős és egyben efflux pumpát meghatározó *marA* gén valamennyi mintában, viszont a *ramA* gén csak a nyers tejmintákban és érett sajtmintákban volt megtalálható. Az igen széles körben elterjedt, multidrug rezisztenciáért felelős, efflux pumparendszert és célpont módosítást meghatározó *acR-tolC* és *soxR* gének az összes mintában kimutathatóak voltak, hasonló módon a permeabilitást is csökkentő *soxS* génhez.

Az aminoglikozid hatóanyagok enzimátikus inaktivációjáért felelős *AAC(6')* géncsalád tagjai közül az *AAC(6')-If* gént kimutattuk nyers tejmintában és érett sajtban is. Azonban az *AAC(6')-Ii* és *AAC(6')-Iih* gének csak az érett sajtban voltak megfigyelhetők, ami utalhat a termék kontaminációjára. Az *aadA27* és *APH(3'')-Ib* gén, valamint az *APH(6)-Id* gén főleg a nyers tejből volt kimutatható, egy esetben a friss sajtból azonosítottuk, azonban az érés során eltűnt a mintákból, az *ANT(3'')-Iic* gén pedig csak a nyers tejben volt megfigyelhető.

Különösen aggasztó a peptid antibiotikumokkal szemben célpont módosításért felelős gén nagyszámú jelenléte az összes mintában (*arnT*, *bacA*, *eptB*, *ICR-Mo*, *pmrF*), az *eptA* és *ugd* gént viszont csak az érett sajtmintákból tudtuk kimutatni. Csökkent permeabilitásért felelős gének közül kizárólag a nyers tejmintákban azonosítottuk az *ompA* gén jelenlétét; az érett sajtmintákból volt kizárólag kimutatható az *yojI* efflux pumpát meghatározó gén. Az összes többi peptid hatóanyaggal szembeni rezisztenciát kialakító gén multidrug efflux pumpát meghatározó gén volt.

1. táblázat A mintákban azonosított antimikrobiális rezisztencia gének (ARG-k), azok lefedettsége és azonossága, valamint az egyes gének antibiotikum csoportokkal szembeni rezisztencia mechanizmusai

Gén	Lefedettség	Azonosság	Csoport	Mechanizmus
<i>AAC(6')-If*</i>	100%	97,22%	aminoglikozidok	enzimatis inaktiváció
<i>AAC(6')-Ii*</i>	93,41%	98,82%		
<i>AAC(6')-Iih</i>	100%	100%		
<i>aadA27*</i>	100%	98,85%		
<i>abaQ</i>	101,38%	72,71%	fluorokinolonok	efflux pumpa
<i>acrA*,***</i>	100%	90,68%	fluorokinolonok; cefalosporinok; gliciklinek; penicillinek; tetraciklinek; rifamicinek; fenikolok; fertőtlenítőszer	célpont módosítás, efflux pumpa
<i>acrAB-TolC és MarR mutáció*</i>	103,47%	82,64%		efflux pumpa
<i>acrB*,***</i>	100%	92,95%		
<i>acrD*</i>	100%	95,08%		
<i>acrE</i>	100%	100%	fluorokinolonok; cefalosporinok; cefamicin; penicillinek	efflux pumpa
<i>acrF</i>	100%	99,52%		
<i>acrS</i>	100%	100%	fluorokinolonok; cefalosporinok; gliciklinek; cefamicin; penicillinek; tetraciklinek; rifamicinek; fenikolok; fertőtlenítőszer	
<i>ACT-5</i>	108,92%	99,74%	karbapenemek; cefalosporinok; cefamicin; penicillinek	enzimatis inaktiváció
<i>ACT-8*</i>	100%	76,58%		
<i>adeF*</i>	99,15%	61,15%	fluorokinolonok; tetraciklinek	efflux pumpa
<i>ANT(3'')-IIa*,***</i>	83,28%	89,59%	aminoglikozidok	enzimatis inaktiváció
<i>APH(6)-Id*,***</i>	100%	99,64%		
<i>arnT*</i>	100%	86,39%	peptid antibiotikumok	célpont mutáció
<i>bacA*,**,***</i>	100%	93,41%	peptid antibiotikumok	célpont mutáció
<i>baeR*,**</i>	100%	94,17%	aminoglikozidok; aminokumarinok	efflux pumpa
<i>baeS</i>	100%	100%		
<i>cmx*,***</i>	100%	100%	fenikolok	
<i>CMY-101</i>	100%	99,74%	cefamicin	enzimatis inaktiváció

* plazmidon; ** fágon; *** mobilis genetikai elem (MGE)

2. táblázat A mintákban azonosított antimikrobiális rezisztencia gének (ARG-k), azok lefedettsége és azonossága, valamint az egyes gének antibiotikum csoportokkal szembeni rezisztencia mechanizmusai

Gén	Lefedettség	Azonosság	Csoport	Mechanizmus
CMY-136*	86,88%	94,86%	cefalosporinok; cefamicin	enzimatis inaktiváció
CMY-59*	107,34%	97,22%	cefamicin	
CMY-65*	100%	100%		
CMY-70****	100%	99,48%		
CMY-82	100%	99,48%		
CMY-83*	98,95%	100%		
cpxA**	100%	98,03%	aminoglikozidok; aminokumarinok	efflux pumpa
CRP*	100%	99,05%	makrolidok; fluorokinolonok; penicillinek	
dfrE*	100%	98,17%	diaminopirimidinek	célpont csere
eatAv	100%	99%	pleuromutilinek	célpont védelem
EC-14	102,92%	98,14%	cefalosporinok	enzimatis inaktiváció
efmA	100%	99,77%	makrolidok; fluorokinolonok	efflux pumpa
efrA*	100%	99,65%	makrolidok; fluorokinolonok; rifamicinek	
EF-Tu	96,33%	94,92%	elfamicin	célpont mutáció
emeA	97,71%	97,71%	fertőtlenítőszer	efflux pumpa
emrB*	100%	95,22%	fluorokinolonok	
emrE	100%	98,18%	makrolidok	
emrK*	110,26%	99,72%	tetraciklinek	
emrR*	100%	94,86%	fluorokinolonok	
eptA	101,83%	100%	peptid antibiotikumok	célpont mutáció
eptB	98,08%	89,89%		
evgA*	100%	100%	makrolidok; fluorokinolonok; penicillinek; tetraciklinek	efflux pumpa
evgS	100%	100%		
fosA2*	100%	95,74%	foszfomicin	enzimatis inaktiváció
fosA5*	100%	89,93%	fluorokinolonok; aminoglikozidok; foszfomicin	enzimatis inaktiváció
fosA8*	97,87%	61,76%	foszfomicin	enzimatis inaktiváció
gadX*	100%	100%	makrolidok; fluorokinolonok; penicillinek	efflux pumpa
glpT	100%	97,35%	foszfomicin	célpont mutáció

* plazmidon; ** fágon; *** mobilis genetikai elem (MGE)

3. táblázat A mintákban azonosított antimikrobiális rezisztencia gének (ARG-k), azok lefedettsége és azonossága, valamint az egyes gének antibiotikum csoportokkal szembeni rezisztencia mechanizmusai

Gén	Lefedettség	Azonosság	Csoport	Mechanizmus
<i>H-NS</i>	100%	100%	makrolidok; fluorokinolonok; cefalosporinok; cefamicin; penicillinek; tetraciklinek	efflux pumpa
<i>ICR-Mo*</i>	101,79%	95,6%	peptid antibiotikumok	célpont mutáció
<i>kdpE</i>	100%	90,18%	aminoglikozidok	efflux pumpa
<i>kpnE*,***</i>	100%	80,83%	makrolidok; aminoglikozidok; cefalosporinok; tetraciklinek; peptid antibiotikumok; rifamicinek; fertőtlenítőszer	efflux pumpa
<i>kpnF*,***</i>	100%	85,32%	makrolidok; aminoglikozidok; cefalosporinok; tetraciklinek; peptid antibiotikumok; rifamicinek; fertőtlenítőszer	efflux pumpa
<i>kpnG</i>	100%	94,36%		
<i>kpnH</i>	99,8%	84,17%		
<i>leuO*</i>	102,23%	79,61%	nukleozid antibiotikum; fertőtlenítőszer	efflux pumpa
<i>lmrD</i>	100%	100%	linkóزامidok	efflux pumpa
<i>lptD</i>	100,9%	93,09%	peptid antibiotikumok; aminokumarinok; rifamicinek	efflux pumpa
<i>lsaA</i>	100%	98,59%	linkóزامidok; sztreptogramin; sztreptogramin A; sztreptogramin B; pleuromutilinek	célpont védelem
<i>lsaD</i>	100%	94,57%	linkóزامidok; sztreptogramin; sztreptogramin A; pleuromutilinek	célpont védelem
<i>marA*</i>	100%	93,7%	fluorokinolonok; monobactam; karbapenemek; cefalosporinok; gliciklinek; cefamicin; penicillinek; tetraciklinek; rifamicinek; fenikolok; penem; fertőtlenítőszer	efflux pumpa, permeabilitás csökkenés
<i>mdfA*,**</i>	99,76%	86,98%	tetraciklinek; fertőtlenítőszer	efflux pumpa
<i>mdtA</i>	109,64%	99,52%	aminokumarinok	
<i>mdtB</i>	95,29%	93,24%		
<i>mdtC*</i>	100%	91,22%		

* plazmidon; ** fágon; *** mobilis genetikai elem (MGE)

4. táblázat A mintákban azonosított antimikrobiális rezisztencia gének (ARG-k), azok lefedettsége és azonossága, valamint az egyes gének antibiotikum csoportokkal szembeni rezisztencia mechanizmusai

Gén	Lefedettség	Azonosság	Csoport	Mechanizmus
<i>mdtE*</i>	100%	99,74%	makrolidok; fluorokinolonok; penicillinek	efflux pumpa
<i>mdtF</i>	100%	100%		
<i>mdtG</i>	99,51%	90,66%	foszfomicin	
<i>mdtH</i>	100%	100%	fluorokinolonok	
<i>mdtM*</i>	100,73%	86,73%	fluorokinolonok; linkóزامidok; nukleozid antibiotikum; fenikolok; fertőtlenítőszer	
<i>mdtN</i>	100%	88,92%	nukleozid antibiotikum; fertőtlenítőszer	
<i>mdtO</i>	100%	99,56%		
<i>mdtP</i>	100%	99,8%		
<i>mreA</i>	100,64%	72,61%	makrolidok	
<i>msbA**</i>	100%	92,44%	nitroimidazolok	
<i>norC*</i>	77,06%	99,16%	fluorokinolonok; fertőtlenítőszer	
<i>ompA</i>	95,19%	96,07%	peptid antibiotikumok	permeabilitás csökkenés
<i>oqxA</i>	100%	91,3%	fluorokinolonok; gliciklinek; tetraciklinek; diaminopirimidinek; nitrofuránok	efflux pumpa
<i>oqxB</i>	100%	96,76%		
<i>ORN-1*</i>	100%	100%	karbapenemek; cefalosporinok	enzimatis inaktiváció
<i>OXA-309*</i>	97,08%	96,24%	karbapenemek; cefalosporinok; penicillinek	
<i>OXA-662*</i>	100%	99,27%		
<i>OXY-1-2</i>	100%	100%	monobaktámok; cefalosporinok; penicillinek	
<i>OXY-1-4</i>	100%	99,31%		
<i>OXY-6-2</i>	93,1%	100%		
<i>patA</i>	100,89%	67,73%	fluorokinolonok	efflux pumpa
<i>patB</i>	101,02%	68,24%		
<i>PLA-1</i>	100%	99,66%	karbapenemek; cefalosporinok	enzimatis inaktiváció

* plazmidon; ** fágon; *** mobilis genetikai elem (MGE)

5. táblázat A mintákban azonosított antimikrobiális rezisztencia gének (ARG-k), azok lefedettsége és azonossága, valamint az egyes gének antibiotikum csoportokkal szembeni rezisztencia mechanizmusai

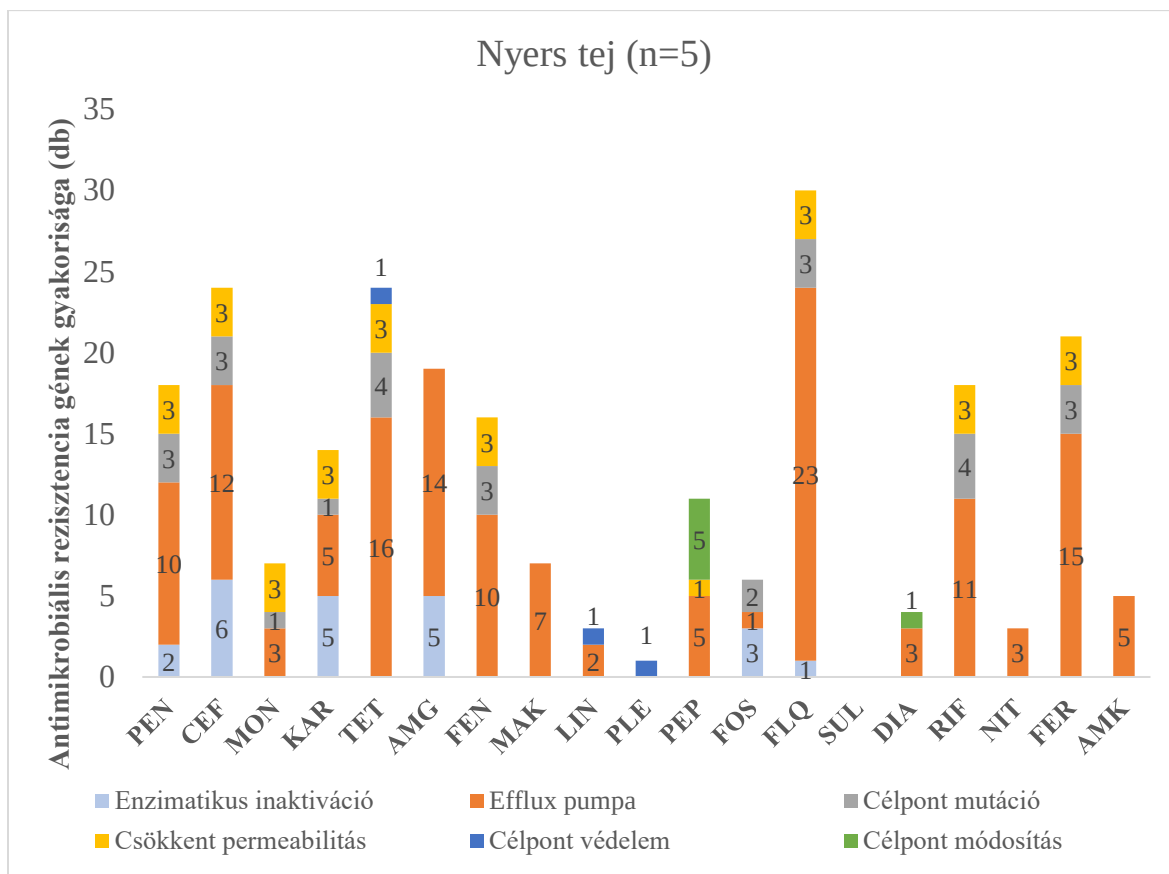
Gén	Lefedettség	Azonosság	Csoport	Mechanizmus
<i>pmrF</i>	101,55%	84,21%	peptid antibiotikumok	célpont mutáció
<i>qacEdelta1*</i> ***	100%	100%	fertőtlenítőszer	efflux pumpa
<i>RAHN-1</i>	100%	100%	cefalosporinok	enzimatis inaktiváció
<i>ramA*,**</i>	91,13%	95,58%	fluorokinolonok; monobactam; karbapenemek; cefalosporinok; gliciklinek; cefamicin; penicillinek; tetraciklinek; rifamicinek; fenikolok; penem; fertőtlenítőszer	efflux pumpa, permeabilitás csökkenés
<i>rpsL</i>	100%	87,8%	aminoglikozidok	célpont mutáció
<i>rsmA*</i>	100%	85,25%	fluorokinolonok; diaminopirimidinek; fenikolok	efflux pumpa
<i>sepA</i>	71,34%	97,32%	fertőtlenítőszer	
<i>soxR</i>	100%	100%	fluorokinolonok; cefalosporinok; gliciklinek; penicillinek; tetraciklinek; rifamicinek; fenikolok; fertőtlenítőszer	célpont módosítás, efflux pumpa
<i>soxS*,**,***</i>	101,87%	89,72%	fluorokinolonok; monobactam; karbapenemek; cefalosporinok; gliciklinek; cefamicin; penicillinek; tetraciklinek; rifamicinek; fenikolok; penem; fertőtlenítőszer	célpont módosítás, efflux pumpa, permeabilitás csökkenés
<i>sul1*,***</i>	100%	100%	szulfonamidok	célpont csere
<i>TER-2*</i>	101,06%	98,94%	karbapenemek; cefalosporinok	enzimatis inaktiváció
<i>tet33*</i>	95,82%	99,74%	tetraciklinek	efflux pumpa
<i>tetB*</i>	100%	99,5%		célpont védelem
<i>tetM*,***</i>	100%	96,4%		célpont módosítás, efflux pumpa
<i>tetR*</i>	99,52%	100%		
<i>tolC</i>	99,6%	99,8%	makrolidok; fluorokinolonok; aminoglikozidok; karbapenemek; cefalosporinok; gliciklinek; cefamicin; penicillinek; tetraciklinek; peptid antibiotikumok; aminokumarinok; rifamicinek; fenikolok; penem; fertőtlenítőszer	efflux pumpa
<i>ugd</i>	100%	98,97%	peptid antibiotikumok	célpont mutáció
<i>uhpT***</i>	100%	96,27%	foszfomicin	
<i>yojI</i>	100%	100%	peptid antibiotikumok	efflux pumpa

* plazmidon; ** fágon; *** mobilis genetikai elem (MGE)

Az azonosított gének közül összesen 57 db gén bizonyult plazmidon hordozott és 7 db gén fagon hordozott génnek. MGE-ként pedig 15 db gént azonosítottunk, a különböző mintákban voltak olyan gének, amelyek egyik esetben plazmidon, másik esetben fagon voltak hordozott gének. A plazmidon megfigyelt MGE gének közül ki kell emelni a kizárólag az érett sajtból kimutatott *sul1* gént, amely gén a szulfonamid hatóanyagokkal szemben, célpont módosítás révén alakít ki rezisztenciát. A *tetM* gén szintén csak az érett sajtmintákban volt plazmidon megtalálható és egyben MGE gén, ami a tetraciklin hatóanyagokkal szemben alakít ki célpont védelem útján rezisztenciát. Szintén ki kell emelni az aminoglikozid rezisztencia kialakításáért felelős, de csak a nyers tejmintákból kimutatott, enzimatis úton történő rezisztenciát meghatározó *APH(3'')-Ib* és *APH(6)-Id* géneket. A fagon található egyetlen MGE gén a *soxS* gén volt. Szintén jelentős az érett sajtból kimutatott, fertőtlenítőszerrel szembeni rezisztenciát kialakítani képes, efflux pumpát meghatározó, plazmidon található MGE *qacEdelta1* gén jelenléte is.

5.2. Az azonosított gének mintánkénti gyakorisága

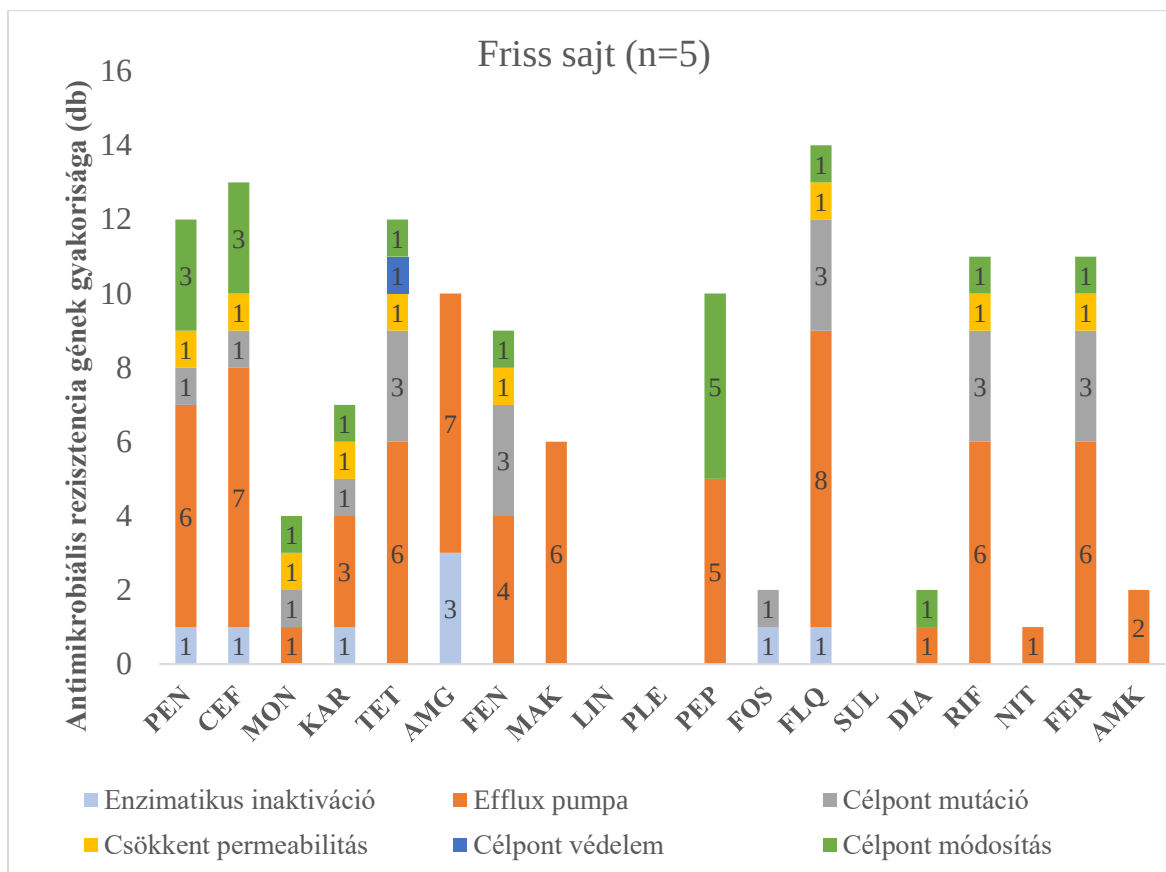
A nyers tejminták esetén azonosított gének rezisztencia mechanizmusok és hatóanyagcsoportok szerinti gyakoriságát az **1. ábra** foglalja össze. A legtöbb rezisztencia gént (30 db) a fluorokinolon hatóanyagokkal szemben azonosítottuk, azon belül is az efflux pumpákat meghatározó gének (23 db) voltak többségében. Különösen aggasztó, hogy a nyers tejmintákban elterjedt típusú ESBL gént azonosítottunk, amely az *OXA-662* gén volt (100% lefedettség, 99,3% azonosság), ez a gén enzimatis inaktiváció útján képes a penicillinekkal, a cefalosporinokkal és a karbapenemekkel szemben is kialakítani rezisztenciát. A közegészségügy számára kritikus fontosságú peptid hatóanyagokkal szemben öt esetben efflux pumpát meghatározó gént (*kpnE*, *kpnF*, *kpnG*, *kpnH*, *lptD*), öt esetben célpont módosításért felelős gént (*pmrF*, *arnT*, *bacA*, *eptB*, *ICR-Mo*) és egy esetben csökkent permeabilitást meghatározó gént (*ompA*) figyeltünk meg. Számos esetben (21 db) azonosítottunk fertőtlenítőszerrel szembeni rezisztenciáért felelős gént.



PEN-penicillinek; CEF-cefalosporinok; MON-monobaktámok; KAR-karbapenemek; TET-tetraciklinek; AMG-aminoglikozidok; FEN-fenikolok; MAK-makrolidok; LIN-linkóزامidok; PLE-pleuromutilinek; PEP-peptid antibiotikumok; FOS-foszomicin; FLQ-fluorokinolonok; SUL-szulfonamidok; DIA-diaminopirimidinek; RIF-rifamicinek; NIT-nitroimidazolok; FER-fertőtlenítőszer; AMK-aminokumarinok

1. ábra A nyers tejmintákban azonosított antimikrobiális rezisztencia gének gyakorisága, hatóanyagcsoportok és rezisztencia mechanizmusok szerint

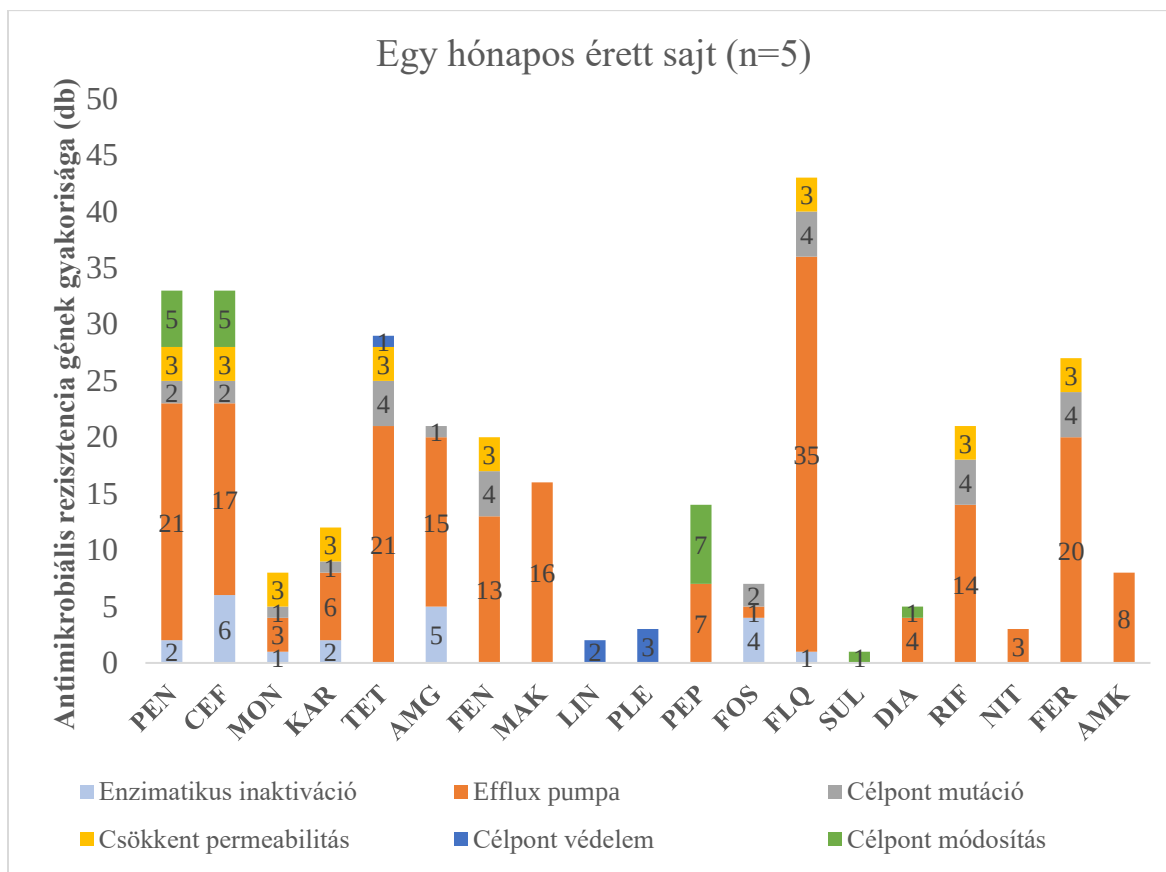
A friss tejből oltóenzim és oltókultúra (aludttej) segítségével készült friss sajt esetén jelentős mértékben megfigyelhető a rezisztóma redukálódása (**2. ábra**). A mintákban továbbra is a fluorokinolonokkal szemben rezisztenciát kialakító génekből volt a legtöbb (14 db), azon belül pedig az efflux pumpák domináltak (8 db). A széles körben elterjedt ESBL gének közül az *OXA-309* került azonosításra. A peptid hatóanyagokkal szemben ugyanazokat az efflux pumpák révén rezisztenciát kialakítani képes géneket figyeltük meg, mint a nyers tejnél; valamint a célpont módosításért felelős öt gén is megegyezett, a nyers tejnél leírtakkal. Nem tudtuk azonosítani a korábban megfigyelt linkóزامidokkal (*lmrD*, *lsaA*, *isaD*, *mdtM*) és pleuromutilinikkal (*isaD*) szemben rezisztenciát kialakító géneket. A génkészlet beszűkülése arra utal, hogy a sajt készítése során a mikroba populáció fajsztntű szelektálódása következett be.



PEN-penicillinek; CEF-cefalosporinok; MON-monobaktámok; KAR-karbapenemek; TET-tetraciklinek; AMG-aminoglikozidok; FEN-fenikolok; MAK-makrolidok; LIN-linkóزامidok; PLE-pleuromutilinek; PEP-peptid antibiotikumok; FOS-foszfomicin; FLQ-fluorokinolonok; SUL-szulfonamidok; DIA-diaminopirimidinek; RIF-rifamicinek; NIT-nitroimidazolok; FER-fertőtlenítőszer; AMK-aminokumarinok

2. ábra A friss sajt mintákban azonosított antimikrobiális rezisztencia gének gyakorisága, hatóanyagcsoportok és rezisztencia mechanizmusok szerint

Az egy hónapig érlelt sajtból vett minták vizsgálata során a rezisztóma jelentős feldúsulását figyeltük meg (**3. ábra**). Összesen 35-féle efflux pumpa működését meghatározó rezisztencia gént azonosítottunk fluorokinolonokkal szemben. A peptid antibiotikumokkal szemben efflux pumpa révén rezisztencia kialakításáért már összességében hétféle gént azonosítottunk (*kpnE*, *kpnF*, *kpnG*, *kpnH*, *lptD*, *tolC*, *yojI*), valamint a célpont módosításért felelős gének száma hétre nőtt (*arnT*, *bacA*, *eptA*, *aptB*, *ICR-Mo*, *pmrF*, *ugd*). Az aminoglikozidok enzimatis inaktivációjáért felelős *AAC(6')-Ii*, *AAC(6')-Iih* gén kizárólag az érett sajtban jelent meg, tehát feltételezhetően kontamináció útján került a termékbe. Ugyanez igaz a penicillinek, cefalosporinok és karbapenemek enzimatis inaktivációjáért felelős *ACT-5* génre, vagy a kizárólag cefalosporinok enzimatis inaktivációjáért felelős *EC-14* génre; illetve a penicillinek, cefalosporinok és monobaktámokkal szemben enzimatis úton rezisztenciát kialakító *OXY*-típusú génekre.

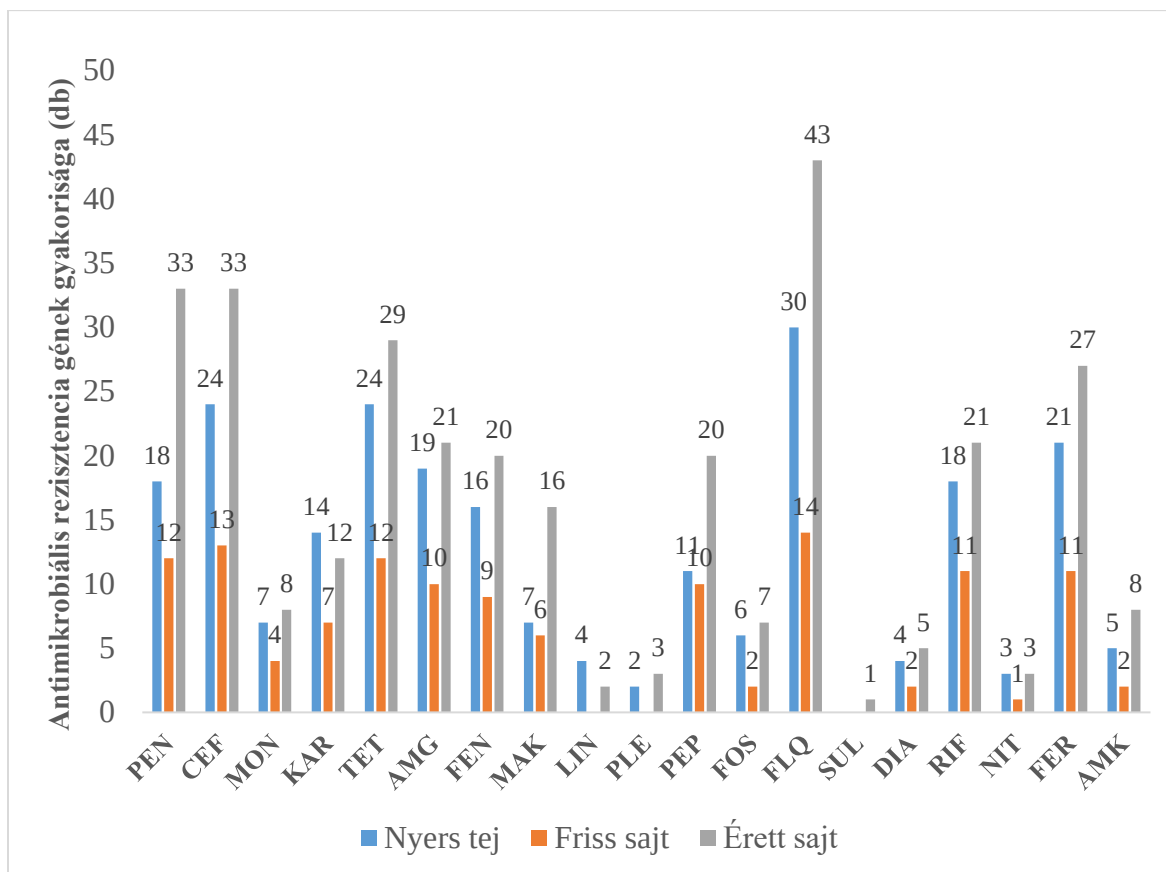


PEN-penicillinek; CEF-cefalosporinok; MON-monobaktámok; KAR-karbapenemek; TET-tetraciklinek; AMG-aminoglikozidok; FEN-fenikolok; MAK-makrolidok; LIN-linkóزامidok; PLE-pleuromutilinek; PEP-peptid antibiotikumok; FOS-foszfomicin; FLQ-fluorokinolonok; SUL-szulfonamidok; DIA-diaminopirimidinek; RIF-rifamicinek; NIT-nitroimidazolok; FER-fertőtlenítőszeres; AMK-aminokumarinok

3. ábra Az egy hónapig érlelt sajt mintákban azonosított antimikrobiális rezisztencia gének gyakorisága, hatóanyagcsoportok és rezisztencia mechanizmusok szerint

5.3. Az azonosított gének hatóanyag csoportonkénti gyakorisága

Amennyiben összesítjük hatóanyag-csoportonként a gének gyakoriságát az egyes mintákban (4. ábra), megfigyelhetjük, hogy a legtöbb rezisztencia gén az érett sajtban, a fluorokinolonokkal szemben volt azonosítható. A penicillinek és a cefalosporinok esetében jelentős mértékű rezisztencia gén feldúsulás figyelhető meg az érett sajtban (33 db). Ezzel szemben a monobaktámok, a karbapenemek, a linkóزامidok, a pleuromutilinek, a foszfomicin, a diaminopirimidinek és a nitrofuránok esetén hasonló géngyakoriság volt megfigyelhető végig, az eltérő mintákban. A szulfonamidokkal szemben rezisztenciát kialakító *sul1* gén (100% lefedettség, 100% azonosság) kizárólag az érett sajt minták közül egy esetben volt kimutatható, ami lehetséges kontamináció következménye.

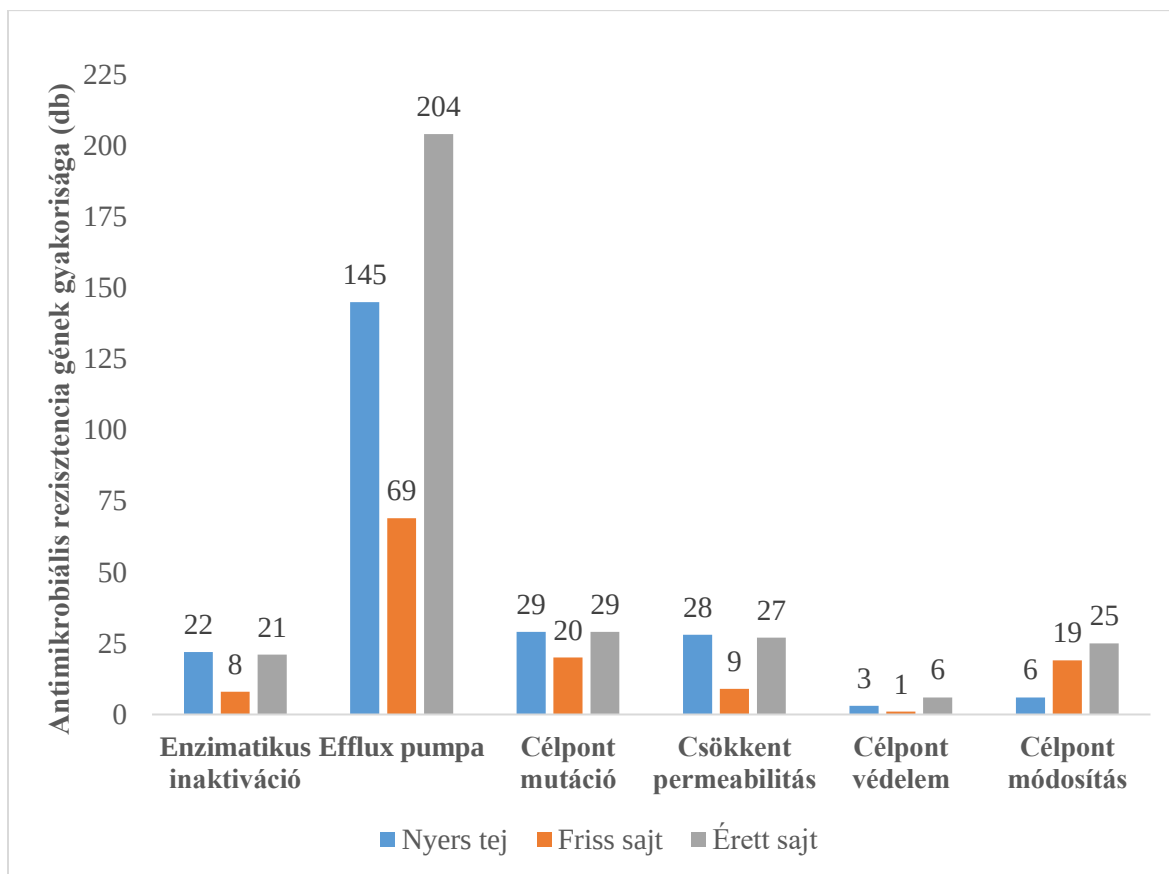


PEN-penicillinek; CEF-cefalosporinok; MON-monobaktámok; KAR-karbapenemek; TET-tetraciklinek; AMG-aminoglikozidok; FEN-fenikolok; MAK-makrolidok; LIN-linkóزامidok; PLE-pleuromutilinek; PEP-peptid antibiotikumok; FOS-foszfomicin; FLQ-fluorokinolonok; SUL-szulfonamidok; DIA-diaminopirimidinek; RIF-rifamicinek; NIT-nitroimidazolok; FER-fertőtlenítőszeres; AMK-aminokumarinok

4. ábra Az egyes mintákban az egyes hatóanyagcsoportokkal szemben rezisztenciát kialakító gének gyakoriságának összesítése

5.4. Az azonosított gének rezisztencia mechanizmusonkénti gyakorisága

Amennyiben az összes előforduló gént az összes hatóanyagcsoportra nézve összesítjük a rezisztencia mechanizmusok alapján, az egyes termékekben (**5. ábra**), akkor az efflux pumpákat meghatározó gének gyakorisága dominál. Ezen kívül az efflux pumpákért, a célpont védelemért és a célpont módosításért felelős gének feldúsulása volt megfigyelhető a termékpálya során. Ellenben az enzimatis inaktiváció, a célpont mutáció és a csökkent permeabilitás esetén stagnálás volt megfigyelhető a génösszetételben.



5. ábra Az egyes mintákban azonosított rezisztencia mechanizmusért felelős gének összességének gyakorisága, minden hatóanyagcsoportot összesítve

6. KÖVETKEZTETÉSEK

A tejipar gazdasági és közegészségügyi jelentőségét mutatja, hogy 2021-ben az EU-ban 16,4 millió tonna zsírszegény és 61,4 millió tonna teljes tej felhasználásával 10,4 millió tonna sajtot állítottak elő [23]. Bár a kezeletlen tejipari termékek iránti igény, azok pozitív élettani hatásai miatt folyamatosan nő [26], a nyers tej fogyasztásának számos kedvező egészségügyi hatása ellenére [85–87], továbbra is komoly egészségügyi kockázatot jelent olyan zoonotikus megbetegedésekre nézve, mint a shiga toxint termelő *E. coli*, a *Camphylobacter* vagy a *Salmonella enterica* [88–92]. Liu és mtsai. munkájuk során bizonyították cefalosporin rezisztenciáért felelős génnek nyers tejből való géntranszferét a bélmikrobiom részét képező *E. coli* törzsekbe [25]. Vizsgálataink során a nyers tej és az abból készült tejtermékek termelés helyétől a fogyasztóig történő ARG készlet változásának nyomon követését tűztük ki célul, amely során összesen 112-féle ARG-t azonosítottunk. Nyers tej esetén 31-féle ARG-t mutattunk ki, Tóth és mtsai. kutatásuk során ugyancsak nyers tejből 48-féle ARG-t azonosítottak [35], Andriyanov és mtsai. hozzánk hasonló módon 29-féle ARG-t azonosítottak [93]. Vizsgálataink során összesen 19 db olyan ARG-t mutattunk ki a mintákból, amelyek β -laktamáz termelésért felelősek, ezek közül két olyan gént azonosítottunk (OXA-662, OXA-309), amelyek ESBL génnek minősülnek. Tóth és mtsai. plazmidon található és egyben MGE PC1-béta-laktamáz (*blaZ*) gént azonosítottak [35], amit Aragao és mtsai. nyers kecskesajtból mutattak ki [94], mi viszont ezt a géncsaládot nem tudtuk kimutatni, azonban összesen öt béta-laktamáz termelésért felelős géncsaládot (*ACT*, *TER*, *OXA*, *ORN*, *CMY*) azonosítottunk, amelyekből plazmidon megtalálható géneket mutattunk ki. Különösen aggasztó az ESBL termelésért felelős OXA-662 gén plazmidon való hordozása. Andriyanov és mtsai. a mi eredményeinkhez képest négy eltérő β -laktamáz (*B-18*, *CME-12*, *GOB-41*, *csp-1*) termelésért felelős gént azonosítottak [93]. Elafify és mtsai. nyers tej és tejtermékekben ESBL termelésért felelős *CTX-M-15*, *CTX-M-14*, *SHV-14* géneket azonosítottak [95].

Oniciuc és mtsai. glikopeptid rezisztenciáért felelős *vanRM*, *vanUG*, *vanXYC*, *vanYB*, *vanTC* géneket azonosítottak nyers tej és tejtermékekből [96], vizsgálataink során a mintáinkban nem érték el az azonossági küszöbértéket ezek a gének. A tetraciklin hatóanyagokkal szembeni célpont védelemért felelős *tetM* gént az összes mintából kimutattuk, Ning és mtsai. nyers tejből szintén kimutatták a jelenlétét [97]. Ez a gén az érett sajtmintákban plazmidon volt megtalálható, ezen kívül MGE is volt egyben. Az efflux pumpát meghatározó *tetB* gént azonban csak a nyers tejben tudtuk kimutatni, Oniciuc és

mtsai. emellett *tetA* és *tetO* géneket is azonosítottak [96], Rodrigues és mtsai. pedig nyers tejből és sajtból azonosítottak efflux pumpát meghatározó *tetK* gént [98]. Tóth és mtsai. plazmidon megtalálható *tet38* gént mutattak ki nyers tejmintákból, amely tetraciklinek sejtből való kipumpálásáért felelős gén [35], egy másik vizsgálatukban szintén ezt a gént plazmidon írták le [102], a mi vizsgálatainkban *tet33* gént azonosítottunk több mintában, ami szintén plazmidon volt megtalálható. Az aminoglikozidok enzimatis inaktivációjáért felelős gének közül a nyers tejben és az érett sajtban az *AAC(6')-If* gén; viszont a *AAC(6')-Ii* és *AAC(6')-Iih* géneket csak az érett sajtban mutattuk ki, az *aadA27*, az *APH(3'')-Ib* és az *APH(6)-Id* gének pedig elsősorban a nyers tejben voltak megtalálhatók, az *ANT(3'')-Iic* gén pedig kizárólag a nyers tejben volt megfigyelhető. Ashraf és mtsai. nyers tej és tejtermék mintákban kimutatták az *AAC(6')-APH(2'')* génkomplex jelenlétét [73], amelyet különböző állati eredetű nyers tejfélékben Liu és mtsai. is detektáltak [99]. Endre és mtsai. az *AAC(6')* gén jelenlétét kimutatták nyers juhtej és abból készült sajt mintákban [100]. Parry-Hanson Kunadu és mtsai. nyers sajtból *AAC(6')-Iy* gént mutattak ki [101].

A fluorokinolon hatóanyagokkal szembeni rezisztenciáért felelős gének közül valamennyi mintában azonosítottuk az efflux pumpákat meghatározó *emrA*, *emrB*, *emrR*, *mdtH*, *patA*, *patB* géneket; a csökkent permeabilitásért felelős és egyben efflux pumpát meghatározó *marA* gént; viszont a *ramA* gén csak a nyers tejmintákban és érett sajt mintákban volt megtalálható. A széles körben elterjedt, multidrug rezisztenciáért felelős, efflux pumparendszert és célpont módosítást meghatározó *acR-tolC* és *soxR* gének az összes mintában kimutathatóak voltak, hasonló módon a permeabilitást is csökkentő *soxS* génhez. A fluorokinolonokkal és tetraciklinekkel efflux pumpa révén rezisztencia kialakítását meghatározó *adeF* gént az összes mintából kimutattuk, Andriyanov és mtsai. nyers tejmintákban szintén azonosították ezt a gént [93]. A fluorokinolonokkal szemben efflux pumpa által rezisztenciát meghatározó *abaQ* gént csak a nyers tejmintákban azonosítottuk, hasonló módon, mint Tóth és mtsai. [102].

Az ilyen rezisztencia gének horizontális géntranszfer útján történő átugrása a bélmikrobiom alkotóiba komoly közegészségügyi kockázatot hordozhat. A *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) 2019-es jelentése szerint az USA-ban évente 2,8 millió fertőzés köthető bizonyítottan antibiotikum-rezisztens fertőzéshez, amiből 35 000 eset végzetes kimenetelű [103]. Mind az állatok és az emberek bélrendszere lehet olyan baktériumok hordozója, amelyek antibiotikum-rezisztencia rezervoárjai lehetnek, amely rezisztencia származhat belső (*intrinsic*) vagy külső (*extrinsic*) ARG hordozásból [104]. Az

intrinsic antibiotikum rezisztencia egy természetes jelenség, amely minden baktériumfajban kimutatható, a baktérium külső membránja, valamint efflux pumpák által mediált folyamat. A rezisztencia kialakulását a spontán mutációk, rekombináció, valamint a horizontális géntranszfer mellett az alacsony dózisban alkalmazott antibiotikumok indukálhatják [30].

Eredményeink azt mutatják, hogy az ARG-k nem csak a nyers tejben, hanem az abból készült nyers tejtermékekben is jelen lehetnek, sőt azok hosszabb időn keresztüli érlelése a rezisztencia génkészlet gyakoriságának feldúsulásához vezet. Ez felveti az olyan további vizsgálatok szükségét, amelyek magyarázatot adnak arra, hogy a kiindulási génkészlet az állati szervezetből vagy a kifejtést követően kerül a mintákba, továbbá a kizárólag az érett sajt minták esetén tapasztalt gének forrásának felkutatása szintén kritikusan fontos pont. A nagymértékű fertőtlenítőszerrel szembeni rezisztencia génhordozás pedig a szarvasmarhák tőgybimbójának, illetve a fejőberendezések fertőtlenítésére használt vegyületekkel kapcsolatos összefüggések feltárásában adnak nyitott kérdéseket.

A nyers tejtermékekben a mikrobák szaporodása nem gátolt, ami a rezisztenciagének felszaporodásának egyik lehetséges magyarázata lehet, amely nagymértékű növekedés megnöveli a horizontális géntranszfer kockázatát, amely még komolyabb kockázatot jelent a nagyszámú MGE jelenlétében.

Az ARG-k átvitelében vannak természetes korlátozó tényezők [105], amelyek közül a legfontosabb az azonos fizikai tér, a baktérium populációk ún. minimális kritikus sűrűségével [106]. Szintén korlátozó tényező az egyes ARG-k hordozásának és az általuk kifejeződő mechanizmusok energia-költsége, amely gének fenntartása csak akkor lesz sikeres, ha az a baktériumok evolúciós előnyével jár [105]. A bélmikrobiom tejből, tejtermékből történő tejrezisztóma átvétele csak transzformáció és transzdukciónak formájában valósulhat meg, amennyiben azokat pasztörizálják, ezzel szemben a nyers tej és tejtermékek magas élő bakteriótája megnöveli a konjugáció esélyét [107].

Eredményeink rámutatnak a hőkezeletlen termékek lehetséges szerepére az antimikrobiális rezisztencia gének által történő állati termékek és humán kórokozók között megvalósuló konjugáció lehetőségében. Kutatásunk alátámasztja további, nagyobb mintaelemszámmal, a termékpálya több, kritikus pontján történő mintavétel mellett, szélesebb körű vizsgálatok végzésének szükségességét. Az Egy Egészség tükrében a jövőben még nagyobb hangsúlyt kell fektetni az élelmiszerbiztonságra, amihez közös gondolkodásra és kutatásokra van szükség az állat- és közegészségügyben.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A 21. század egyik legalapvetőbb társadalmi igénye a megfelelő élelmiszerbiztonság, amely ma már szétválaszthatatlanul összekapcsolódik az állati és emberi veszélyforrások feltérképezésével. Ilyen kockázati tényező a 21. század meghatározó globális problémája, az antimikrobiális rezisztencia és az annak hátterében levő rezisztencia gének potenciális terjedésének lehetősége az élelmiszerek útján.

A nyers tej és az abból készült nyers tejtermékek iránti fogyasztói igények jelentős mértékben nőttek, az egészségügyi kockázatok ellenére, azok tápanyagösszetételét és ízét illető pozitív hatásuk következtében. Bár számos jótékony hatását írták le a nyers termékek fogyasztásának, nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a nyers tej és tejtermékek fogyasztása súlyos egészségügyi kockázattal jár, hiszen kiváló forrásai lehetnek az átvihető bakteriális, vírusos és protozoás megbetegedéseknek, amelyek egyben antimikrobiális rezisztenciagéneket is hordozhatnak magukban. Kutatásunk során célul tűztük ki, hogy a tejfeldolgozáson keresztül („szántóföldtől az asztalig”) nyomon követjük egy tejtermelő kisk gazdaság nyers tej és abból készült nyers tejtermékeinek az antimikrobiális rezisztencia génkészlet változását egészen a fogyasztóig, új generációs szekvenálás segítségével.

Vizsgálataink során minden esetben öt párhuzamos mintavételezést követően vizsgáltuk a minták rezisztencia génkészletét, valamint azok fagon vagy plazmidon való hordozását, illetve azok potenciális mobilitását. Összességében mintegy 112-féle antimikrobiális rezisztencia gént azonosítottunk. Megfigyeltük, hogy a nyers tejmintákhoz képest, az abból készült nyers sajt rezisztencia génkészlete jelentősen csökkent, azonban ennek egy hónapos érlelését követően jelentős mértékű feldúsulást tapasztaltunk, ami a kezdeti géngyakoriságot is meghaladta. Különösen aggasztó, hogy a mintákban kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) géneket is azonosítottunk, mint az *OXA-662* gén (100% lefedettség, 99,3% azonosság) és az *OXA-309* gén (97,1% lefedettség, 96,2% azonosság). Megfigyeltük, hogy volt olyan gén, amely csak az egy hónapos érlelés után jelent meg a termékben (*sul1*), ami kontaminációra utal. Mindegyik minta esetén a fluorokinolonokkal szembeni, azon belül pedig az efflux pumpák működését szabályozó gének fordultak elő a leggyakrabban.

Összességében elmondhatjuk, hogy kutatásunk létjogosultságát támasztja alá a termékpálya során tapasztalt génkészlet változás, valamint a nyers termékek közvetítésével potenciálisan bekövetkező horizontális géntranszfer lehetősége. Különösen aggasztó az ESBL gének jelenléte. Mindenképpen megfontolandó az élelmiszerbiztonság új szemléletű megközelítése és vizsgálata új generációs szekvenálás segítségével.

8. SUMMARY

One of the most fundamental societal needs of the 21st century is adequate food safety, which is now inextricably linked to the mapping of animal and human hazards. One such risk factor is the defining global problem of the 21st century, the potential spread of antimicrobial resistance and its underlying resistance genes through food.

Consumer demand for raw milk and raw dairy products derived from raw milk has increased significantly, despite the health risks, due to their positive impact on nutritional composition and taste. Although many benefits of consuming raw products have been described, it should not be overlooked that the consumption of raw milk and dairy products poses serious health risks as they can be an excellent source of transmissible bacterial, viral, and protozoal diseases, which may also carry antimicrobial resistance genes. In our research, we aimed to track the antimicrobial resistance gene pool changes in raw milk and raw milk products from a small dairy farm through milk processing ("from field to table") to the consumer, using next-generation sequencing.

In each of our studies, we tested the resistance gene pool of the samples, as well as their phage or plasmid carriage and potential mobility, following five parallel sampling runs. In total, we identified about 112 antimicrobial resistance genes. We observed a significant reduction in the resistance gene pool of raw cheese compared to raw milk samples. Still, after one month of ripening, significant enrichment was observed, exceeding the initial gene frequency. Of particular concern, we also identified extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes in the samples, such as the *OXA-662* gene (100% coverage, 99.3% identity) and the *OXA-309* gene (97.1% coverage, 96.2% identity). We observed that there was a gene that appeared in the product only after one month of maturation (*sul1*), indicating contamination. In all samples, the genes regulating the function of the efflux pumps against fluoroquinolones were the most frequent.

In conclusion, the validity of our study is supported by the variation in the gene pool observed during the product pathway and the potential for horizontal gene transfer through the raw products. Of particular concern is the presence of ESBL genes. A new approach and food safety investigation using next-generation sequencing should be considered.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Khuyen VTK, Le DV, Fischer AR, Dornack C (2021) Comparison of Microplastic Pollution in Beach Sediment and Seawater at UNESCO Can Gio Mangrove Biosphere Reserve. *Glob Chall* 5:2100044. <https://doi.org/10.1002/gch2.202100044>
2. Bonnedahl J, Järhult JD (2014) Antibiotic resistance in wild birds. *Upsala Journal of Medical Sciences* 119:113–116. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.905663>
3. Zurfluh K, Albini S, Mattmann P, Kindle P, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R, Vogler BR (2019) Antimicrobial resistant and extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* in common wild bird species in Switzerland. *Microbiologyopen* 8:e845. <https://doi.org/10.1002/mbo3.845>
4. Plaza-Rodríguez C, Kaesbohrer A, Tenhagen B-A (2019) Probabilistic model for the estimation of the consumer exposure to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* due to cross-contamination and recontamination. *Microbiologyopen* 8:e900. <https://doi.org/10.1002/mbo3.900>
5. Gil-Gil T, Laborda P, Sanz-García F, Hernando-Amado S, Blanco P, Martínez JL (2019) Antimicrobial resistance: A multifaceted problem with multipronged solutions. *Microbiologyopen* 8:e945. <https://doi.org/10.1002/mbo3.945>
6. McEwen SA, Collignon PJ (2018) Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr* 6:. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
7. Antimicrobial use on Australian dairy cattle farms - A survey of veterinarians - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35325612/>. Accessed 23 Jul 2023
8. Mohammadian F, Rahmani HK, Bidarian B, Khoramian B (2022) Isolation and evaluation of the efficacy of bacteriophages against multidrug-resistant (MDR), methicillin-resistant (MRSA) and biofilm-producing strains of *Staphylococcus aureus* recovered from bovine mastitis. *BMC Vet Res* 18:406. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03501-3>
9. Graveland H, Wagenaar JA, Heesterbeek H, Mevius D, van Duinkerken E, Heederik D (2010) Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in veal calf farming: human MRSA carriage related with animal antimicrobial usage and farm hygiene. *PLoS One* 5:e10990. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010990>
10. Locatelli C, Cremonesi P, Caprioli A, Carfora V, Ianzano A, Barberio A, Morandi S, Casula A, Castiglioni B, Bronzo V, Moroni P (2017) Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dairy cattle herds, related swine farms, and humans in contact with herds. *J Dairy Sci* 100:608–619. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11797>
11. Schnitt A, Tenhagen B-A (2020) Risk Factors for the Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Dairy Herds: An Update. *Foodborne Pathog Dis* 17:585–596. <https://doi.org/10.1089/fpd.2019.2638>
12. Hanssen A-M, Kjeldsen G, Sollid JUE (2004) Local Variants of *Staphylococcal* Cassette Chromosome *mec* in Sporadic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococci*: Evidence of Horizontal Gene Transfer? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48:285–296. <https://doi.org/10.1128/aac.48.1.285-296.2004>
13. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Fernández Escámez PS, Girones R, Koutsoumanis K, Lindqvist R, Nørrung B, Robertson L, Ru G, Sanaa M, Simmons M, Skandamis P, Snary E, Speybroeck N, Kuile BT, Threlfall J, Wahlström H, Bengtsson B, Bouchard D, Randall L, Tenhagen B-A, Verdon E, Wallace J, Brozzi R, Guerra B, Liebana E, Stella P, Herman L (2017) Risk for the development of Antimicrobial Resistance (AMR) due to feeding of calves with milk containing residues of antibiotics. *EFSA J* 15:e04665. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4665>
14. Anderson KL, Lyman RL, Bodeis-Jones SM, White DG (2006) Genetic diversity and antimicrobial susceptibility profiles among mastitis-causing *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples. *Am J Vet Res* 67:1185–1191. <https://doi.org/10.2460/ajvr.67.7.1185>
15. Activity of selected antimicrobial agents against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections that produce beta-lactamase - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9149974/>. Accessed 10 Aug 2023
16. Güler L, Ok Ü, Gündüz K, Gülcü Y, Hadimli HH (2005) Antimicrobial Susceptibility and Coagulase Gene Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Clinical Mastitis Cases in Turkey. *Journal of Dairy Science* 88:3149–3154. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72998-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72998-2)
17. Myllyniemi A-L, Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, Lääkelaitos (2007) FINRES-Vet 2005-2006: Finnish veterinary antimicrobial resistance monitoring and consumption of antimicrobial agents. Finnish Food Safety Authority Evira : National Agency for Medicines, Helsinki
18. Saini V, McClure JT, Scholl DT, DeVries TJ, Barkema HW (2012) Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci* 95:1921–1929. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5065>
19. Wang Y, Wu C-M, Lu L-M, Ren G-WN, Cao X-Y, Shen J-Z (2008) Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Microbiol* 130:118–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.012>

20. Wang Y, Wu C-M, Lu L-M, Ren G-WN, Cao X-Y, Shen J-Z (2008) Macrolide-lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Microbiol* 130:118–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.12.012>
21. Makovec JA, Ruegg PL (2003) Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. *J Dairy Sci* 86:3466–3472. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73951-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73951-4)
22. Sabour PM, Gill JJ, Lepp D, Pacan JC, Ahmed R, Dingwell R, Leslie K (2004) Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. *J Clin Microbiol* 42:3449–3455. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3449-3455.2004>
23. Milk and milk product statistics. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Milk_and_milk_product_statistics. Accessed 6 Aug 2023
24. Smith R (2015) Regulation (EC) No 883/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004. In: Core EU Legislation. Macmillan Education UK, London, pp 288–318
25. Liu J, Zhu Y, Jay-Russell M, Lemay DG, Mills DA (2020) Reservoirs of antimicrobial resistance genes in retail raw milk. *Microbiome* 8:99. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00861-6>
26. de Klerk JN, Robinson PA (2022) Drivers and hazards of consumption of unpasteurised bovine milk and milk products in high-income countries. *PeerJ* 10:e13426. <https://doi.org/10.7717/peerj.13426>
27. Tóth AG, Csabai I, Maróti G, Jerzsele Á, Dubecz A, Patai ÁV, Judge MF, Nagy SÁ, Makrai L, Bánya K, Szita G, Solymosi N (2020) A glimpse of antimicrobial resistance gene diversity in kefir and yoghurt. *Sci Rep* 10:22458. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80444-5>
28. Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM (2008) High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* 57:1605–1615. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.133603>
29. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4073975/>. Accessed 25 Aug 2023
30. Cox G, Wright GD (2013) Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* 303:287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
31. 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. *Appl Environ Microbiol* 82:6672–6681. <https://doi.org/10.1128/AEM.01802-16>
32. The human gut resistome: Current concepts & future prospects - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6902357/>. Accessed 23 Jul 2023
33. Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blázquez J (2013) Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology* 303:293–297. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.004>
34. Cuny C, Köck R, Witte W (2013) Livestock associated MRSA (LA-MRSA) and its relevance for humans in Germany. *Int J Med Microbiol* 303:331–337. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.010>
35. Tóth AG, Csabai I, Krikó E, Tózsér D, Maróti G, Patai ÁV, Makrai L, Szita G, Solymosi N (2020) Antimicrobial resistance genes in raw milk for human consumption. *Sci Rep* 10:7464. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63675-4>
36. (2015) Scientific Opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk | EFSA. <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3940>. Accessed 6 Aug 2023
37. Cosciani-Cunico E, Dalzini E, Ducoli S, Sfameni C, Bertasi B, Losio M-N, Daminelli P, Varisco G (2015) Behaviour of *Listeria Monocytogenes* and *Escherichia Coli* O157:H7 During the Cheese Making of Traditional Raw-Milk Cheeses from Italian Alps. *Ital J Food Saf* 4:4585. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.4585>
38. Wulsten IF, Galeev A, Stingl K (2020) Underestimated Survival of *Campylobacter* in Raw Milk Highlighted by Viability Real-Time PCR and Growth Recovery. *Front Microbiol* 11:1107. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01107>
39. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q (2009) Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol* 4:189–200. <https://doi.org/10.2217/17460913.4.2.189>
40. Abd El-Ghany WA (2019) One health approach of campylobacteriosis in Egypt: An emerging zoonotic disease. *J Infect Dev Ctries* 13:956–960. <https://doi.org/10.3855/jidc.11860>
41. Blackshaw K, Valtchev P, Koolaji N, Berry N, Schindeler A, Dehghani F, Banati RB (2021) The risk of infectious pathogens in breast-feeding, donated human milk and breast milk substitutes. *Public Health Nutr* 24:1725–1740. <https://doi.org/10.1017/S1368980020000555>
42. Edrington TS, Garcia Buitrago JA, Hagevoort GR, Loneragan GH, Bricia-Harhay DM, Callaway TR, Anderson RC, Nisbet DJ (2018) Effect of waste milk pasteurization on fecal shedding of *Salmonella* in preweaned calves. *J Dairy Sci* 101:9266–9274. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14668>
43. Venegas-Vargas C, Henderson S, Khare A, Mosci RE, Lehnert JD, Singh P, Ouellette LM, Norby B, Funk JA, Rust S, Bartlett PC, Grooms D, Manning SD (2016) Factors Associated with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Shedding by Dairy and Beef Cattle. *Appl Environ Microbiol* 82:5049–5056. <https://doi.org/10.1128/AEM.00829-16>

44. Stephan R, Schumacher S, Corti S, Krause G, Danuser J, Beutin L (2008) Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level. *J Dairy Sci* 91:2561–2565. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1055>
45. Bertuso P de C, Marangon CA, Nitschke M (2022) Susceptibility of Vegetative Cells and Endospores of *Bacillus cereus* to Rhamnolipid Biosurfactants and Their Potential Application in Dairy. *Microorganisms* 10:1860. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091860>
46. Efimochkina NR, Batishcheva SI, Bykova IB, Sheveleva SA (2012) [The significance of some potentially pathogenic microorganisms in occurrence of food toxicoinfections. Report 2. Assessment of the role of toxigenic strains of *Bacillus cereus*]. *Vopr Pitan* 81:24–29
47. Khurana SK, Sehrawat A, Tiwari R, Prasad M, Gulati B, Shabbir MZ, Chhabra R, Karthik K, Patel SK, Pathak M, Iqbal Yattoo M, Gupta VK, Dhama K, Sah R, Chaicumpa W (2021) Bovine brucellosis - a comprehensive review. *Vet Q* 41:61–88. <https://doi.org/10.1080/01652176.2020.1868616>
48. Pascual DW, Goodwin ZI, Bhagyaraj E, Hoffman C, Yang X (2022) Activation of mucosal immunity as a novel therapeutic strategy for combating brucellosis. *Front Microbiol* 13:1018165. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1018165>
49. Saidu AS, Mahajan NK, Musallam II, Holt HR, Guitian J (2021) Epidemiology of bovine brucellosis in Hisar, India: identification of risk factors and assessment of knowledge, attitudes, and practices among livestock owners. *Trop Anim Health Prod* 53:450. <https://doi.org/10.1007/s11250-021-02884-z>
50. Swetha CS, Porteen K, Elango A, Ronald BSM, Senthil Kumar TMA, Milton AP, Sureshkannan S (2021) Genetic diversity, virulence and distribution of antimicrobial resistance among *Listeria monocytogenes* isolated from milk, beef, and bovine farm environment. *Iran J Vet Res* 22:1–8. <https://doi.org/10.22099/ijvr.2020.37618.5472>
51. Chen Y, Chen M, Wang J, Wu Q, Cheng J, Zhang J, Sun Q, Xue L, Zeng H, Lei T, Pang R, Ye Q, Wu S, Zhang S, Wu H, Li W, Kou X (2020) Heterogeneity, Characteristics, and Public Health Implications of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods and Pasteurized Milk in China. *Front Microbiol* 11:642. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00642>
52. Collins AB, Floyd S, Gordon SV, More SJ (2022) Prevalence of *Mycobacterium bovis* in milk on dairy cattle farms: An international systematic literature review and meta-analysis. *Tuberculosis (Edinb)* 132:102166. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2022.102166>
53. Ortiz AP, Perea C, Davalos E, Velázquez EF, González KS, Camacho ER, García Latorre EA, Lara CS, Salazar RM, Bravo DM, Stuber TP, Thacker TC, Robbe-Austerman S (2021) Whole Genome Sequencing Links *Mycobacterium bovis* From Cattle, Cheese and Humans in Baja California, Mexico. *Front Vet Sci* 8:674307. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.674307>
54. Oliveira R, Pinho E, Almeida G, Azevedo NF, Almeida C (2022) Prevalence and Diversity of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* Enterotoxins in Raw Milk From Northern Portugal. *Front Microbiol* 13:846653. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.846653>
55. Alghizzi M, Shami A (2021) The prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in milk and dairy products in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci* 28:7098–7104. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.004>
56. Li X, Zhou Y, Zhan X, Huang W, Wang X (2017) Breast Milk Is a Potential Reservoir for Livestock-Associated *Staphylococcus aureus* and Community-Associated *Staphylococcus aureus* in Shanghai, China. *Front Microbiol* 8:2639. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02639>
57. Schiemann DA (1978) Association of *Yersinia enterocolitica* with the manufacture of cheese and occurrence in pasteurized milk. *Appl Environ Microbiol* 36:274–277. <https://doi.org/10.1128/aem.36.2.274-277.1978>
58. Longenberger AH, Gronostaj MP, Yee GY, Johnson LM, Lando JF, Voorhees RE, Waller K, Weltman AC, Moll M, Lyss SB, Cadwell BL, Gladney LM, Ostroff SM (2014) *Yersinia enterocolitica* infections associated with improperly pasteurized milk products: southwest Pennsylvania, March–August, 2011. *Epidemiol Infect* 142:1640–1650. <https://doi.org/10.1017/S0950268813002616>
59. Bettini A, Mancin M, Mazzucato M, Schanung A, Colorio S, Tavella A (2022) A Seroepidemiological Survey of *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in South Tyrol, Italy. *Pathogens* 11:1314. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111314>
60. Kirkeby C, Halasa T, Farre M, Chehabi GN, Græsbøll K (2021) Transmission Dynamics of *Corynebacterium* spp. Within Two Danish Dairy Cattle Herds. *Front Vet Sci* 8:735345. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.735345>
61. Le Doare K, Kampmann B (2014) Breast milk and Group B streptococcal infection: vector of transmission or vehicle for protection? *Vaccine* 32:3128–3132. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.020>
62. Cobo-Angel CG, Jaramillo-Jaramillo AS, Palacio-Aguilera M, Jurado-Vargas L, Calvo-Villegas EA, Ospina-Loaiza DA, Rodriguez-Lecompte JC, Sanchez J, Zadoks R, Ceballos-Marquez A (2019) Potential group B *Streptococcus* interspecies transmission between cattle and people in Colombian dairy farms. *Sci Rep* 9:14025. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50225-w>
63. Boughattas S (2017) Toxoplasma infection and milk consumption: Meta-analysis of assumptions and evidences. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57:2924–2933. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1084993>

64. Iacobucci E, Taus NS, Ueti MW, Sukhbaatar L, Bastsukh Z, Papageorgiou S, Fritz H (2019) Detection and genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* DNA within the milk of Mongolian livestock. *Parasitol Res* 118:2005–2008. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06306-w>
65. Ursini T, Moro L, Requena-Méndez A, Bertoli G, Buonfrate D (2020) A review of outbreaks of cryptosporidiosis due to unpasteurized milk. *Infection* 48:659–663. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01426-3>
66. Laberge I, Griffiths MW, Griffiths MW (1996) Prevalence, detection and control of *Cryptosporidium parvum* in food. *Int J Food Microbiol* 32:1–26. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00977-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00977-4)
67. Hennechart-Collette C, Gonzalez G, Fourniol L, Fraisse A, Beck C, Moutailler S, Bournez L, Dheilly NM, Lacour SA, Lecollinet S, Martin-Latil S, Perelle S (2022) Method for tick-borne encephalitis virus detection in raw milk products. *Food Microbiol* 104:104003. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104003>
68. The European Union One Health 2020 Zoonoses Report - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36329690/>. Accessed 6 Aug 2023
69. Brown K, Mugoh M, Call DR, Omulo S (2020) Antibiotic residues and antibiotic-resistant bacteria detected in milk marketed for human consumption in Kibera, Nairobi. *PLoS One* 15:e0233413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233413>
70. Nikoloudaki O, Lemos Junior WJF, Campanaro S, Di Cagno R, Gobetti M (2021) Role prediction of Gram-negative species in the resistome of raw cow's milk. *Int J Food Microbiol* 340:109045. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109045>
71. Praça J, Furtado R, Coelho A, Correia CB, Borges V, Gomes JP, Pista A, Batista R (2023) *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and Coagulase Positive Staphylococci in Cured Raw Milk Cheese from Alentejo Region, Portugal. *Microorganisms* 11:322. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020322>
72. Bastam MM, Jalili M, Pakzad I, Maleki A, Ghafourian S (2021) Pathogenic bacteria in cheese, raw and pasteurised milk. *Vet Med Sci* 7:2445–2449. <https://doi.org/10.1002/vms3.604>
73. Ashraf D, Ombarak RA, Samir A, Abdel-Salam AB (2023) Characterization of multidrug-resistant potential pathogens isolated from milk and some dairy products in Egypt. *J Adv Vet Anim Res* 10:275–283. <https://doi.org/10.5455/javar.2023.j679>
74. Metzker ML (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11:31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
75. 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
76. Krueger F (2022) Trim Galore
77. Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
78. Czajkowski MD, Vance DP, Frese SA, Casaburi G (2019) GenCoF: a graphical user interface to rapidly remove human genome contaminants from metagenomic datasets. *Bioinformatics* 35:2318–2319. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty963>
79. 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
80. 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>
81. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen A-LV, Cheng AA, Liu S, Min SY, Miroshnichenko A, Tran H-K, Werfalli RE, Nasir JA, Oloni M, Speicher DJ, Florescu A, Singh B, Faltyn M, Hernandez-Koutoucheva A, Sharma AN, Bordeleau E, Pawlowski AC, Zubyk HL, Dooley D, Griffiths E, Maguire F, Winsor GL, Beiko RG, Brinkman FSL, Hsiao WWL, Domselaar GV, McArthur AG (2020) CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 48:D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
82. 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>
83. 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>
84. 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>
85. Loss G, Apprich S, Waser M, Kneifel W, Genuneit J, Büchele G, Weber J, Sozanska B, Danielewicz H, Horak E, van Neerven RJJ, Heederik D, Lorenzen PC, von Mutius E, Braun-Fahrlander C, GABRIELA study group (2011) The protective effect of farm milk consumption on childhood asthma and atopy: the GABRIELA study. *J Allergy Clin Immunol* 128:766–773.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.07.048>
86. Waser M, Michels KB, Bieli C, Flöistrup H, Pershagen G, von Mutius E, Ege M, Riedler J, Schram-Bijkerk D, Brunekreef B, van Hage M, Lauener R, Braun-Fahrlander C, PARSIFAL Study team (2007) Inverse association of farm milk consumption with asthma and allergy in rural and suburban populations across Europe. *Clin Exp Allergy* 37:661–670. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02640.x>

87. Loss G, Depner M, Ulfman LH, van Neerven RJJ, Hose AJ, Genuneit J, Karvonen AM, Hyvärinen A, Kaulek V, Roduit C, Weber J, Lauener R, Pfefferle PI, Pekkanen J, Vaarala O, Dalphin J-C, Riedler J, Braun-Fahrlander C, von Mutius E, Ege MJ, PASTURE study group (2015) Consumption of unprocessed cow's milk protects infants from common respiratory infections. *J Allergy Clin Immunol* 135:56–62. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.08.044>
88. Oliver SP, Boor KJ, Murphy SC, Murinda SE (2009) Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog Dis* 6:793–806. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0302>
89. Langer AJ, Ayers T, Grass J, Lynch M, Angulo FJ, Mahon BE (2012) Nonpasteurized dairy products, disease outbreaks, and state laws-United States, 1993–2006. *Emerg Infect Dis* 18:385–391. <https://doi.org/10.3201/eid1803.111370>
90. Mungai EA, Behraves CB, Gould LH (2015) Increased outbreaks associated with nonpasteurized milk, United States, 2007–2012. *Emerg Infect Dis* 21:119–122. <https://doi.org/10.3201/eid2101.140447>
91. Kuehn B (2018) Drug-Resistant Infections from Raw Milk. *JAMA* 319:1191. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.2363>
92. Costard S, Espejo L, Groenendaal H, Zagmutt FJ (2017) Outbreak-Related Disease Burden Associated with Consumption of Unpasteurized Cow's Milk and Cheese, United States, 2009–2014. *Emerg Infect Dis* 23:957–964. <https://doi.org/10.3201/eid2306.151603>
93. Andriyanov PA, Zhurilov PA, Kashina DD, Tutrina AI, Liskova EA, Razheva IV, Kolbasov DV, Ermolaeva SA (2022) Antimicrobial Resistance and Comparative Genomic Analysis of *Elizabethkingia anophelis* subsp. *endophytica* Isolated from Raw Milk. *Antibiotics (Basel)* 11:648. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050648>
94. Aragão BB, Trajano SC, Silva JG, Silva BP, Oliveira RP, Junior JWP, Peixoto RM, Mota RA (2019) Short communication: High frequency of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in artisanal coalho cheese made from goat milk produced in northeastern Brazil. *Journal of Dairy Science* 102:6923–6927. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16162>
95. Elafify M, Khalifa HO, Al-Ashmawy M, Elsherbini M, El Latif AA, Okanda T, Matsumoto T, Koseki S, Abdelkhalek A (2020) Prevalence and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in milk and dairy products in Egypt. *J Environ Sci Health B* 55:265–272. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1686312>
96. Alexa Oniciuc EA, Walsh CJ, Coughlan LM, Awad A, Simon CA, Ruiz L, Crispie F, Cotter PD, Alvarez-Ordóñez A (2020) Dairy Products and Dairy-Processing Environments as a Reservoir of Antibiotic Resistance and Quorum-Quenching Determinants as Revealed through Functional Metagenomics. *mSystems* 5:e00723-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00723-19>
97. Ning K, Zhou R, Li M (2023) Antimicrobial resistance and molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk in Hunan Province. *PeerJ* 11:e15847. <https://doi.org/10.7717/peerj.15847>
98. Rodrigues MX, Silva NCC, Trevilin JH, Cruzado MMB, Mui TS, Duarte FRS, Castillo CJC, Canniatti-Brazaca SG, Porto E (2017) Molecular characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from cheese processing plants. *Journal of Dairy Science* 100:5167–5175. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12477>
99. Liu H, Dong L, Zhao Y, Meng L, Wang J, Wang C, Zheng N (2022) Antimicrobial Susceptibility, and Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated From Different Raw Milk Samples in China. *Front Microbiol* 13:840670. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.840670>
100. Endres CM, Moreira E, de Freitas AB, Castel APD, Graciano F, Mann MB, Frazzon APG, Mayer FQ, Frazzon J (2023) Evaluation of Enterotoxins and Antimicrobial Resistance in Microorganisms Isolated from Raw Sheep Milk and Cheese: Ensuring the Microbiological Safety of These Products in Southern Brazil. *Microorganisms* 11:1618. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061618>
101. Parry-Hanson Kunadu A, Holmes M, Miller EL, Grant AJ (2018) Microbiological quality and antimicrobial resistance characterization of *Salmonella* spp. in fresh milk value chains in Ghana. *Int J Food Microbiol* 277:41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.025>
102. Tóth AG, Csabai I, Krikó E, Tózsér D, Maróti G, Patai ÁV, Makrai L, Szita G, Solymosi N (2020) Antimicrobial resistance genes in raw milk for human consumption. *Sci Rep* 10:7464. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63675-4>
103. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) (2019) Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.)
104. Crofts TS, Gasparrini AJ, Dantas G (2017) Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nat Rev Microbiol* 15:422–434. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.28>
105. Martínez JL, Coque TM, Baquero F (2015) What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nat Rev Microbiol* 13:116–123. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3399>
106. Hankin L, Lacy GH, Stephens GR, Dillman WF (1979) Antibiotic-resistant Bacteria in Raw Milk and Ability of Some to Transfer Antibiotic Resistance to *Escherichia coli*. *J Food Prot* 42:950–953. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-42.12.950>
107. Thomas CM, Nielsen KM (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3:711–721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok témavezetőmnek, Dr. Kerek Ádámnak a támogatásáért, igen értékes szakmai tanácsaiért, javaslataiért, a téma feldolgozása során nyújtott pótolhatatlan segítségéért. Külön köszönettel tartozom Dr. Jerzsele Ákosnak a támogatásáért, valamint a megtisztelő lehetőségért, hogy a Gyógyszertan és Méregtani Tanszéken írhattam meg a dolgozatomat, valamint Dr. Solymosi Norbertnek és Dr. Papp Mártonnak, a Bioinformatikai Központ munkatársainak, hogy az adatok feldolgozásában segítettek. Szintén köszönöm Dr. Bányai Krisztián, Dr. Kaszab Eszter és Dr. Bali Krisztina munkáját a minták előkészítése és szekvenálása során nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozok továbbá Kiss Ferencnek, a Kiss Házi Sajt Manufaktúra tulajdonosának, hogy biztosította számomra a gazdaságából származó és a kutatás alapját adó mintákat.

Köszönöm a szüleimnek és a páromnak is a folyamatos támogatást és hogy mellettem állnak minden helyzetben és bíztattak abban, hogy ez a munka megszülethessen.

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 **Németh Virág**, **ötödik** évfolyamos hallgató **„Szarvasmarha állomány nyerstej és nyers tejtermékeinek antimikrobiális rezisztencia génkészlet (ARG) változásának nyomon követése a termelés helyétől a fogyasztóig”** című dolgozatát átolvastam és jóváhagytam, részvételét támogatom az Állatorvostudományi Egyetem 2023. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján. Továbbá nyilatkozom, hogy a feltöltött TDK dolgozat plágiumellenőrzésen sikeresen átesett és az esetlegesen feltárt egyezőség az Egyetemi iránymutatásoknak/szabályoknak megfelel.

Budapest, 2023. október hó 14. nap.

.....

Dr. Kerek Ádám
témavezető