

Diplomamunka

Borbély Flóra

2020

Állatorvostudományi Egyetem
Bioinformatikai Központ

Szoptató kocák bélsár-rezisztómja egy hazai nagy
létszámú sertésállományban

Készítette: Borbély Flóra

Témavezető:

Dr. Solymosi Norbert

Dr. Papp Márton

ÁTE, Bioinformatikai Központ,
egyetemi docens

ÁTE, Bioinformatikai Központ,
PhD-hallgató

Budapest, 2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	4
1. Bevezetés.....	5
2. Szakirodalmi áttekintés	9
2.1 A rezisztencia napjainkban	9
2.2 A rezisztencia mechanizmusa.....	9
2.3 Antibiotikum használat a sertésállományokban	13
2.4 Hozamfokozóként használt antibiotikumok	13
2.5 Metagenomika, DNS-szekvenálás.....	14
3. Anyag és módszer	16
3.1 Mintavétel és szekvenálás	16
3.2 Bioinformatikai adatfeldolgozás és statisztikai elemzés	16
4. Eredmények.....	19
4.1 Baktériumok	19
4.2 Antibiotikumok.....	20
5. Megbeszélés	24
5.1 Baktériumok	24
5.2 Rezisztenciagének és antibiotikumok.....	30
6. Összefoglaló	35
7. Summary	36
Köszönetnyilvánítás	37
Irodalomjegyzék.....	38
Ábrajegyzék	45

Rövidítések jegyzéke

AMU = nem ellenőrzött antibiotikum felhasználás

AMR = antimikrobiális rezisztencia

MRSA = methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus*

DNS = deoxiribonukleinsav

ORF = open reading frame=lehetséges leolvasási keret

CARD = Comprehensive Antibiotic Resistance Database

ARG = antimikrobiális rezisztenciagén

PBP = penicillin binding protein

MRSE = methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*

MRSP = methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*

GHVD = graft-versus-host-betegsége

MGE = mobilis genetikai elem

IBD = inflammatory bowel disease

1. Bevezetés

Az antibiotikumok a modern orvostudomány forradalmasításával tömegek életét mentették meg súlyos fertőző betegségektől. Ezek a gyógyszerek képesek a baktériumsejteket elpusztítani, vagy növekedésüket gátolni anélkül, hogy a gazdaszervezetben kárt okoznának (Walsh et al., 2014; Aminov et al., 2010). Azonban a védekezés ezen formáját napjainkban multi-rezisztens baktériumtörzsek elterjedése veszélyezteti világszerte, amelyben jelentős szerepet játszott a nem ellenőrzött antibiotikum felhasználás (AMU) is (Sharma et al., 2018). A 21. században széles körben elterjedt az antibiotikumok használata, a humán egészségügy mellett nagyon gyakran alkalmazzák a mezőgazdaságban, így az állattenyésztésben és az élelmiszeriparban, valamint a kisállatgyógyászatban (Pataky, 1970). Egyes becslések arra mutattak rá, hogy az állatoknak adott antibiotikumok mennyisége duplája annak, amit a humán gyógyászatban használnak (Aarestrup et al., 2000).

Az antimikrobiális szerek káros hatását már Sir Alexander Fleming is megjósolta, ugyanis 1945-ben a Nobel-díj átvételekor mondott beszédében azt állította, hogy a baktériumok rezisztenciát alakíthatnak ki az antibiotikumokkal szemben, ami nem sokkal később be is igazolódott (Fleming, 1945; WHO's First Global Report 2014).

Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia a baktériumok védekezési mechanizmusa, mely csökkenti ezen szerek hatékonyságát (Crofts et al., 2017).

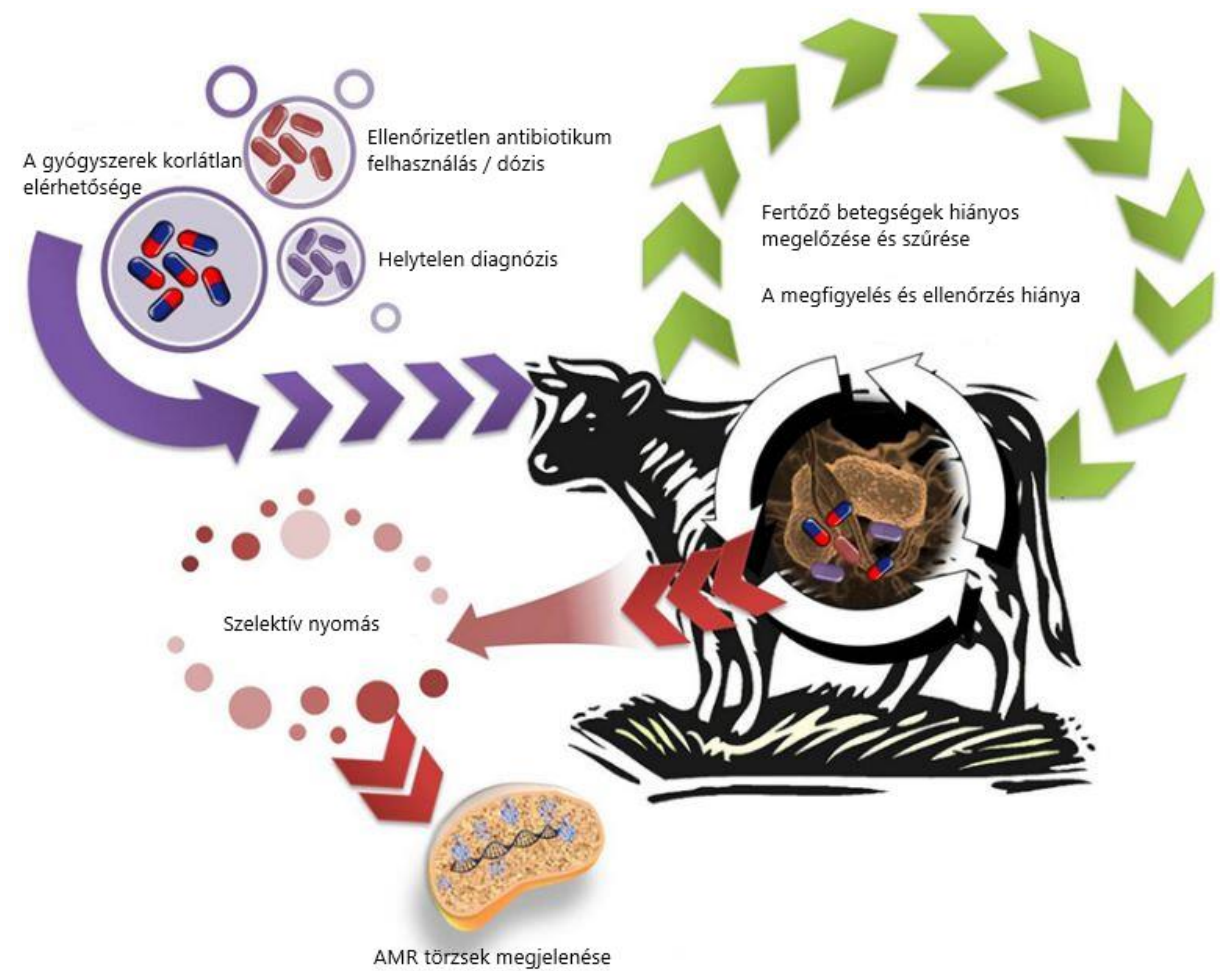
Az antimikrobiális rezisztencia (AMR) a nemzeti és nemzetközi egészségügyi ügynökségek által az egyik legfontosabbnak tekintett egészségügyi terület, amely fokozatos térnyerésével csendes járványnak is tekinthető (Sharma et al., 2018). Az AMR a mikrobákra nézve azt jelenti, hogy már nem hatásosak rájuk az antibiotikumok klinikailag releváns adagjai (Ganguly et al., 2011). A jelenség magyarázható úgy, hogy a baktériumok már nem mutatnak érzékenységet az antimikrobiális szerek azon hatására vagy adagjára, amelyre korábban érzékenyek voltak, így képesek túlélni az antibakteriális szerek hatásait. Ezt a folyamatot gyorsítja fel a túlzott mértékű antibiotikum használat (Sharma et al., 2018).

Az állattenyésztésben használt antimikrobiális szerek nagymértékben hozzájárultak az egészség fenntartásához, a termelékenység és takarmányértékesítés javításához, ugyanakkor nagy szerepet játszottak a rezisztens törzsek szelektálásában is (Sharma et al., 2018).

Ezek alapján elmondható, hogy a rezisztens baktériumok megjelenése és terjedése ökológiai és evolúciós kölcsönhatásokból származik, melyet mind természetes, mind emberi tényezők

befolyásolnak, de valójában a fő szerep az antimikrobiális szerek túlzott használatának (AMU) tulajdonítható, amely szelektív nyomást gyakorol a baktériumokra. Mindezek során a baktériumok rezisztencia-közvetítő mutációkat és rezisztenciagéneket alakítanak ki, illetve szereznek (Moudgil et al., 2017).

Az állati mikroflórában az 1. ábrán láthatók az AMR-t befolyásoló tényezők.



1. ábra A rezisztencia kialakulásának okai (Sharma et al., 2018)

Az AMR világszerte nagy veszélyt jelent az emberekre és az állatokra egyaránt, ezért sürgősen vizsgálni és tanulmányozni kell az AMR jelenlétét az állati mikroflórában. Ezáltal érthetővé válik a pontos mechanizmus, amellyel felállítható egy stratégia az AMR leküzdésére (Sharma et al., 2018).

A becslések szerint világszerte legalább 700 000 ember veszíti életét rezisztens fertőzések következtében, de 2050-re ez a szám akár 10 millióra is növekedhet évente (O'Neill et al., 2016).

A sertésekben jelen lévő rezisztens baktériumtörzsek az élelmiszerek közvetítésével bejuthatnak az emberbe, így közegészségügyi kockázatot jelentenek (Lhermieet al., 2016). Az élelmiszertermelő állatok a zoonotikus baktériumok fő közvetítői és hordozói (Normanno et al., 2007).

Az AMR első integrált rutin vizsgálatát Dániában végezték 1995-ben, amelynek során indikátor és zoonotikus baktériumokat, valamint állati kórokozókat vizsgáltak. Több állatfajtól vettek mintát, köztük sertésektől is, melynek során a sertében figyelték meg a legnagyobb mértékű antibiotikum rezisztenciát (Aerstrup et al., 1998). A fentiek is hangsúlyozzák tehát a terület kiemelkedő jelentőségét.

Az antimikrobiális rezisztencia vizsgálatára számos módszer közül választhatunk. Egy rohamosan terjedő metódussal, az újgenerációs szekvenáláson alapuló metagenomikai vizsgálattal, lehetséges a mintában található összes mikroorganizmus kimutatása mellett a rezisztenciagének vizsgálata is. A mintában előforduló rezisztenciagének összességét rezisztómnak nevezzük. A metagenomikai vizsgálatok során széles körű képet kaphatunk az antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztenciáról a vizsgált környezetben, például az állati bélmikrobiomban (Allen, 2014).

Diplomamunkám során mi is ezt a módszert alkalmaztuk kutatásunkhoz. Vizsgálatunk célja az volt, hogy betekintést nyerjünk egy hazai nagy létszámú sertésállomány kocáinak bélsár-rezisztómjába. Ennek az új vizsgálati módszernek a segítségével feltérképeztük, hogy a sertésekben milyen mértékben és mely antibiotikumok ellen vannak jelen rezisztenciagének, valamint ezeket az antimikrobiális rezisztenciagéneket mely baktériumok hordozzák. A rezisztóm mellett leírtuk a vizsgált sertések bélmikrobiomját alkotó baktériumfajokat és előfordulásuk arányát. Mindezek által rávilágítunk egy igen jelentős, és az embereket és állatokat komolyan veszélyeztető problémára, a nagymértékű, antibiotikumok ellen kialakult rezisztenciára. A rezisztens baktérium törzsek kialakulása és terjedése egy komoly és igen

jelentős probléma, amely visszaszorítása korunk egyik legfontosabb feladata. Mindezek miatt tartom érdekesnek és fontosnak választott diplomamunkám témáját.

A dolgozatomat az antibiotikumok jelentőségének bemutatásával kezdem, majd rátérek az antimikrobiális rezisztencia mechanizmusára. Ezt követően nagyobb hangsúlyt fektetek a sertéságazat antibiotikum felhasználására és a már betiltott hozamfokozókra.

A mintáink elemzését metagenomikai vizsgálatokkal, újgenerációs DNS-szekvenálással végeztük, melynek eredményeként a bioinformatikai adatfeldolgozást követően részletes információkat kaptunk a vizsgált sertések bélmikrobiomjáról és rezisztómjáról. Végül ezen eredmények sertéstartással és antibiotikumhasználattal való összefüggéseinek értelmezési lehetőségeit tárgyalom.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1 A rezisztencia napjainkban

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) arra a megállapításra jutott 2000-ben, hogy a közegészségügy legnagyobb globális veszélye a növekvő antimikrobiális rezisztencia. Ennek okán a takarmány-adalékanyagként etetett antibiotikumok megszüntetését javasolta az állattenyésztésben. Azoknak a szereknek a felhasználását kell nagymértékben csökkenteni, amelyek a humán gyógyászatban nélkülözhetetlenek (WHO, 2001).

2006. január 1-től tilos az antibiotikumok hozamfokozóként való alkalmazása az Európai Unióban, ugyanis az 1831/2003 /EC rendelet szigorúan szabályozza az antibiotikumok használatát az állattenyésztésben (2003.évi 1831/2003 /EC rendelet, 2003).

2.2 A rezisztencia mechanizmusa

Az antibiotikumokat felfedezésük után széles körben alkalmazták, ami maga után vonta az antibakteriális szerek hatásosságának nagymértékű visszaesését. A baktériumok adaptálódtak, átalakultak, így ellenállóvá tudtak válni (Gálfi et al.,2015).

Megkülönböztetünk szerzett és ab ovo rezisztenciát. A szerzett rezisztencia azt jelenti, hogy a mikroorganizmusok elvesztették egykori érzékenységüket az antibiotikumokkal szemben. Azonban egyes kórokozók eleve nem is rendelkeztek vele, ebben az esetben ab ovo rezisztenciáról beszélünk, ilyen például a *Mycoplasma* nemzetség rezisztenciája penicillinekkel szemben (Gálfi et al., 2015).

A baktériumok antibiotikum rezisztenciájának terjedése több módon is lehetséges. Terjedhet a rezisztencia gének baktériumsejtek közötti cseréjével, a rezisztenciagének genomon belüli átrendeződésével vagy a különböző szervezetek között a rezisztens baktériumok átadásával (Gálfi et al., 2015).

A rezisztencia genetikus hordozói lehetnek kromoszómálisak vagy extrakromoszómálisak. A kromoszóma mutáció igen gyakori szerepet játszik a folyamatban, mint például a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) esetében is. A szerzett rezisztencia terjedhet horizontális- vagy vertikális transzmisszióval. Így terjednek a súlyos kórházi fertőzéseket okozó MRSA törzsek is, amelyek már képesek a kórházi környezetben való túlélésre (Gálfi et al., 2015; Alanis, 2005). A vertikális transzmisszió generációról

generációra terjed spontán mutációt követően, míg a horizontális transzmisszió a rezisztenciagének baktériumok közötti átadásakor alakul ki (Gálfi et al., 2015).

A rezisztencia extrakromoszómális genetikus hordozók által közvetített terjedése plazmidok révén valósul meg. A baktériumok a citoplazmában szabadon előforduló, extrakromoszómális genetikai elemeket, például kettős szálú DNS-ből felépülő plazmidokat tartalmazhatnak. Ezek az extrakromoszómális elemek több gént is hordozhatnak és képesek függetlenül replikálódni, azaz többszöröződni. Különös jelentőséggel bírnak az R-plazmidok, amelyek antibiotikum rezisztenciagéneket hordoznak. A gyógyszerekkel szembeni rezisztencia kialakulásáért nagyrészt a plazmidok felelősek (Gálfi et al., 2015).

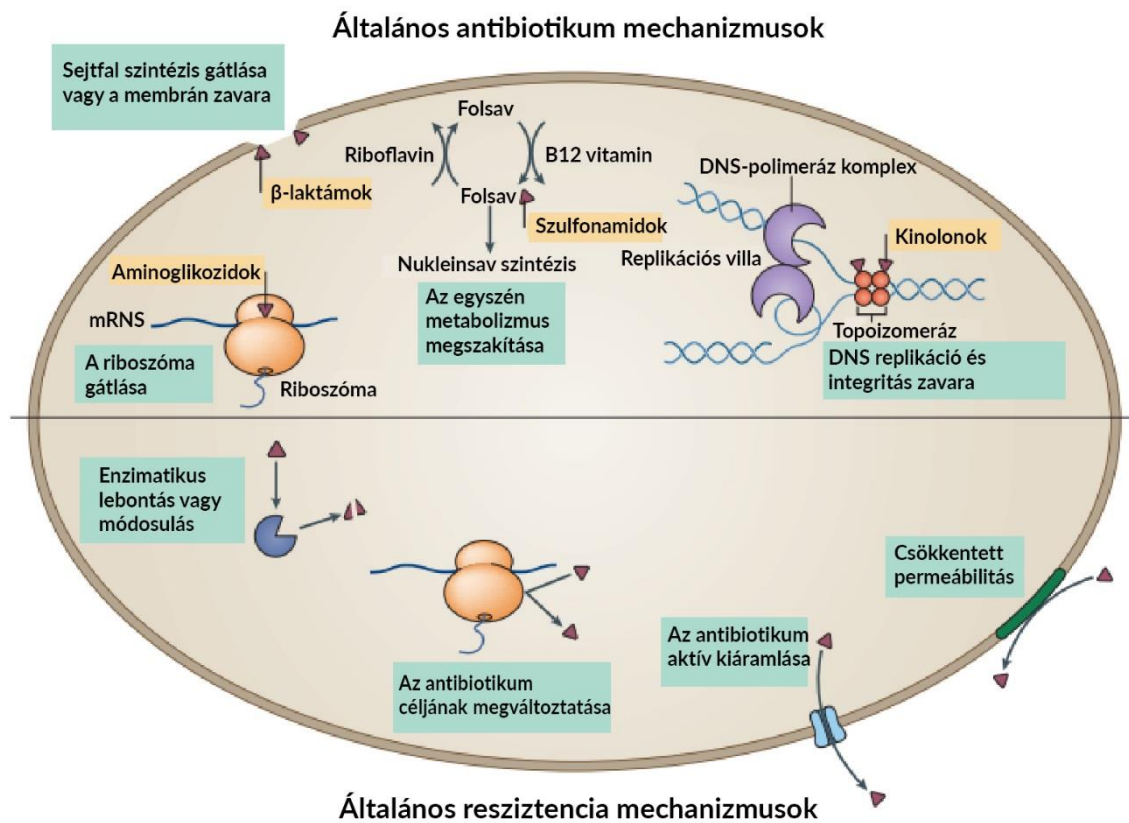
A rezisztencia terjedésének másik fő módja a genetikai elemek kicserélődése, amelyben transzpozonok játszanak szerepet. A transzpozonok integron nevű DNS-fragmentumot tartalmaznak, amely képes integrálni különböző antibiotikum rezisztenciagéneket, ezáltal több antibiotikummal szemben is kialakíthatnak rezisztenciát (Levy and Marshall, 2004). A folyamat független az élettani genetikai rekombinációtól. A transzpozonok, a plazmidokkal ellentétben nem képesek önálló replikációra. Ezek a DNS szakaszok bekerülhetnek a plazmidokba, amellyel más, akár eltérő fajú baktériumokba is bejuthatnak. A transzpozon a gazda plazmidjában vagy kromoszómájában képes replikációra, amelynek következtében létrejöhét az R-plazmidokon lévő rezisztenciagének terjedése a nem rokon baktériumok között. A transzpozonok mellett a génkazetták és integronok is részt vehetnek a genetikai elemek kicserélődésében. A génkazettákban a rezisztenciagén egy felismerő szakaszhoz tapad, majd ezt követően ezek a génkazetták egymáshoz társulhatnak, így alkotva egy nagyobb egységet, az integront. A génkazetták beépülését az integron integráz enzime segíti. Ezek a hordozók nagy szerepet játszanak a "multidrug" rezisztencia (egyszerre több gyógyszerrel szembeni ellenállás) terjedésében (Gálfi et al., 2015).

A rezisztencia terjedésének harmadik módja a rezisztens gének cseréjével történik a különböző baktériumok között. Az egyik, és leggyakoribb folyamata a konjugáció, amely egy olyan sejtek közötti kapcsolat, amely során az örökítőanyag kicserélődik a baktériumok között. Ezt a tulajdonságot az úgynevezett "konjugatív plazmid" hordozza. Valamennyi baktérium képes konjugációra (Gálfi et al., 2015).

Egy másik módja a baktériumok közötti rezisztencia átadásnak a transzformáció. Ennek során a baktérium a környezetéből veszi fel a rezisztenciát hordozó DNS szakaszt, majd építi be a saját genomjába. Transzformációra csak kevés kórokozó képes (Gálfi et al., 2015).

A mikroorganizmusok között a rezisztencia átadódhat transzdukcióval is, ahol a plazmid DNS egy bakteriofágba, vagyis baktériumot megtámadó vírusba kerülve jut át az azonos fajú baktériumba. Ez a kevésbé hatékony átviteli mód, amely a horizontális géntranszfer egyik formája a Staphylococcusok és Streptococcusok közötti rezisztencia terjedésben játszik fontos szerepet. Megkülönböztetünk általános és speciális transzdukciót (Barna et al.,2013; Gálfi et al.,2015).

Az antibiotikum rezisztencia kialakulásának hátterei lehetnek különböző biokémiai mechanizmusok is. A 2. ábra bemutatja néhány antibiotikum hatásmechanizmusát, amelyek ellen gyakori a rezisztencia, valamint az általános rezisztencia mechanizmusokat is szemlélteti. A következőkben ezeket a rezisztencia mechanizmusokat mutatom be.



2. ábra Általános rezisztencia mechanizmusok (Crofts et al., 2017)

Az aminoglikozidok a kórokozó riboszómájának gátlásával fejtik ki hatásukat, pontosabban a riboszóma 30S alegységén található a gyógyszer kötőhelye. Rezisztencia akkor jön létre, ha ez a kötőhely kromoszóma mutáció következtében megváltozik. Az inaktiválódás végbemehet mind Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok által termelt enzimek okozta foszforiláció, adeniláció és acetiláció során (Gálfí et al., 2015).

A β -laktám antibiotikumok β -laktám váza felel az antibakteriális hatásért. Egyes kórokozók képesek ezeknek az antibiotikumoknak inaktiválására az általuk termelt β -laktamáz enzim segítségével. Ezek az enzimek elhasítják az antibiotikum vázában β -laktám gyűrűjét. β -laktamáz enzimet termelő baktériumok a Staphylococcusok és a Gram-negatív baktériumok (Gálfí et al., 2015).

A szulfonamidok a kórokozók nukleinsav képzéséhez szükséges folsav szintézisét gátolják. Esetükben a rezisztencia nagyon elterjedt és leggyakrabban plazmidhoz kötött folyamat. A rezisztencia hátterében állhat a baktériumsejt membránjának csökkent permeabilitása és különböző enzimikus folyamatok (Crofts et al., 2017; Gálfí et al., 2015).

A kinolonok a DNS topoisoméráz komplex működését gátolják meg, amellyel a DNS-szintézist, a mRNS-transzkripciót és a sejtosztódást akadályozzák meg. Ezzel azonnali koncentrációfüggő baktericid hatást érnek el. Az ellene kialakult rezisztencia során a bakteriális topoisoméráz enzim kötőhelye változik meg. A kinolonok kezdeti alkalmazását követően lassan alakult ki ellene rezisztencia, később azonban megjelent a plazmid által közvetített kinolon rezisztencia, amely világszerte gyorsan elterjedt (Crofts et al., 2017; Gálfí et al., 2015).

Általános rezisztencia mechanizmusokkal (2. ábra) is védekeznek a kórokozók az antibiotikumokkal szemben, mint például az enzimikus lebontás vagy az enzim szerkezetének módosulása, az antibiotikum céljának megváltoztatása vagy az antibiotikum aktív kiáramoltatása. Egyes mikroorganizmusok csökkentik sejtmembránjuk permeabilitását, ezáltal megakadályozzák a gyógyszer bejutását a sejtbe (Tamber et al., 2003).

Az gyógyszerekkel szemben kialakult ellenállás nem csak a baktériumok jellegzetes tulajdonsága, egyaránt képesek rá protozoonok, daganatsejtek és paraziták is (Gálfí et al., 2015).

2.3 Antibiotikum használat a sertésállományokban

Az antibiotikumokat az állattenyésztésben, így a sertésenyésztésben is a fertőző betegségek kezelése mellett a fertőző betegségek kialakulásának megelőzésére alkalmazzák, valamint régen a növekedés serkentésére és a takarmányértékesítés javítására is használták (Love et al., 2011). Az antibiotikumok alkalmazását azonban, mint hozamfokozó szer 2006. január 1-től betiltották az Európai Unióban, ennek részleteit az 1831/2003 /EC rendelet foglalja magába (2003.évi 1831/2003 /EC rendelet, 2003).

Egy 2012-ben végezett vizsgálat eredménye szerint az élelmiszertermelő állatok kezelésére leggyakrabban használt antibiotikumok a tetraciklinek (67%) voltak, majd ezt követték a penicillinek (11%), makrolidok (7%), szulfonamidok (6%), aminglikozidok (8%), linkóزامidok (2%), és a cefalosporinok (1% alatt) (Lagha et al., 2017). Kifejezetten sertéseknél is vizsgálták az antibiotikum felhasználást Németországban, amely élén szintén a tertraciklinek álltak, ezt követően a β -laktámok és a trimetoprim-szulfonamidok voltak a leggyakrabban használt szerek (van Rennings és mtsa., 2015). Erre a vizsgálatra az egész Unióban is sor került 2011 és 2014 között, amelyben szintén az előbbiekhöz hasonló eredményeket kaptak (European Medicines Agency, 2016).

Ez a túlzott mértékű gyógyszerhasználat hozzájárult a rezisztens patogén kórokozók elterjedéséhez. A sertéságazatban gyakori az enterotoxikus *Escheriachia coli* által okozott megbetegedés, amely már rezisztenssé vált az ezen a területen gyakran használt tetraciklinekre, valamint aminoglikozidokra, trimetoprim-szulfonamidokra és ampicillinekre (Barton, 2014). Az enterotoxikus *Escherichia coli* választás utáni hasmenést okoz, ezzel nagy veszteségeket okozva a sertésenyésztésben, a választás utáni malacok mortalitásának 50%-ban ez a patogén baktérium mutatható ki (Fairbrother et al., 2005). Vegyünk még egy példaként egy fontos zoonotikus kórokozót, a *Streptococcus suis*-t, amely nagy ellenállást mutat a makrolidokkal és tetraciklinekkel szemben (Wasteson et al., 1994).

2.4 Hozamfokozóként használt antibiotikumok

A hozamfokozók alkalmazásának célja az állattenyésztésben a termelési többlet és a takarmányértékesítés javítása, valamint képesek ellensúlyozni a hiányos takarmányozást és a környezet által az állatokra gyakorolt stresszhatásokat. A hozamfokozók legtöbb esetben a bélflóra összetételének pozitív irányú befolyásolása révén fejtik ki hatásukat. Gyakran alkalmazott hozamfokozók voltak az antibiotikumok, amelyek nagyban hozzájárultak az

antimikrobiális rezisztencia kialakulásához és terjedéséhez. Az állatokban kialakult rezisztencia pedig az emberekbe is átkerülhet. Az antibiotikumok erre a célra történő felhasználása Európában már tilos. Hozamfokozóként gyakran használt antimikrobiális szerek voltak az ionofor antibiotikumok, mint narazin, lazalocid, monenzin, valamint flavomicin, bacitracin, és avoparcin. A sertéságazatban az antibiotikumok mellett még alkalmaztak réz-szulfátot, valamint antimikrobiális szernek minősülő olakvindoxot és karbadoxot (Andrásosfy et al., 2009).

2.5 Metagenomika, DNS-szekvenálás

Bennünk, emberekben és az állatokban különféle mikroorganizmusok élnek, melyek összességét nevezzük mikrobiótának, ezek új generációs szekvenálási adatokra alapozott megismerésére alkalmas a metagenomika. Ezzel a megközelítéssel lehetséges az adott mintában lévő összes mikroorganizmus kimutatása. Az organizmusok genomjait vizsgálja a DNS-ük és RNS-ük felhasználásával. A metagenom szó alatt a minta tartalmának összes genomját értjük. A mikroorganizmusok genomjainak összességét mikrobiomnak nevezzük, így beszélhetünk viromról és bakteriomról is (Krikó et al., 2018). A rezisztenciagének összessége a rezisztóm.

Az újgenerációs szekvenálás (Next Generation Sequencing, NGS) az elmúlt évtizedben vált ismertebbé és gyakoribbá a tudományos kutatások és a diagnosztika területén (Sanger et al., 1997). A kezdeti első generációs szekvenálást felváltotta az újgenerációs szekvenálás (NGS), amellyel egy mintából rengeteg DNS-fragmens szekvenciája meghatározható rövid idő alatt (Grada et al., 2013). Ez a módszer sok új információval szolgálhat orvos-biológiai kutatásokban, az állattartás és állategészségügy területén (Spisák et al., 2015; Krikó et al., 2018).

A mikrobiom vizsgálatával sokkal több információt nyerhetünk, mint az eddig is használt immunológiai és mikrobiológiai vizsgálatok során. A minta begyűjtését követően abból kivonják a DNS-t. Általában a minták sokféle genomból tevődnek össze, baktériumok, vírusok, az élőlény saját genomja, valamint bélcsatornából vett minta vagy bélsár esetén a takarmány összetevők genetikai anyagát is tartalmazza. A kapott DNS szálak akár több millió bázisból is állhatnak, ezért ezeket restriktív enzimekkel véletlenszerűen kisebb bázisszámú fragmensekre tördelik. Ezután következik az új-generációs szekvenálás, mely során ezeknek a rövidebb DNS-szakaszoknak meghatározzák a nukleotid-sorrendjét. A folyamat végeredményeként megkapjuk a short read-eket, azaz a leolvasott szekvenciákat, amelyek a DNS-szakaszok digitális formái. A véletlenszerű darabolásnak köszönhetően a minta DNS-

einek teljes szekvenciája lefedhető. Ezt nevezzük shotgun metagenom szekvenálásnak (Krikó et al., 2018).

A folyamatot a bioinformatikai adatfeldolgozás követi. Az így kapott readeket annak a fajnak a referenciagenomjára illesztik, amelyből a minta származik, hogy kiszűrjék a gazdagenom- szennyeződést, amelyekre a továbbiakban nem lesz szükség. Ezután már csak a vizsgálat szempontjából fontos szekvenciákkal dolgoznak tovább, amiket baktériumok és vírusok genomjaihoz illesztenek speciális szoftverrel. Az illesztés eredménye megadja a mikrobiomot alkotó fajokat és azt is, hogy a mintában milyen gyakorisággal fordulnak elő (Krikó et al., 2018).

3. Anyag és módszer

3.1 Mintavétel és szekvenálás

Egy nagy létszámú sertésállományból négy, a mintavételtől számítva öt napon belül fialt szoptató koca kutricájának padozatáról gyűjtöttünk friss bélsármintát. Ez az állomány Faddon található, a Duna-hyb Kft. tulajdona. A mintavételre 2018.05.31-én került sor, a kocák 2018.05.26-án, 2018.05.28-án és 2018.05.29-én fiáltak. A mintákat poolozva, azaz elegyítve dolgoztuk fel. Így egy bélsármintát kaptunk, amelyből a Zymo Research ZR Fecal DNA Kit-jével kivontuk az össz DNS-t. Majd ezt követően a leolvasási párosított szekvenciák (paired end readek) Illumina Next Seq szekvenátorral lettek meghatározva (Tóth et al., 2020).

3.2 Bioinformatikai adatfeldolgozás és statisztikai elemzés

A szekvenálás eredményeként kapott nyers readek minőségellenőrzését elvégezve, a nem kielégítő minőségű readeket kiszűrtük és a readek kevésbé megbízható szakaszait levágtuk (Bolger et al., 2014).

A béltartalomban a házisertés genomjának darabjai is megjelennek, és a szekvenálás során ezek bázissorrendje is le lett olvasva, az elemzések folytatásához ezeket ki kellett szűrniük. Ezt úgy végeztük, hogy a Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) szoftverrel, very-sensitive-local beállítással a házisertés (*Sus scrofa*) referenciagenomjára (NCBI azonosító: Sscrofa11.1) illesztettük az összes readet. A továbbiakban csak azokat a readeket használtuk, amelyek így nem illeszkedtek a sertés genomjára.

Első lépésben ezeket a Kraken2 ($k = 35$) (Wood et al., 2019) szoftverrel az NCBI nem redundáns nukleotid adatbázisát (Pruitt et al., 2005) felhasználva taxonklasszifikáltuk. Ennek eredményét R-környezetben (R Core Team, 2019) a phyloseq (McMurdie and Holmes, 2013) és microbiome (Lahti and Shetty, 2019) csomagok függvényeivel dolgoztuk fel. A további elemzésekbe csak azokat a readeket használtuk fel, amelyek a taxonklasszifikáció alapján baktérium eredetűnek adódtak (Sáenz et al., 2019). A mag-bakteriomhoz azokat az osztályokat soroltuk, amelyek relatív abundanciája meghaladta a 0.1%-ot. A bakteriális eredetű readek felhasználásával a metaSPAdes (Nurk et al., 2017) szoftverrel metagenomiális assemblyt végeztünk, aminek eredményeként hosszabb kontigokat (összeillesztett DNS-szekvenciákat) kaptunk. Ezek közül azokat tartottuk meg, amelyek

Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD, McArthur et al., 2013; Jia et al., 2017) legrövidebb antimikrobiális rezisztenciáért felelős génjénél hosszabbak voltak.

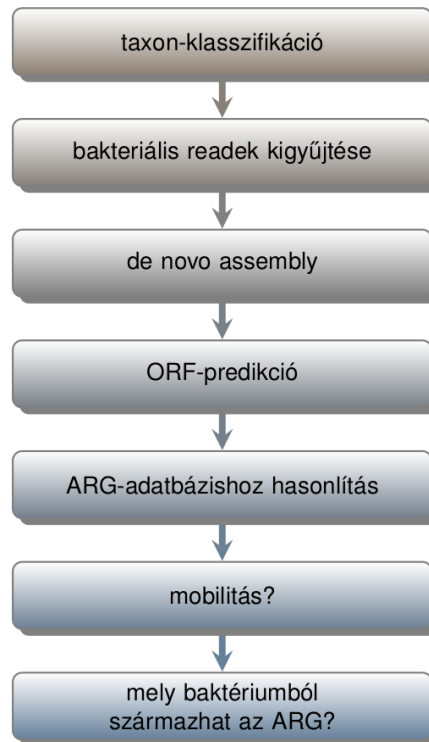
A megszürt kontigokból kiolvastuk az összes lehetséges leolvasási keretet (open reading frame, ORF), és azok nukleotid bázissorrendje alapján fehérjeszekvenciákat prediktáltunk. E fehérjeszekvenciákat a Resistance Gene Identifier (RGI) v5.1.0 segítségével hasonlítottuk a CARD adatbázis ARG-szekvenciáihoz.

A szoftver Protein Homolog modell alapján a fehérjekódoló szekvenciákat az illeszkedés minősége szerint három osztály valamelyikébe sorolja:

- **Perfect:** azt jelenti, hogy az adott aminosavszekvencia 100%-ban megegyezik a referenciaszekvenciával, ez utóbbi teljes hosszában.
- **Strict:** azok a szekvenciák, amelyek nem felelnek meg az előző feltételnek, de a bitscore-juk meghaladja a curated BLASTP cut-off értékét. Ezek olyan variánsok lehetnek, amelyeket korábban nem írtak le, nem szerepelnek az adatbázisban.
- **Loose:** ebbe a kategóriába olyan szekvenciák esnek, amelyeknek a bitscore-ja kisebb, mint a curated BLASTP cut-off. Ezek még távolabbi homológ gének lehetnek, alapjai új ARM-gének meghatározásának.

A Loose besorolású találatokat elvetettük. Azokat a kontigokat, amelyekben egy vagy több perfect vagy strict besorolású ORF-et találtunk az előzőekben leírtak szerint taxonklasszifikáltuk a Kraken2-vel.

Az azonosított ARG-ket tovább vizsgáltuk abból a szempontból, hogy a környezetünkben lévő egyéb gének sajátosságai alapján valószínűsíthető-e az ARG mobilitása. Ekkor mobilis genetikai elemeket (mobile genetic element, MGE) keresünk az ARG környezetében. Ebből a célból minden tíz ORF-nyi távolságon belül lévő ORF prediktált fehérjeszekvenciának a PFAM v32 (El-Gebali et al., 2019) és TnpPred (Riadi et al., 2012) adatbázisban tárolt fehérjeszekvenciával való homológiáját értékeljük a HMMER (Mistry et al., 2013) szoftver segítségével. Az adatfeldolgozás lépéseit a 3. ábra mutatja be.



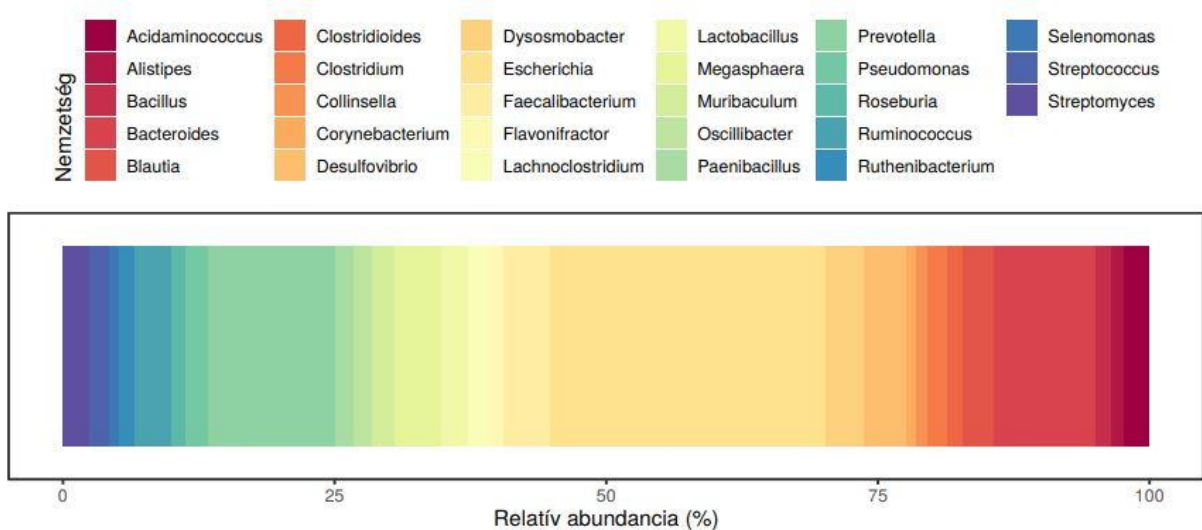
3. ábra Az adatfeldolgozás lépései (saját ábra)

Saenz és munkatársai (2019) megközelítését követve akkor tekintettünk egy ARG-t mobilisnak, ha az adott távolságon belül találtunk olyan ORF-et, amely fág integráz, resolváz, transzpozáz vagy transzpozon szekvenciákkal való hasonlóságához kapcsolt E-érték 10^{-5} értéknél kisebb volt. Az ARG-t tartalmazó kontigok plazmideredetét a PlasFlow v.1.1 (Krawczyk et al., 2018) szoftver segítségével prediktáltuk.

4. Eredmények

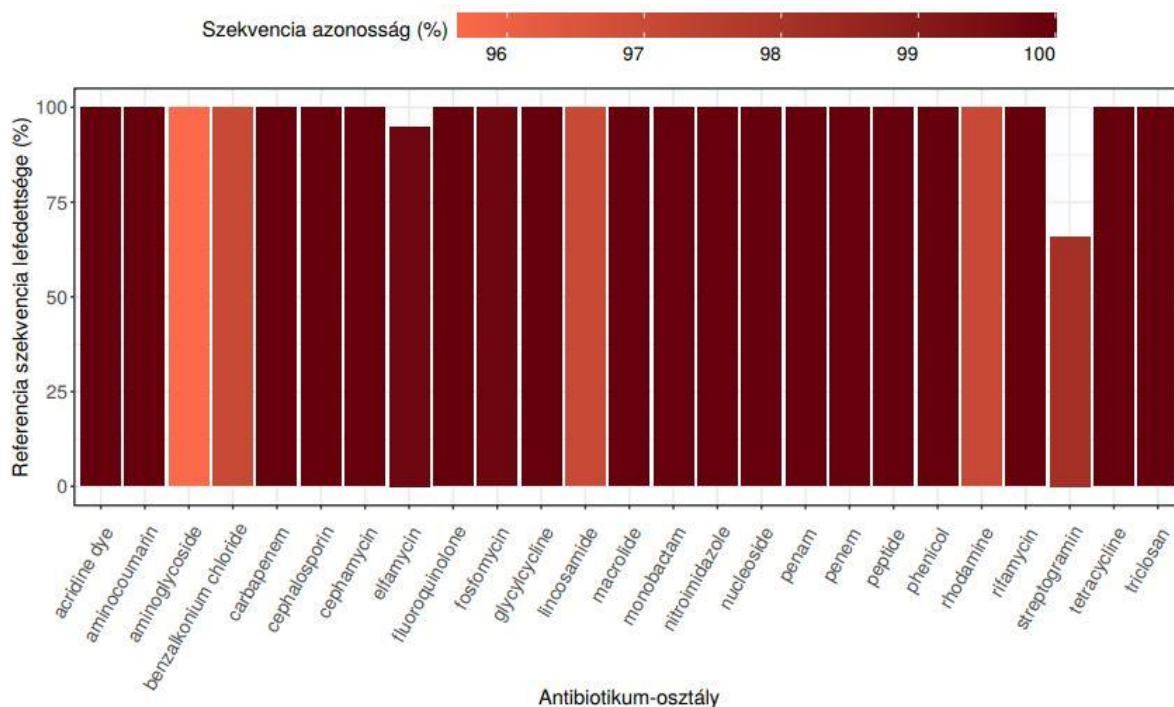
4.1 Baktériumok

A szekvenálás eredményeként 5 519 047 paired end readet kaptunk, amelyek tisztítása után 1 026 974 readpár bizonyult bakteriális eredetűnek. A taxonklasszifikáció alapján a bélsármintában a baktériumnemzetségek relatív abundanciája (4. ábra) csökkenő sorrendben a következő: *Escherichia* (25.4%), *Prevotella* (11.7%), *Bacteroides* (9.4%), *Megasphaera* (4.35%), *Faecalibacterium* (4.33%), *Desulfovibrio* (3.91%), *Ruminococcus* (3.5%), *Dysosmobacter* (3.44%), *Blautia* (2.8%), *Lactobacillus* (2.5%), *Streptomyces* (2.43%), *Acidaminococcus* (2.41%), *Pseudomonas* (2.21%), *Muribaculum* (1.99%), *Clostridium* (1.88%), *Lachnoclostridium* (1.85%), *Streptococcus* (1.82%), *Paenibacillus* (1.75%), *Oscillibacter* (1.68%), *Bacillus* (1.48%), *Clostridioides* (1.41%), *Ruthenibacterium* (1.34%), *Flavonifractor* (1.29%), *Roseburia* (1.18%), *Collinsella* (1.11%), *Alistipes* (1.05%), *Corynebacterium* (0.9%), *Selenomonas* (0.89%) (Tóth et al., 2020).



4. ábra A vizsgált mintában található baktériumok nemzetség szinten (Tóth et al., 2020). A szekvenálást és bioinformatikai adatfeldolgozást követően az ábrán látható eredményeket kaptuk a kocák mikrobiomjáról. Az ábra a vizsgált sertések mikrobiomját alkotó baktériumok jelenlétét és előfordulásának gyakoriságát mutatja be nemzetség szintjén. Mind Gram-negatív, mind Gram-pozitív baktériumok nagy számmal előfordulnak.

4.2 Antibiotikumok

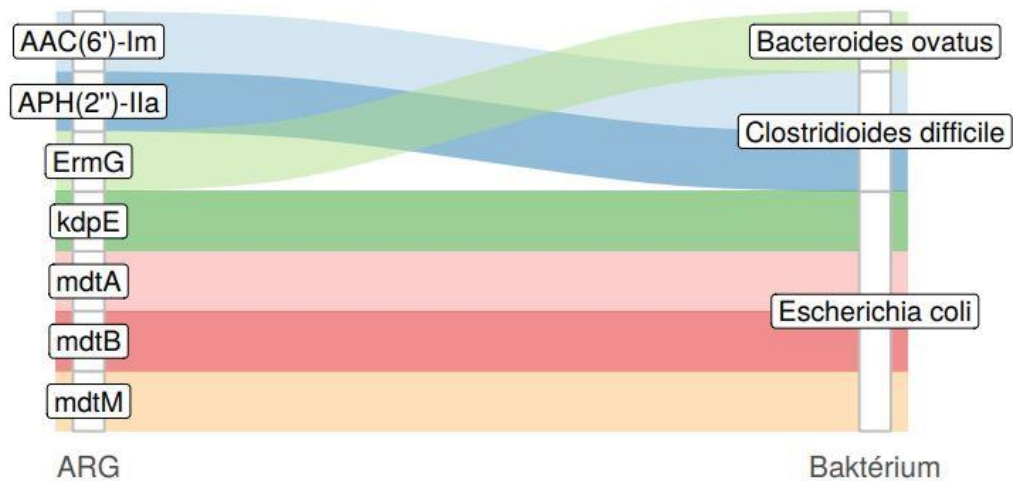


5. ábra Maximális ORF lefedettség és egyezés antibiotikumonként (Tóth et al., 2020) A mintában a legtöbb antibiotikumhoz tartozó ARG 100% azonosságot mutatott.

Az antimikrobiális rezisztenciagének azonosítása során azokat a találatokat tartottuk meg (1. táblázat), amelyek esetén az adott ORF a referencia gént legalább 60% hosszan, legalább 90%-os bázissorrend-azonosságban lefedte. Az ARG-k által befolyásolt antibiotikum-osztályokra gyűjtöttük a maximális lefedettségben és szekvenciális azonosságban talált ORF-eket (5. ábra). Ezek alapján az akridinfesték, aminokumarin, karbapenem, cefalosporin, cefamicin, fluorokinolon, glicilciklin, makrolid, monobaktám, nitroimidazol, nukleozid, penam, penem, peptid, fenikol, rifamicin, tetraciklin, triklozán antibiotikum-osztályok hatását befolyásoló ARG-k tökéletes lefedettséggel és bázissorrend-azonossággal jelen voltak a mintában (Tóth et al., 2020).

Az azonosított rezisztenciagéneket osztály szinten sikerült besorolni a kontigok taxonklasszifikációja során. 7 génnek azonban meg lehetett állapítani a pontos, fajszintű eredetét, vagyis hogy melyik baktériumfajból származik. Ezt a 6. ábrán láthatjuk.

Az összes azonosított ARG osztály szintű besorolása a következők szerint alakul: 81% *Gammaproteobacteria*, 3,8 % *Clostridia* és 1,9% *Bacteroidia* (Tóth et al., 2020).



6. ábra Az ARG-k faj szintű eredete. A sok kapott gén közül csak kevés számú ARG-ról lehetett megállapítani, hogy pontosan melyik baktériumfajból származik (Tóth et al., 2020).

Mint a 6. ábra is mutatja, az AAC(6')-Im és az APH(2'')-IIa gének a *Clostridioides difficile*, az ErmG gén pedig a *Bacteroides ovatus* baktériumból származott. Míg 4 gén, a kdpE, az mdtA, az mdtB és az mdtM ARG-k az *Escherichia coli* eredetűek voltak.

1. táblázat: Az azonosított antimikrobiális rezisztenciagének (Tóth és mtsa., 2020)

Antimikrobiális Rezisztencia Gén (ARG)	Lefedettség %	Szekvencia azonosság %	Antibiotikum-osztály
AAC(6)-IIm	100	97,74	aminoglikozid
ACI-1	100	100	cefalosporin; penam; penem
acrB	81,03	100	fluorokinolon; cefalosporin; glicilciklin; penam; tetraciklin; rifamicin; fenikol; triklozán
acrD	100	100	aminoglikozid
AcrE	100	100	fluorokinolon; cefalosporin; cefamicin; penam
AcrF	100	99,71	fluorokinolon; cefalosporin; cefamicin; penam
AcrS	100	100	fluorokinolon; cefalosporin; glicilciklin; cefamicin; penam; tetraciklin; rifamicin; fenikol; triklozán
APH(2'')-IIa	100	95,65	aminoglikozid
baeR	100	99,17	aminoglikozid; aminokumarin
CfxA6	67,37	99,1	cefamicin
cpxA	100	100	aminoglikozid; aminokumarin
CRP	62,38	98,47	makrolid; fluorokinolon; penam
emrA	100	99,74	fluorokinolon
emrB	100	100	fluorokinolon
emrK	100	100	tetraciklin
emrY	100	99,41	tetraciklin
eptA	100	99,82	peptid
ErmG	65,98	98,14	makrolid; linkóزامidok; streptogramin
Escherichia coli acrA	92,7	100	fluorokinolon; cefalosporin; glicilciklin; penam; tetraciklin; rifamicin; fenikol; triklozán
Escherichia coli acrR with mutation conferring multidrug antibiotic resistance	100	100	fluorokinolon; cefalosporin; glicilciklin; penam; tetraciklin; rifamicin; fenikol; triklozán
Escherichia coli ampC beta-lactamase	100	97,08	cefalosporin; penam
Escherichia coli ampH beta-lactamase	100	99,74	cefalosporin; penam
Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin	94,87	99,74	elfamicin
Escherichia coli emrE	100	97,27	makrolid
Escherichia coli GlpT with mutation conferring resistance to fosfomicin	100	99,78	fosfomicin
Escherichia coli marR mutant conferring antibiotic resistance	100	98,61	fluorokinolon; cefalosporin; glicilciklin; penam; tetraciklin; rifamicin; fenikol; triklozán
Escherichia coli mdfA	100	97,07	tetraciklin; benzalkonium klorid; rodamin
Escherichia coli soxR with mutation conferring antibiotic resistance	100	100	fluorokinolon; cefalosporin; glicilciklin; penam; tetraciklin; rifamicin; fenikol; triklozán
Escherichia coli soxS with mutation conferring antibiotic resistance	100	100	fluorokinolon; monobaktám; karbapenem; cefalosporin; glicilciklin; cefamicin; penam; tetraciklin; rifamicin; fenikol; triklozán; penem
evgA	100	100	makrolid; fluorokinolon; penam; tetraciklin
evgS	100	99,75	makrolide; fluorokinolon; penam; tetraciklin
gadX	100	100	makrolid; fluorokinolon; penam
H-NS	70,07	100	makrolid; fluorokinolon; cefalosporin; cefamicin; penam; tetraciklin
kdpE	100	99,56	aminoglikozid

marA	100	100	fluorokinolon; monobaktám; karbapenem; cefalosporin; glicilciklin; cefamicin; penam; tetraciklin; rifamicin; fenicol; triklozán; penem
mdtA	100	98,55	aminokumarin
mdtB	98,85	99,61	aminokumarin
mdtE	100	100	makrolid; fluorokinolon; penam
mdtF	100	100	makrolid; fluorokinolon; penam
mdtG	100	100	fosfomicin
mdtH	100	99,75	fluorokinolon
mdtM	100	97,07	fluorokinolon; linkóزامid; nukleozid; akridinfesték; fenikol
mdtN	100	100	nukleozid; akridinfesték
mdtO	100	99,85	nukleozid; akridinfesték
mdtP	100	99,8	nukleozid; akridinfesték
mphB	86,71	98,53	makrolid
msbA	100	100	nitroimidazol
PmrF	100	100	peptid
tet(40)	100	97,54	tetraciklin
tetQ	94,98	96,79	tetraciklin
ToIC	99,6	100	makrolid; fluorokinolon; aminoglikozid; karbapenem; cefalosporin; glicilciklin; cefamicin; penam; tetraciklin; peptid; aminokumarin; rifamicin; fenikol; triklozán; penem
YojI	100	100	peptid

Az 1. táblázat a mintában található rezisztenciagéneket, a hozzájuk tartozó rezisztencia mechanizmusokat, az azonosságot és lefedettséget mutatja be.

A rezisztencia legvalószínűbb okának tartják a rezisztencia horizontális terjedését, azon belül is a plazmid által végbement horizontális géntranszfert. A folyamat során a DNS egy szakasza sejtosztódás nélkül adódik át egy másik baktériumnak, amelyet beépítve a genomjába képes lesz majd arra, hogy tovább örökítse (Stokes and Gillings, 2011).

A mintában a következő gének nagy valószínűséggel plazmidon helyezkednek el, így növelve a horizontális géntranszfer esélyét: AAC(6')-Im; APH(2'')-IIa; baeR; CfxA6; *Escherichia coli* marR mutant conferring antibiotic resistance; marA.

5. Megbeszélés

5.1 Baktériumok

A baktériumok kimutatására elsősorban a tenyésztésen alapuló vizsgálatokat használják, a metagenom vizsgálatok ezek mellett még kiegészítő jelleggel alkalmazott eljárások. Ennek az új módszernek az előnyei közé sorolható, hogy olyan baktériumok is kimutathatóak, amelyeket a hagyományos eljárás során nem lehetséges. Az emberek és az állatok teljes bélmikrobiomja feltárható, és vizsgálható annak változása. Vizsgálataink során 28 baktérium nemzetség fajait sikerült azonosítani sertés bélsárból (Tóth et al., 2020). A következőkben a szekvenálás eredményeként azonosított nemzetségek tagjait jellemzem és térek ki állatorvosi jelentőségükre.

Az *Acidaminococcus* nemzetség tagjai Gram-negatív, anaerob baktériumok, amelyek aminosavakat használnak fel elsődleges energiaforrásként növekedésükhöz és anyagcsere aktivitásukhoz. Az aminosav fermentáció következtében ecetsav, vajsav és CO₂ keletkezik (Rogosa, 2014). Morfológiájukat tekintve 0,1-0,2 mm átmérőjű, fehér vagy szürkés színű diplococcusok, olykor ovális vagy vese alakú telepeket képeznek (Rogosa, 2014). Emberi bélcsatornából is kimutatták, időnként okozhat megbetegedést, de gyakran a különböző fertőzésekhez társul (Callaway et al. 2010; Chatterjee et al, 1995).

Az *Alistipes* nemzetség viszonylag új baktérium nemzetségnek tekinthető, amely közel 13 fajból áll. Tagjai Gram-negatív, anaerob, spóráképző, rúd alakú baktériumok, amelyek körülbelül 0,1-0,3 mm nagyságú, szürke telepeket képeznek véres agaron. A nemzetség felfedezésekor elsősorban orvosi klinikai mintákból izolálták az emberi bélmikrobiom tagjaként. Megtaláltál azonban őket vakbélgyulladásos kórképekhez és vastagbélrákhoz kötődően is (Parker et al., 2020). Az *Alistipes* fajok az emberi és állati bélcsatornában találhatóak meg, és azt feltételezik, hogy szimbiotikus kapcsolatban élnek a gazda szervezetével (Kulagina et al., 2012).

A *Bacillus* nemzetség tagjai Gram-pozitív, aerob, spórás, pálcika alakú baktériumok. Természetes körülmények között is megtalálhatóak az állatok és az ember bélcsatornájában, és bőrén is, valamint a talajban, növényeken, természetes vizekben, kivéve a *Bacillus anthracis*. A *Bacillus* nemzetségbe tartozó baktériumok közül a szaprofita fajok a természetben elterjedtek, különösen a *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* és *Bacillus megaterium*. A Bacillusok

egyres fajai antibiotikum termelésre képesek. A *Bacillus licheniformis* a bacitracinokat, míg a *Bacillus polymyxa* polimixineket termel (Medveczky et al., 1998).

A *Bacteroides* nemzetség tagjai Gram-negatív, szigorúan anaerob, nem spóráképző, vastag pálca alakú baktériumok (Mitsuoka et al., 1974).

Szigorúan anaerob, Gram-pozitív, nem spóráképző baktériumok alkotják *Blautia* nemzetséget, amelyek a *Firmicutes* osztályba tartoznak. Coccoid vagy ovális alakkal rendelkeznek, állati és emberi bélsárból egyaránt izolálták (Park et al., 2012). A *Blautia* nemzetségbe számos faj tartozik, mint például *Blautia luti*, *Blautia producta*, *Blautia schinkii*. A *Blautia* baktériumokat, mint széklet indikátorait vizsgálták folyók vizéből az emberi és állati ürülék nyomon követésére (Koskey et al., 2014). Egy kutatás során megállapították, hogy a szervátültetést követően kialakuló graft-versus-host-betegséget (GVHD) befolyásolja, vagyis csökkenti a betegség előfordulását és elősegíti a túlélést a *Blautia* nemzetség tagjainak nagyobb arányú előfordulása, így csökkenti a GVHD mortalitását (Jenq et al., 2015).

A Clostridiumok nemzetségébe tartozó Gram-pozitív, anaerob, spórák baktériumok morfológiájukat tekintve 1-2 mikrométer nagyságúak, pálca alakúak, akár hosszú fonalakat is képezhetnek. A talajban fontos szerepet játszanak a szerves anyagok lebontásában. Természetes előfordulási helyük a talajban van, de képesek megtelepedni az állat és ember bélcsatornájában betegség előidézése nélkül. Betegséget akkor okoznak, ha a bélből vagy a külvilágból, a talajból a szövetek közé jutnak, és ott elszaporodva károsítják azt. A bélből felszívódó *Clostridium* toxinok is okozhatnak megbetegedést. Állatról állatra nem terjednek. Az általuk okozott betegségeket három csoportba oszthatjuk: gázödémás betegségek, amelyek oka leggyakrabban sebfertőzés, enterotoxaemiák, valamint intoxikációk. Gázödémás betegséget főleg a *Clostridium septicum*, *Clostridium novyi* és *Clostridium histolyticum* okoz, amelyek a rosszindulatú vizenyő nevű kórképet idézik elő, középük tartozik még a *Clostridium chauvoei* is. Az enterotoxémiáért a *Clostridium perfringens* törzsek felelősek emberben, kérődzőben, sertésben és tyúkban, míg intoxikációt a *Clostridium tetani* és a *Clostridium botulinum* okoz (Medveczky et al., 1998; Varga et al., 1999).

A *Clostridioides*, mint *Clostridium difficile* szintén a Clostridiumok családjába tartozó Gram-pozitív, anaerob, spórák baktérium, amely az emberekben és állatokban egyaránt súlyos betegségeket okozhatnak, de az állatokban mint kommenzalista baktériumok is jelen lehetnek. Zoonotikus kórokozó, de korlátozott a közvetlen átadás lehetősége az emberek és állatok között (Weese, 2020). Több állatfajban vizsgálták a *Clostridium difficile* által okozott betegség lefolyását, sertésekben főleg a 10 napnál fiatalabb malacokat betegíti meg, és bennük okoz

súlyos klinikai tüneteket, amely az erőtlejes hasmenés mellett akár hirtelen halállal is jelentkezhet. Enyhébb esetekben csökkent étvágy, csökkent növekedés és hasmenés figyelhető meg (Yaeger et al., 2007). A *Clostridium difficile* jelenléte gyakori a sertésállományokban, sőt egy vizsgálat során kimutattak antimikrobiális rezisztenciával rendelkező törzseket is (Álvarez-Pérez et al., 2013).

A *Collinsella* nemzetség tagjai Gram-pozitív, anaerob, spórát nem képző fajok. Humán kutatások foglalkoztak a bélben való jelenlétükkel, főleg a *Collinsella aerofaciens* baktériummal, amely előfordulása a leggyakoribb az emberi bélcsatornában. PCR alapú módszerekkel vizsgálták őket, és közel 181 *Collinsella* törzset mutattak ki székletből (Kageyama et al., 2000). A *Collinsella aerofaciens* az ember vastagbélében a laktózt hasznosítja, valamint a *Bifidobacteriummal* együtt módosítja a gazdaszervezet epesavait, amelynek következtében megváltoztatják egyes kórokozók fertőző- és megbetegítőképességét a bélben (Rajilić-Stojanović et al., 2014).

A *Corynebacterium*ok Gram-pozitív, spórát nem képző, aerob vagy fakultatív anaerob, pálcika alakú baktériumok, de alakjukat tekintve változatosak. Természetes körülmények között is jelen lehetnek az ember vagy állat nyálkahártyáin és bőrén, az állatokban megtalálható fajok kivétel nélkül fakultatív patogének (Medveczky et al., 1998). Megtalálhatók még a növényzeten, természetes vizekben és a talajban is (Varga et al., 1999). Állatorvosi jelentőséggel bírnak a következőkben részletezett fajok. A *Corynebacterium renale* gennyes hólyag- és vesemedencegyulladást okoz főleg szarvasmarhában, de akár sertésben is. A *Corynebacterium pseudotuberculosis* juhokat, kecskéket és lovakat betegít meg. Kecskében és juhban pseudotuberculosist, azaz elsajtosodással járó nyirokcsomó-gyulladást okoznak, míg lovakban fekélyes nyirokér-gyulladás jelentkezik. Emberek a bőr sérülésein keresztül fertőződhetnek, bennük a nyirokcsomók gennyes gyulladása alakul ki. A *Corynebacterium pseudotuberculosis* exotoxinokat képez, amely a tályogképződést idézi elő (Medveczky et al., 1998). A *Corynebacterium renale*, a *Corynebacterium pilosum* és *Corynebacterium cistidis* sertésekben is okozhat húgyhólyag és húgyvezető gyulladást, valamint gennyes vesemedencegyulladást. Gyakran előfordul, hogy ezeket a betegségeket csak a vágóhídon veszik észre, amennyiben még az állat életében felismerik, akkor penicillinekkal jól gyógyítható (Varga et al., 1999).

A *Desulfovibrio* fajok Gram-negatív, anaerob, nem spórás baktériumok, amelyek előfordulnak a természetben, valamint az állatok és az emberek bélcsatornájában (Lozniewski et al., 1999). Egyes kutatások kimutatták, hogy sertésekben nagyobb mennyiségben vannak

jelen a bél lumenében és a nyálkahártya mintákban is dizentériához kötődő esetekben (Burrough et al., 2017). A sertésdizentéria a vastagbél nyálkahártyájának elhalásával járó, ezáltal nyálkás-véres hasmenéssel jelentkező, nagy gazdasági jelentőséggel bíró betegség hazánkban és világszerte egyaránt. Kórokozója a *Brachyspira hyodysenteriae*, régi nevén *Serpulina hyodysenteriae*, amellyel az állatok szájon át fertőződnek, bélsarukkal ürítik a baktériumokat. Tünetmentes hordozókkal vihetik be a kórokozót a sertésállományokba, amelyben a hajlamosító tényezők következtében a betegség a 10-14 napos lappangási időt követően fellángolhat, amely nagy veszteségeket okozhat a gazdaságban. A sertések gyógyulását követően a baktérium hordozás és ürítés életük végéig fennmarad (Varga et al., 1999).

A *Dysosmobacter* nemzetség tagjai Gram- negatív, anaerob baktériumok, amelyek nem képeznek spórát. Egyelőre kevés kutatás és cikk foglalkozik a *Dysosmobacter* nemzetséggel, egy vizsgálat során azonban emberi bélsárból kimutatták a J115T törzsbe tartozó *Dysosmobacter welbionis* gen. nov., sp. november fajt (Le Roy et al., 2019).

Az *Escherichia* nemzetség az Enterobacteriumok, vagyis a bélbaktériumok közé tartozik, melynek tagjai Gram-negatív, spóra nélküli, aerob, fakultatív anaerob baktériumok, tehát aerob és anaerob körülmények között is képesek szaporodni. Jelentőséggel az *Escherichia coli* faj bír, amelyek természetes körülmények között is jelen lehetnek az állati és emberi bélcsatornában, hajlamosító tényezők következtében megbetegedést okoznak, így fakultatív patogének. Legsúlyosabb betegséget újszülött borjakban és malacokban, valamint választott malacokban képes kialakítani, de megbetegítheti a nyulat, macskát, kutyát, baromfit és az embert is (Medvezky et al., 1998). Sertésekben az újszülött és választott malacok coli-hasmenését és a sertések ödémabetegségét okozza (Varga et al., 1999).

A *Faecalibacterium* fajokkal kevés kutatás foglalkozott, főleg emberekben vizsgálták. Nehéz izolálni, mivel rendkívül érzékeny az oxigénre (Duncan et al., 2002). A *Faecalibacterium* nemzetség egyik faja, a *Faecalibacterium prausnitzii* nagyobb arányban fordult elő az inflammatory bowel disease-ben (IBD), azaz gyulladós bélbetegségben szenvedő betegek bélcsatornájában (Round et al., 2009). Sertés és szarvasmarha bélcsatornájából is kimutatták a *Faecalibacterium prausnitzii* jelenlétét (Foditsch et al., 2014).

A *Flavonifractor* fajok Gram-pozitív, anaerob baktériumok, amelyek természetes körülmények között jelen vannak az emberi és állati bélcsatornában, de klinikai jelentőségük csekély (Berger et al., 2018).

A *Lachnoclostridium* nemzetség tagjai Gram-negatív, pálcika alakú baktériumok, amelyek szintén az emberi és állati mikrobiom tagjai, kevés klinikai jelentőséggel bírnak (Amadou et al., 2016).

A Lactobacillusok, vagyis a tejsavbaktériumok Gram-pozitív, mikroaerofil baktériumok, amelyek egyedi tulajdonsága, hogy a cukor fermentációja során tejsavat állítanak elő (Miller et al., 2000). Nélkülözhetetlenek egyes élelmiszerek, mint például bizonyos tejtermékek előállításához (Wood, 1998). Természetes lakója az állatok bél és hüvely nyálkahártyájának (Kandler, 1983). A Lactobacillusok képesek bakteriocinek, vagyis bizonyos antimikrobiális fehérjék előállítására. Ezeket a tulajdonságokat ismerve felhasználják őket az élelmiszerbiztonság és -minőség területén, valamint antibiotikum helyettesítéseként az orvostudományban (Twomey et al., 2002).

A *Megasphaera* fajok szigorúan anaerob mikroorganizmusok, amelyek az emberek és állatok, köztük a sertések bélrendszerében, mint kommenzalista baktériumok vannak jelen (Allison, 1978). A gastrointestinalis traktusban részt vesznek különböző anyagok lebontásában, mint például a laktátok, cukrok és aminosavak metabolizmusában (Rogosa et al., 1984). Sertések takarmányozása és a *Megasphaera elsdenii* faj mennyisége közötti összefüggések vizsgálata során különböző antibiotikum-, elsősorban ampicillin-rezisztens és tetraciklin-rezisztens törzset találtak közöttük, amelynek jelenlétét a bélben antibiotikum-érzékeny törzsekkel próbálták befolyásolni (Stanton et al., 2011).

A *Muribaculum* nemzetség tagjai szigorúan anaerob, pálcika alakú baktériumok (Lagkouvardos et al., 2016). Klinikai jelentőségük csekély, kevés kutatás foglalkozik a *Muribaculum* fajok jelenlétével a bélesatorna mikrobiomjában.

Az *Oscillibacter* baktériumok Gram-negatívak, anaerobok, spórát nem képeznek, valamint morfológiájukat tekintve rúd alakúak (Iino et al., 2007). Egyes kutatások arra mutattak rá, hogy ezek a fajok már újszülött korban nagy számmal jelen vannak a béltraktusban, ami a jó alkalmazkodóképességüknek köszönhető (Palmer et al., 2007).

A *Paenibacillus* fajok természetes előfordulási helye lehet még a bélcsatornán kívül a bőrfelszín, valamint a talaj és a növények gyökereinek felszíne (Kim et al., 2015). A nemzetség tagjainál felfedezték antimikrobiális és antioxidáns hatásukat (Liang et al., 2014; Raza et al., 2011).

A *Prevotella* nemzetségbe Gram-negatív, pálcika alakkal rendelkező baktériumok tartoznak, amelyek mind az emberi mind az állati bélmikrobiom természetes tagjai (Margolis

et al., 2015). Sertésekben a *Prevotella* fajok főleg a bél hátulsó szakaszában fordulnak elő (Flint et al., 2014).

A *Pseudomonas* fajok Gram-negatív, aerob, pálcika alakúak rendelkező baktériumok, amelyek nagyrészt szaprofiták, de van közöttük néhány jelentős patogén vagy fakultatív patogén kórokozó is. Állatorvosi szempontból jelentősek a *Pseudomonas mallei*, *Pseudomonas pseudomallei* és a *Pseudomonas aeruginosa*. Természetes körülmények között a szaprofita fajok, valamint kis számban a *Pseudomonas aeruginosa* található meg az emberek és állatok bélrendszerében. Sertésekben a *Pseudomonas pseudomallei* és a *Pseudomonas aeruginosa* okoz megbetegedést. A *Pseudomonas pseudomallei* melioidosist, azaz gennyes beolvadásokkal járó betegséget idéz elő, míg az utóbbi metritist, mastitist, sebfertőzéseket, valamint szeptikémiát okozhat (Medveczky et al., 1998).

A *Roseburia* nemzetségbe Gram-pozitív, rúd alakúak rendelkező, anaerob, nem spórás baktériumok tartoznak (Duncan et al., 2002). A nemzetség öt fajból áll, amelyek a *Roseburia cecicola*, *Roseburia inulinivorans*, *Roseburia faecis*, *Roseburia intestinalis* és *Roseburia hominis*. Ezek a fajok különböző termékeik révén befolyásolják a bélmozgást, gyulladásgátló és immunfolyamatokat elősegítő hatásokkal rendelkeznek (Tamanai-Shacoori et al., 2017).

A *Ruminococcus* fajok Gram-pozitív, szigorúan anaerob, coccoid alakú baktériumok, amelyek egy része cellulolitikus tulajdonságokkal rendelkezik, tehát képesek a cellulóz bontására (Varel et al., 1983). A nevükkel ellentétben nem csak a kérődzők bélcsatornájában található meg, hanem valamennyi növény- és mindenevő állat valamint az ember mikrobiomjának részei. Sertésben a *Ruminococcus bromii* található meg, amely a bélcsatornában képes a keményítő lebontására (La Reau et al., 2016; Ze et al., 2012).

A *Ruthenibacterium* nemzetség tagjai Gram-negatív, szigorúan anaerob, spórát nem képző, morfológiájukat tekintve rúd alakúak rendelkező baktériumok (Shkoporov et al., 2016). A normál bélmikrobiom része, állatokban klinikai jelentőségéről nem számoltak be kutatások.

A *Selenomonas* nemzetség rúd alakúak rendelkező, Gram-negatív, anaerob baktériumokból áll, melyek természetes előfordulási helye az emberek és állatok bélcsatornája, azonban megfigyelték már mocsaras vízben és szennyvízben is (Azuma et al., 1979; Dworkin, 2006; Leifson et al., 1960).

A *Streptococcus* nemzetséget alkotó fajok Gram-pozitívak, közöttük előfordulnak aerobok, fakultatív anaerobok és obligát anaerobok is. Gömb vagy ovális alakúak rendelkező kórokozók, amelyek láncokat képeznek. Széles körben megtalálhatóak, előfordulnak az állatok és emberek bélcsatornájában, szájüregében, légutakban, bőrön, húgy- és nemi utakban,

valamint bekerülhetnek a tejbe és a szennyvizekbe is. Fakultatív patogének, hajlamosító tényezők hatására okoznak megbetegedést. A sertések Streptococcusai a *Streptococcus suis* és *Streptococcus porcinus*, mindkét faj természetes körülmények között is megtalálhatóak a sertések tonsillájában és orrüregében. A *Streptococcus suis* arthritist, tüdőgyulladást, szeptikémiát, metritist, mastitist és meningoencephalitist okozhat, míg a *Streptococcus suis* által előidézett betegség a feji nyirokcsomók eltályosodásával jár. A streptococcosis következtében a vemhes kocák elvetélhetnek. Megbetegedést okozhat még sertésben a lovak Streptococcusai a *Streptococcus equi subsp. equisimilis*, mely az előbb említett kórokozókhoz hasonló tüneteket okoz (Medveczky et al., 1998; Varga et al., 1999).

A *Streptomyces* nemzetség Gram-pozitív, gombákra emlékeztető alakú baktériumokból áll, melyek különleges tulajdonságuk bizonyos másodlagos anyagcseretermékek képzése. Ezek a metabolitok antivirális, antibakteriális, immunszuppresszív és antihipertenzív hatással rendelkeznek (Khan et al., 2011).

5.2 Rezisztenciagének és antibiotikumok

Vizsgálataink során az 1. táblázatban (21-22. oldal) látható rezisztenciagéneket találtuk. Ezek közül is legnagyobb jelentőséggel azok bírnak, amelyek plazmidon helyezkednek el, így nagyobb eséllyel megy végbe horizontális géntranszfer a baktériumok között. Ezek a gének a következők voltak: AAC(6')-Im; APH(2'')-IIa; baeR; CfxA6; *Escherichia coli* marR mutant conferring antibiotic resistance; marA.

Az AAC(6')-Im egy plazmid által kódolt gén az *Escherichia coli* és az *Escherichia faecium* baktériumokban, mely a rezisztenciát az antibiotikum inaktivációja révén alakítja ki. Az aminoglikozidok az az antibiotikum csoport, amely ellen ez az AAC(6')-Im gén rezisztenciát kódol (CARD, McArthur et al., 2013). A Staphylococcusok, valamint Gram-negatív aerob kórokozók ellen hatásosak. Fő képviselői a streptomycin, spektinomycin, neomicin, gentamicin, amikacin és tobramicin. Hatásukat a fehérjeszintézis gátlása révén fejtik ki a 30S riboszóma alegységen, de ehhez be kell jutniuk a sejtbe, amely folyamatot azok az antibiotikumok segíthetik elő, amelyek a sejtfal szintézisét gátolják, ezáltal hatékonyságuk növekszik. Ezen kívül az aminoglikozidok hatásukat úgy is kifejezhetik, hogy hozzákötődnek a kórokozó RNS-éhez, amely által strukturális károsodást idéznek elő. Koncentráció-függő baktericidek, amelyek posztantibiotikus hatással rendelkeznek. A rezisztencia kialakulásának oka

enzimatis inaktiválás, amelyet plazmid közvetít. A rezisztencia igen gyakori az *Escherichia coli* és bizonyos Salmonellák esetében (Gálfi et al., 2015).

Az APH(2'')-IIa gén kromoszóma által kódolt az *Escherichia coli* és *Escherichia faecium* törzsekben, valamint plazmidon is elhelyezkedhet. Ez a gén is az aminoglikozidok elleni rezisztencia kialakításában játszik szerepet, melynek mechanizmusa szintén az antibiotikum inaktivációja (CARD, McArthur et al., 2013).

A baeR gén antibiotikum efflux révén alakít ki rezisztenciát az aminokumarin és aminoglikozid antibiotikumokkal szemben. Az aminokumarin antibiotikum csoport tagjai a klorobiocin, coumermycin A1 és a novobiocin. (Maxwell et al., 1999) Az aminokumarinokat a *Streptomyces* fajok termelik (Tamura et al., 2008).

A CfxA6 gén a cefamicin antibiotikum elleni rezisztenciáért felelős az *Acinetobacter baumannii* baktériumban, melyben az antibiotikum inaktivációja történik (CARD, McArthur et al., 2013). A cefamicineket a *Streptomyces lactamdurans* baktérium szintetizálja. A β -laktám antibiotikumok családjába tartoznak, így β -laktámáz enzimekkel szemben rendkívül ellenállóak. A cefotetan és a cefoxitin a cefamicinek csoportjába tartozik, melyekre a Gram-negatív kórokozók érzékenyek (Gálfi et al., 2015; Daoust et al., 1972).

Az *Escherichia coli* marR mutant conferring antibiotic resistance nevű gén az antibiotikum céljának megváltoztatása, valamint az antibiotikum efflux vagyis az antibiotikum baktériumsejtből való kipumpálása révén biztosít ellenállást. Ez a rezisztenciagén sok antibiotikum család hatása elleni rezisztenciáért felelős, melyek a fluorokinolonok, tetraciklinek, cefalosporinok, fenikolok, glicilciklin, triklozán, penam és rifamicin antimikrobiális szerek (CARD, McArthur et al., 2013). A továbbiakban ezeket az antibiotikum csoportokat mutatom be.

A fenikolok is rendkívül széles spektrummal rendelkeznek hatásukat tekintve. Gram-negatív és Gram-pozitív, valamint aerob és anaerob baktériumok egyaránt érzékenyek erre az antibiotikum csoportra, melybe a florfenikol, kloramfenicol és a tiamfenikol tartozik. Az 50S riboszóma alegységen gátolják a fehérjeszintézist, ezáltal bakteriosztatikus hatást fejtenek ki. A kloramfenikol ellen gyakori a rezisztencia, valamint gyakran társul keresztrezisztenciával. viszont a kloramfenikol élelmiszer-termelő állatokban, tehát sertésben sem alkalmazható, mivel hosszú ideig jelen van az állatok szervezetében. Sertéseknél a florfenikolt használják légzőszervi fertőzések esetében intramuscularisan vagy akár ivóvízbe keverve (Gálfi et al., 2015).

A tetraciklinek Gram-pozitív és Gram-negatív, aerob és anaerob baktériumok ellen egyaránt hatásosak, valamint érzékenyek rá egyes protozoák, mint például az *Entamoeba* fajok, tehát rendkívül széles spektrummal rendelkeznek. Jelentős képviselői a tetraciklin, klórtetraciklin, oxitetraciklin és a doxiciklin. Bakteriosztatikusak, hatásukat a fehérjeszintézis gátlása révén fejtik ki a 30S riboszóma alegységén. Különös tulajdonságuk a gyulladás-ellenes hatásuk. A tetraciklinek esetében mind a szerzett, mind az ab ovo rezisztencia nagyon gyakori. Ab ovo rezisztensek a mycobacteriumok, a *Serratia* fajok nagy része, a *Proteus vulgaris* és a *Pseudomonas aeruginosa*. Szerzett rezisztencia gyakori az *Enterobacteriaceae* család tagjai esetén. A tetraciklineket régen hozamfokozásra is használták sertéseknél, ennek is köszönhető a kialakult nagyfokú rezisztencia (Gálfi et al., 2015).

A rifamicinekre Gram-pozitív baktériumok érzékenyek főleg, velük szemben baktericid hatással rendelkeznek. A csoport legfontosabb tagja a rifampin. Ezen antibiotikumok hatásukat azáltal fejtik ki, hogy gátolják a DNS-replikációt és az RNS transzkripcióját a baktérium DNS-dependens RNS-polimeráz enzimének gátlásán keresztül. Nagyon gyorsan alakul ki kromozómális rezisztencia, ezért gyakran kombinációban alkalmazzák más antibiotikummal (Gálfi et al., 2015).

A cefalosporinok β -laktám vázzal rendelkező antibiotikumok, a mikrobák sejtfallszintézisének gátlása révén fejtik ki hatásukat. A csoportot rengeteg különböző hatóanyag alkotja, antibakteriális spektrum szerint megkülönböztetünk 1., 2., 3., 4. és 5. generációs cefalosporinokat, valamint a generációba sorolást befolyásolja még a laktamázal szembeni ellenállóképesség is. Generációtól függően a hatóanyagokra Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok is érzékenyek, kifejezetten hatásosak a Staphylococcusok ellen, mivel ellenállóak az általuk termelt penicillinázzal szemben. A csoport elleni rezisztencia több módon is kialakulhat, leggyakoribb formája a β -laktamáz enzim termelése. Egyes baktériumok ab ovo rezisztensek a cefalosporinokkal szemben, ezek a Mycoplasmák, mert nem rendelkeznek sejtfallal, továbbá a Mycobacteriumok, amelyek sav-és alkoholálló sejtfaluk nem engedi be az antibiotikumot a sejtbe. Az MRSA törzsek esetében az ellenállás gén mutáció következtében alakul ki, amely a penicillin binding protein-ek (PBP) képződését befolyásolja (Gálfi et al., 2015).

Az állatgyógyászatban gyakran használt fluorokinolonok a sejtosztódás, a DNS-szintézis és az mRNS transzkripciójának befolyásolásán keresztül fejtik ki koncentráció-függő, baktericid hatásukat. Négy generációt különböztetünk meg, amelyek közül az 1. generációs szerek, mint oxolinsav és nalidixsav már elavultak és nem használatosak. A 2. és 3. generációs

kinolonokra főleg a Gram-negatív mikrobák és az intracelluláris kórokozó érzékenyek. A 4. generációt alkotó szerek, mint például a pradofloxacin már Gram-negatív és Gram-pozitív kórokozók, valamint anaerobok okozta fertőzések kezelésére is kiválóan alkalmasak. Leggyakrabban a gének mutációja felelős a fluorokinolonokkal szemben kialakuló rezisztenciáért, főleg az MRSA- és MRSE törzsek esetében (Gálfi et al., 2015).

A glicilciklin, másnéven tigeziklin a hosszú hatású tetraciklinek csoportjába tartozik, érzékenyek rá a Gram-negatív és pozitív, valamint aerob és anaerob baktériumok is (Gálfi et al., 2015; Höck, 2012). Kifejezetten alkalmas intracelluláris baktériumok, multirezisztens kórokozók, ESBL-termelő enterobaktériumok, *Acinetobacter* és Vankomicin Rezisztens *Enterococcus* (VRE) törzsek okozta fertőzések kezelésére. A glicilciklin ellen kialakult rezisztencia oka leggyakrabban a 16S rRNS mutációja (Höck, 2012).

A triklozán főleg anaerob Gram-negatív kórokozók ellen hatásos antibakteriális szer, de élesztők és gombák is érzékenyek rá (Brading and Marsh., 2003). A baktériumsejtbe bejutva az RNS szintézis és a zsírsav szintézis gátlása révén fejt ki antibakteriális hatását (Russell, 2004). Jones és munkatársai (2000) leírták, hogy a triklozán különösen hatásos olyan *Staphylococcus* okozta fertőzések kezelésére, amelyek a legtöbb antibiotikumnak ellenállnak. A triklozán ellen is kialakulhat rezisztencia, amelynek oka valószínűleg az enoil-reduktáz mutációja (Russell, 2004).

A penam antibiotikumok, azaz a penicillinek a β -laktám antibiotikumok csoportjába tartoznak, az első ismert antibakteriális szerek. A penészgombák által termelt penicillineket Sir Alexander Fleming fedezte fel 1928-ban. Négy különböző csoportot különíthetünk el, mint klasszikus, szűk spektrumú penicillinek, penicillináz stabil penicillinek, szélesített spektrumú, valamint *Pseudomonas*-ellenes penicillinek. Általánosságban elmondható, hogy a penicillinek rendkívül széles spektrumúak, Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok ellen is hatásosak. Kivételt képez ez alól a penicillináz-stabil penicillinek, mivel erre a csoportra csak a Gram-pozitív kórokozók érzékenyek. Hatásukat a baktériumsejt sejtfalában található peptidoglikánváz szintézisének gátlása révén fejtik ki. Hatásmódjukat tekintve időfüggő baktericidek, tehát nem a dózis növelésével, hanem a hosszabb kezeléssel érhetjük el a várt eredményeket. A penicillinekkal szemben viszonylag gyakran fordul elő ab ovo és szerzett rezisztencia is. A szerzett rezisztenciát leggyakrabban a baktériumok által termelt β -laktamáz, azaz a penicillináz enzim okozza, amely a β -laktámgyűrű hasítása révén hatástalanítja a penicillineket (Gálfi et al., 2015).

A marA gén a baktériumsejtben oly módon alakít ki rezisztenciát az antibiotikummal szemben, hogy fokozza az antibiotikum kiáramlását a sejtől és csökkenti a sejtfal permeabilitását ezen anyagokkal szemben. A tetraciklinek, fluorokinolonok, fenikol, penam, karbapenem, cefalosporin, cefamicin, rifamicin, triklozán, monobaktám, penem és glicilciklin antibiotikum csoportok, amelyek rezisztenciájáért a marA gén felelős. A gén főleg az *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Salmonella* és *Shigella* fajokban található meg (CARD, McArthur et al., 2013).

A karbapenem az állatgyógyászatban viszonylag ritkán alkalmazott antibiotikumcsoport, melynek tagjai a meropenem, imipenem és a biapenem. Széles antimicrobiális spektrummal rendelkeznek, hatásosak mind Gram-negatív, mind Gram-pozitív kórokozók ellen. Rezisztenciát mutat azonban a *Pseudomonas aeruginosa*, *MRSA* és *MRSE* törzsekkel szemben. Ritka állatgyógyászati alkalmazásuk alól kivételt képez azonban a társállatok életét fenyegető fertőzések (Gálfi et al., 2015).

A monobaktám antibiotikumok, mint aztreonam és tigemonam az állatorvosi gyakorlatban ritkán használatosak. Érzékenyek rá a Gram-negatív aerob és a tápigényes Gram-negatív baktériumok. Ezek közül is kifejezetten hatásosak a *Pseudomonas aeruginosa* törzsekre, valamint az *Enterobacteriaceae* családba tartozó kórokozókra. Rezisztencia ritkán alakul ki ellenük (Gálfi et al., 2015).

A penem antibiotikumok széles antibakteriális spektrummal rendelkeznek, hiszen Gram-negatív és Gram-pozitív kórokozók egyaránt érzékenyek rájuk (Inoue et al., 1994).

A tetraciklinek, fluorokinolonok, fenikol, penam, cefalosporin, cefamicin, rifamicin, triklozán és glicilciklin antibiotikumok az előbb felsorolt géneknél kerültek részletezésre.

Vizsgálataink során igen jelentős rezisztómot találtunk a mintánkban, amely azt valószínűsítheti, hogy a túlzott antibiotikum felhasználás igen nagymértékű antibiotikum rezisztenciagén-felhalmozódást idézett elő a sertések bélmikrobiomjában. A rezisztencia súlyos jelenléte nem csak a sertésekre van hatással, hanem fontos közegészségügyi kockázattal is bír, például a vágás során előforduló húskontamináció miatt. Az antibiotikum felhasználást jelentősen csökkenteni kell, a célzott és helyes antibiotikum-alkalmazás mellett a termelés növelését, optimalizálását is más módszerek segítségével kell megoldani. Ezt az optimális bélmikrobiom segítheti, amely fenntartásában a helyes takarmányozásnak kiemelt szerepe van. Az újgenerációs szekvenálás ezen a téren is segítséget nyújthat, ugyanis a különböző korcsoportoktól vett bélsármintákból felállítható az összefüggés a bélmikrobiom és a takarmányozás között.

6. Összefoglaló

Vizsgálatunk célja az volt, hogy ismereteket szerezzünk egy hazai nagy létszámú sertésállomány kocáinak bélsár bakteriomjának rezisztenciagén tartalmára vonatkozóan. Ennek céljából négy, a mintavételtől számítva öt napon belül fialt szoptató kocától gyűjtöttünk friss bélsármintát. Amelyek elegeyből kivont össz-DNS szekvenciákat ún. shotgun újgenerációs szekvenálással határoztuk meg. Az így nyert rövid leolvasási szakaszokat genomikai módszerekkel és eszközökkel dolgoztuk fel.

A bélsármintában összesen 28 baktériumnemzetséget találtunk. Az antimikrobiális rezisztenciagének azonosítása során azokat a találatokat tartottuk meg, amelyek esetén az adott nyílt leolvasási keret (open reading frame, ORF) a referencia gént legalább 60% hosszan, legalább 90%-os bázissorrend-azonosságban lefedte. Az antimikrobiális rezisztenciagének (ARG) által befolyásolt antibiotikum-osztályokra kigyűjtöttük a maximális lefedettségben és szekvenciális azonosságban talált ORF-eket. Ezek alapján az akridinfesték, aminokumarin, karbapenem, cefalosporin, cefamicin, fluorokinolon, glicilciklin, makrolid, monobaktám, nitroimidazol, nukleozid, penam, penem, peptid, fenikol, rifamicin, tetraciklin, triklozán antibiotikum-osztályok hatását befolyásoló ARG-k tökéletes lefedettséggel és bázissorrend-azonossággal jelen voltak a mintában. Az ARG-ket tartalmazó kontigok taxonklasszifikációja során az esetek többségében csak osztály szintű megbízhatóságú besorolást kaptunk. Ezek alapján az azonosított ARG-k 81%-a *Gammaproteobacteria*, 3.8%-a *Clostridia*, 1.9%-a pedig *Bacteroidia* eredetűnek adódott. Hét ARG esetén fajszinten azonosítottuk a baktériumot, amelyből a gén származhatott. Ezek közül négy *Escherichia coli*, kettő *Clostridioides difficile* és egy *Bacteroides ovatus* eredű lehetett.

A mobilitás elemzés során egyik ARG esetén sem azonosítottunk a szomszédos 10 ORF-en belül olyan ORF-et, amely a rezisztenciagén mobilitását segíthetné. Azonban a plazmideredetre vonatkozó predikció alapján az AAC(6')-Im, az APH(2'')-IIa, a baeR, a CfxA6, az *Escherichia coli* marR mutant conferring antibiotic resistance és a marA gént tartalmazó kontigok nagy valószínűséggel plazmidon helyezkedtek el.

Az alkalmazott vizsgálati megközelítés lehetővé teszi, hogy korábban nem lehetséges módon ismerjük meg állatokból származó minták ARG-tartalmát. Eredményeink megerősítik azt a nézetet, hogy az ARG-k mind az élő szervezetekben, mind a környezetben nagy számban és változatosságban jelen vannak. További vizsgálatok szükségesek arra vonatkozóan, hogy ennek az ARG-gazdagságnak egészségügyi, állategészségügyi jelentőségét megismerjük.

7. Summary

Our study aimed to learn about the resistance gene content of the faecal bacteria of sows in a large producing domestic pig herd. To achieve this, fresh faecal samples were collected from four lactating sows farrowed within five days of sampling. By the mixture of the samples, the total DNA sequence was determined by the so-called "shotgun" next generation sequencing. Short reads were processed by bioinformatics methods and tools.

In total 28 bacterial genera were found in the fecal sample. During the identification of antimicrobial resistance genes, the results were retained for which the given open reading frame (ORF) covered the reference gene for at least 60% of the length and at least 90% of the base sequence identity. ORFs found in maximal coverage, and sequential identity were collected for antibiotic classes affected by antimicrobial resistance genes (ARGs). Based on these acridine dye, aminocoumarin, carbapenem, cephalosporin, cephamycin, fluoroquinolone, glycylicycline, macrolide, monobactam, nitroimidazole, nucleoside, penam, penem, peptide, phenicol, rifamycin, tetracycline, triclosan – ARGs influencing the effect of antibiotic classes were present in the sample with perfect coverage and base sequence identity. In most cases, only class-level reliability was obtained during the taxon-classification of contigs containing ARGs. According to these, 81% of the identified ARGs originated from *Gammaproteobacteria*, 3,8% from *Clostridia*, and 1,9% from *Bacteroidia*. For seven ARGs, we've identified the bacteria from which the gene may have been derived at the species level. Four out of the seven were from *Escherichia coli*, two from *Clostridioides difficile* and one from *Bacteroides* approximately.

We did not identify any ORF within the adjacent 10 ORFs that could aid in the mobility of the resistance gene during the mobility analysis, however, based on the prediction for plasmid origin, AAC(6')-Im, APH(2")-IIa, baeR, CfxA6, *Escherichia coli* marR mutant conferring antibiotic resistance and the ligands containing the marA gene were most likely located on a plasmid.

The methods we applied allow to study the ARG content of biological samples in a way that was not possible before. Our results confirmed the view that ARGs are present in large numbers and diversity in living organisms and in the environment too. Further research is needed to understand the public health and animal health significance of this ARG richness.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Solymosi Norbert egyetemi docensnek és társtémavezetőmnek, Dr. Papp Márton PhD-hallgatónak az útmutatást, a támogatást és a sok segítséget diplomamunkám elkészítéséhez, valamint külön köszönet Dr. Reibling Tamásnak a szakmai segítségért.

Továbbá köszönöm családomnak a kitartó támogatást, amellyel nem csak diplomamunkám megírása, hanem egész egyetemi tanulmányaim során végigkísértek.

Irodalomjegyzék

2003. évi 1831/2003 /EC rendelet a takarmányozási célra felhasznált adalékanyagokról URL: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2003R1831:20100901:HU:PDF> Megtekintve: 2020.10.26.
- Aarestrup, F. M., 2000: Occurrence, selection and spread of resistance to antimicrobial agents used for growth promotion for food animals in Denmark. *APMIS, Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 108(Supplement 101), 0-48.
- Aarestrup, F. M., Bager, F., Jensen, N. E., Madsen, M., Meyling, A., & Wegener, H. C., 1998: Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic-, zoonotic-and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). *Apmis*, 106(7-12), 745-770.
- Alanis, A., J., 2005: Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research* Pages 697-705
- Allen, H. K., 2014: Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. *Current Opinion in Microbiology*, 19, 25-29.
- Allison, M. J., 1978: Production of branched-chain volatile fatty acids by certain anaerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 35(5), 872-877.
- Álvarez-Pérez, S., Blanco, J. L., Peláez, T., Astorga, R. J., Harmanus, C., Kuijper, E., & García, M. E., 2013: High prevalence of the epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in Iberian free-range pigs. *Research in veterinary science*, 95(2), 358-361.
- Amadou, T., Hosny, M., La Scola, B., & Cassir, N., 2016: “*Lachnoclostridium bouchesdurhonense*,” a new bacterial species isolated from human gut microbiota. *New microbes and new infections*, 13, 69.
- Aminov, R. I., 2010: A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* 1, 134
- Andrásófszky, Bersényi, Cenkvári, Fekete, Fébel, Hullár, Szabó, 2009: Állatorvosi takarmányozástan és dietetika, Budapest, Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Budapest, p150-153.
- Azuma, R., Yamanaka, H., Miyagawa, E., Suto, T., & Ito, Y., 1979: Isolation of *Selenomonas* spp. from lesions and non-digestive organs of cows, pigs and man. *National Institute of Animal Health Quarterly*, 19(1-2), 32-39.
- Barna, J., Lengyel, K., Takács, V., K., Billes, V., Sigmond, K., T., Varga, M., Horváth, P., Ari, E., Vellai, T., 2013: Genetikai gyakorlatok, Eötvös Loránd Tudományegyetem, Budapest.
- Barton, M. D., 2014: Impact of antibiotic use in the swine industry. *Current opinion in microbiology*, 19, 9-15.
- Berger, F. K., Schwab, N., Glanemann, M., Bohle, R. M., Gärtner, B., & Groesdonk, H. V., 2018: *Flavonifractor (Eubacterium) plautii* bloodstream infection following acute cholecystitis. *IDCases*, 14, e00461.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B., 2014: Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Brading, M. G., & Marsh, P. D., 2003: The oral environment: the challenge for antimicrobials in oral care products. *International dental journal*, 53(S6P1), 353-362.

- Burrough, E. R., Arruda, B. L., & Plummer, P. J., 2017: Comparison of the luminal and mucosa-associated microbiota in the colon of pigs with and without swine dysentery. *Frontiers in veterinary science*, 4, 139.
- Callaway, T. R., Dowd, S. E., Edrington, T. S., Anderson, R. C., Krueger, N., Bauer, N., ... & Nisbet, D. J., 2010: Evaluation of bacterial diversity in the rumen and feces of cattle fed different levels of dried distillers grains plus solubles using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *Journal of animal science*, 88(12), 3977-3983.
- Chatterjee, B. D., & Chakraborti, C. K., 1995: Non-sporing anaerobes in certain surgical group of patients. *Journal of the Indian Medical Association*, 93(9), 333-5.
- Crofts, T. S., Gasparrini, A. J., & Dantas, G., 2017: Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 422.
- Daoust, D. R., Onishi, H. R., Wallick, H., Hendlin, D., & Stapley, E. O., 1973: Cephamicins, a new family of β -lactam antibiotics: antibacterial activity and resistance to β -lactamase degradation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3(2), 254-261.
- Duncan, S. H., Hold, G. L., Barcenilla, A., Stewart, C. S., & Flint, H. J., 2002: *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(5), 1615-1620.
- Duncan, S. H., Hold, G. L., Harmsen, H. J., Stewart, C. S., & Flint, H. J., 2002: Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(6), 2141-2146.
- Dworkin, M., 2006: The Prokaryotes: Vol. 1: Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology. Springer Science & Business Media
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., ... & Sonnhammer, E. L. L., 2019: The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*, 47(D1), D427-D432.
- European Medicines Agency, 2016: Sales of veterinary antimicrobial agents in 29 European countries in 2014. Trends from 2011 to 2014. Report EMA/236501/2013. European Medicines Agency, London
- Fairbrother, J. M., Nadeau, É., & Gyles, C. L., 2005: *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal health research reviews*, 6(1), 17.
- Fleming, A., 1945: Penicillin. *Nobel Lecture*
- Flint H. J., Duncan S.H., 2014: Bacteroides and Prevotella In: Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition) URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/bacteroidetes> Megtekintve: 2020.10.23.
- Foditsch C, Santos TMA, Teixeira AGV, Pereira RVV, Dias JM, Gaeta N, et al., 2014: Isolation and Characterization of *Faecalibacterium prausnitzii* from Calves and Piglets. *PLoS ONE* 9(12): e116465.
- Gálfi Péter, Csikó György, Jerzsele Ákos, 2015: Állatorvosi gyógyszertertan III., Budapest, Robbie-Vet Kft., p.78-88 p89-112, p113-130, p131-132, p133-134, p135-154, p155-162, p201-205, p213-215, p232-243.
- Ganguly, N. K., Arora, N. K., Chandy, S. J., Fairoze, M. N., Gill, J. P., & Gupta, U., 2011: Global Antibiotic Resistance Partnership (GARP) India Working Group. Rationalizing antibiotic use to limit antibiotic resistance in India. *Indian J Med Res*, 134, 281-94.
- Grada, A., & Weinbrecht, K., 2013: Next-generation sequencing: methodology and application. *The Journal of investigative dermatology*, 133(8), e11.

- Höck, M., & Ziesing, S., 2012: Tetracycline (Doxycyclin) und Glycylcycline. *In Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (pp. 729-731). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Iino, T., Mori, K., Tanaka, K., Suzuki, K. I., & Harayama, S., 2007: *Oscillibacter valericigenes* gen. nov., sp. nov., a valerate-producing anaerobic bacterium isolated from the alimentary canal of a Japanese corbicula clam. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(8), 1840-1845.
- Inoue, E., & Mitsunashi, S., 1994: In vitro antibacterial activity and beta-lactamase stability of SY5555, a new oral penem antibiotic. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(9), 1974-1979.
- Jenq, R. R., Taur, Y., Devlin, S. M., Ponce, D. M., Goldberg, J. D., Ahr, K. F., ... & Docampo, M. D., 2015: Intestinal *Blautia* is associated with reduced death from graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(8), 1373-1383.
- Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K. K., ... & Doshi, S., 2016: CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, gkw1004.
- Jones, R. D., Jampani, H. B., Newman, J. L., & Lee, A. S., 2000: Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *American journal of infection control*, 28(2), 184-196.
- Kageyama, A., Sakamoto, M., & Benno, Y., 2000: Rapid identification and quantification of *Collinsella aerofaciens* using PCR. *FEMS microbiology letters*, 183(1), 43-47.
- Kandler, O., 1983: Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), 209-224.
- Khan, S. T., Komaki, H., Motohashi, K., Kozone, I., Mukai, A., Takagi, M., & Shin-ya, K., 2011: *Streptomyces* associated with a marine sponge *Haliclona* sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. *Environmental Microbiology*, 13(2), 391-403.
- Kim, T. S., Han, J. H., Joung, Y., & Kim, S. B., 2015: *Paenibacillus oenotherae* sp. nov. and *Paenibacillus hemerocallicola* sp. nov., isolated from the roots of herbaceous plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(8), 2717-2725.
- Koskey, A. M., Fisher, J. C., Eren, A. M., Ponce-Terashima, R., Reis, M. G., Blanton, R. E., & McLellan, S. L., 2014: *Blautia* and *Prevotella* sequences distinguish human and animal fecal pollution in Brazil surface waters. *Environmental microbiology reports*, 6(6), 696-704.
- Krawczyk, P. S., Lipinski, L., & Dziembowski, A., 2018: PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. *Nucleic acids research*, 46(6), e35-e35.
- Krikó, E., Farkas, R., Adorján, A., Makrai, L., & Solymosi, N., 2018: Metagenomika-a velünk élő mikroorganizmusok megismerésének új megközelítése. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 140(7), 423-429.
- Kulagina, E. V., Efimov, B. A., Maximov, P. Y., Kafarskaia, L. I., Chaplin, A. V., & Shkoporov, A. N., 2012: Species composition of *Bacteroidales* order bacteria in the feces of healthy people of various ages. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 1112012745-1112012745.
- La Reau, A. J., Meier-Kolthoff, J. P., & Suen, G., 2016: Sequence-based analysis of the genus *Ruminococcus* resolves its phylogeny and reveals strong host association. *Microbial genomics*, 2(12).
- Lagha, A. B., Haas, B., Gottschalk, M., & Grenier, D., 2017: Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary research*, 48(1), 22.
- Lagkouvardos, I., Pukall, R., Abt, B., Foessel, B. U., Meier-Kolthoff, J. P., Kumar, N., ... & Brugiroux, S., 2016: The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-

- specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota. *Nature microbiology*, 1(10), 1-15.
- Langmead, B., Salzberg, S., 2012: Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357–359.
- Le Roy, T., Van der Smissen, P., Paquot, A., Delzenne, N., Muccioli, G. G., Collet, J. F., & Cani, P. D., 2020: *Dysosmobacter welbionis* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces and emended description of the genus *Oscillibacter*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(9), 4851-4858.
- Leifson, E. 1960: Atlas of bacterial flagellation. Academic Press. New York
- Levy, S. B., & Marshall, B., 2004: Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, 10(12), S122-S129
- Lhermie, G., Gröhn, Y. T., & Raboisson, D., 2017: Addressing antimicrobial resistance: an overview of priority actions to prevent suboptimal antimicrobial use in food-animal production. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2114.
- Liang, T. W., Wu, C. C., Cheng, W. T., Chen, Y. C., Wang, C. L., Wang, I. L., & Wang, S. L., 2014: Exopolysaccharides and antimicrobial biosurfactants produced by *Paenibacillus macerans* TKU029. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(2), 933-950.
- Love, D. C., Davis, M. F., Bassett, A., Gunther, A., & Nachman, K. E., 2011: Dose imprecision and resistance: free-choice medicated feeds in industrial food animal production in the United States. *Environmental Health Perspectives*, 119(3), 279-283.
- Lozniewski, A., Maurer, P., Schuhmacher, H., Carlier, J. P., & Mory, F., 1999: First isolation of *Desulfovibrio* species as part of a polymicrobial infection from a brain abscess. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(8), 602.
- Margolis, E., Fredricks, D. N., 2015: Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria In: Molecular Medical Microbiology (Second Edition), Academic Press
- Maxwell, A., 1999: DNA gyrase as a drug target. *Biochem Soc Trans* (1999) 27 (2): 48–53.
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., ... & Kalan, L., 2013: The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(7), 3348-3357.
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., ... & Kalan, L., 2013: The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(7), 3348-3357.
- McMurdie PJ, Holmes S., 2013: phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE* 8(4): e61217.
- Medveczky I., Rusvai M., Tuboly S., Varga J., 1998: Állatorvosi járványtan I. Budapest, Egyetemi Nyomda. p105-107, p107-114, p121-125, p180-182.
- Miller N, Wetterstrom W., 2000: In: The Cambridge World History of Food. Kiple K, Ornelas K, editors. Vol 2. Cambridge, UK: Cambridge Univ Press.
- Mistry, J., Finn, R. D., Eddy, S. R., Bateman, A., & Punta, M., 2013: Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions. *Nucleic acids research*, 41(12), e121-e121.
- Mitsuoka, T., Terada, A., Watanabe, K., Uchida, K., 1974: *Bacteroides multiacidus*, a new species from the feces of humans and pigs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 24(1), 35-41.
- Moudgil, P., Bedi, J. S., Moudgil, A. D., Gill, J. P. S., & Aulakh, R. S., 2018: Emerging issue of antibiotic resistance from food producing animals in India: Perspective and legal framework. *Food reviews international*, 34(5), 447-462.

- Normanno, G., Corrente, M., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Parisi, A., ... & Celano, G. V., 2007: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. *International journal of food microbiology*, 117(2), 219-222.
- Nurk, S., Meleshko, D., Korobeynikov, A., & Pevzner, P. A., 2017: metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome research*, 27(5), 824-834.
- O'Neill, J., 2016: Tackling Drug-Resistant Infections Globally-Final Report and Recommendations. URL: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf Megtekintve: 2020.10.23.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO., 2007: Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLOS Biology* 5(7): e177.
- Park, S. K., Kim, M. S., Roh, S. W., & Bae, J. W., 2012: *Blautia stercoris* sp. nov., isolated from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(4), 776-779.
- Parker, B. J., Wearsch, P. A., Veloo, A. C., & Rodriguez-Palacios, A., 2020: The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. *Frontiers in Immunology*, 11.
- Pataky, M., 1970: Antibiotikumok élelmezéségszsegügyi megítelese a tejvizsgálatban. *Élelmiszervizsgálati Közlem.*
- Pruitt, K. D., Tatusova, T., & Maglott, D. R., 2007: NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl_1), D61-D65.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M., 2014: The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology reviews*, 38(5), 996-1047.
- Raza, W., Makeen, K., Wang, Y., Xu, Y., & Qirong, S., 2011: Optimization, purification, characterization and antioxidant activity of an extracellular polysaccharide produced by *Paenibacillus polymyxa* SQR-21. *Bioresource technology*, 102(10), 6095-6103.
- Riadi, G., Medina-Moenne, C., & Holmes, D. S., 2012: TnpPred: a web service for the robust prediction of prokaryotic transposases. *Comparative and functional genomics*, 2012.
- Rogosa, M., 1969: *Acidaminococcus* gen. n., *Acidaminococcus fermentans* sp. n., anaerobic gram-negative diplococci using amino acids as the sole energy source for growth. *Journal of bacteriology*, 98(2), 756-766.
- Rogosa, M., 1984. Genus III. Megasphaera, p. 685. In Krieg, N. R., & Holt, J. G., 1984: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, v. 1. p.837-942. Based on: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Baltimore, MD : Williams & Wilkins 1984-1989
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K., 2009: The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews immunology*, 9(5), 313-323.
- Russell, A. D., 2004: Whither triclosan?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(5), 693-695.
- Sáenz, J. S., Marques, T. V., Barone, R. S. C., Cyrino, J. E. P., Kublik, S., Nesme, J., ... & Vestergaard, G., 2019: Oral administration of antibiotics increased the potential mobility of bacterial resistance genes in the gut of the fish *Piaractus mesopotamicus*. *Microbiome*, 7(1), 1-14.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R., 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Sharma, C., Rokana, N., Chandra, M., Singh, B. P., Gulhane, R. D., Gill, J. P. S., ... & Panwar, H., 2018: Antimicrobial resistance: its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. *Frontiers in veterinary science*, 4, 237.
- Shetty, S. A., & Lahti, L., 2019: Microbiome data science. *Journal of biosciences*, 44(5), 115.
- Shkoporov, A. N., Chaplin, A. V., Shcherbakova, V. A., Suzina, N. E., Kafarskaia, L. I., Bozhenko, V. K., & Efimov, B. A., 2016: *Ruthenibacterium lactatiformans* gen. nov., sp.

- nov.*, an anaerobic, lactate-producing member of the family *Ruminococcaceae* isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 3041-3049.
- Spisák, S., Lawrenson, K., Fu, Y., Csabai, I., Cottman, R. T., Seo, J. H., ... & Tisza, V., 2015: CAUSEL: an epigenome-and genome-editing pipeline for establishing function of noncoding GWAS variants. *Nature medicine*, 21(11), 1357.
- Stanton, T. B., & Humphrey, S. B., 2011: Persistence of antibiotic resistance: evaluation of a probiotic approach using antibiotic-sensitive *Megasphaera elsdenii* strains to prevent colonization of swine by antibiotic-resistant strains. *Applied and environmental microbiology*, 77(20), 7158–7166.
- Stokes, H. W., & Gillings, M. R., 2011: Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS microbiology reviews*, 35(5), 790-819.
- Tamanai-Shacoori, Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Fong, S. B., ... & Jolivet-Gougeon, A., 2017: *Roseburia spp.*: a marker of health?. *Future microbiology*, 12(2), 157-170.
- Tamber, S., & Hancock, R. E., 2003: On the mechanism of solute uptake in *Pseudomonas*. *Front Biosci*, 8, s472-s483.
- Tamura, T., Ishida, Y., Otoguro, M., Hatano, K., Labeda, D., Price, N. P., & Suzuki, K. I., 2008: Reclassification of *Streptomyces caeruleus* as a synonym of *Actinoalloteichus cyanogriseus* and reclassification of *Streptomyces spheroides* and *Streptomyces laceyi* as later synonyms of *Streptomyces niveus*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(12), 2812-2814.
- Tóth, A., G., Papp, M., Borbély, F., Reibling, T., Makrai, L., Solymosi, N., 2020: Szoptató kockák bélsár-rezisztómja egy hazai nagylétszámú sertésállományban. Közlésre benyújtva.
- Twomey, D., Ross, R. P., Ryan, M., Meaney, B., & Hill, C., 2002: Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 165-185.
- van Rennings, L., von Münchhausen, C., Ottilie, H., Hartmann, M., Merle, R., Honscha, W., ... & Kreienbrock, L., 2015: Cross-sectional study on antibiotic usage in pigs in Germany. *PLoS One*, 10(3), e0119114.
- Varel, V. H., Fryda, S. J., & Robinson, I. M., 1984: Cellulolytic bacteria from pig large intestine. *Applied and environmental microbiology*, 47(1), 219-221.
- Varga, J., Tuboly, S., Mészáros, J., 1999: A háziállatok fertőző betegségei (Állatorvosi járványtan II.) Budapest, Mezőgazda Kiadó, p47-67, p77-78, p90-93, p118-130, p228-229.
- Walsh, C. T. & Wencewicz, T. A. 2014: Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. *J. Antibiot. (Tokyo)* 67, 7–22 2
- Wasteson Y, Hoie S, Roberts MC, 1994: Characterization of antibiotic resistance in *Streptococcus suis*. *Vet Microbiol* 41:41–49
- Weese, J. S., 2020: *Clostridium (Clostridioides) difficile* in animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(2), 213-221.
- World Health Organization, 2001: WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance URL: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66860/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.2.pdf Megtekintve: 2020.10.25.
- World Health Organization, 2014: WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health URL: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/> Megtekintve: 2020.10.25.

- Yaeger, M. J., Kinyon, J. M., & Songer, J. G., 2007: A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(1), 52-59.
- Ze, X., Duncan, S. H., Louis, P., & Flint, H. J., 2012: *Ruminococcus bromii* is a keystone species for the degradation of resistant starch in the human colon. *The ISME journal*, 6(8), 1535–1543.

Ábrajegyzék

1. ábra: A rezisztencia kialakulásának okai: Sharma, C., Rokana, N., Chandra, M., Singh, B. P., Gulhane, R. D., Gill, J. P. S., ... & Panwar, H., 2018: Antimicrobial resistance: its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. *Frontiers in veterinary science*, 4, 237.
2. ábra: Általános rezisztencia mechanizmusok: Crofts, T. S., Gasparini, A. J., & Dantas, G., 2017: Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(7), 422.
3. ábra: Az adatfeldolgozás lépései: Saját ábra.
4. ábra: A vizsgált mintában található baktériumok nemzetség szinten: Tóth, A., G., Papp, M., Borbély, F., Reibling, T., Makrai, L., Solymosi, N., 2020: Szoptató kocák bélsár-rezisztómja egy hazai nagylétszámú sertésállományban. Közlésre benyújtva.
5. ábra: Maximális ORF lefedettség és egyezés antibiotikumonként: Tóth, A., G., Papp, M., Borbély, F., Reibling, T., Makrai, L., Solymosi, N., 2020: Szoptató kocák bélsár-rezisztómja egy hazai nagylétszámú sertésállományban. Közlésre benyújtva.

Konzulensi ellenjegyzés

Alulírott Dr. Solymosi Norbert igazolom, hogy Borbély Flóra Szoptató kocák bélsár-rezisztómja egy hazai nagy létszámú sertésállományban című diplomamunkáját ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2020.11.16.



.....

Dr. Solymosi Norbert

Bioinformatikai Központ

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Borbély Flóra

Elérhetőség (e-mail cím): borbelyflora96@gmail.com

A feltöltendő mű címe: Szoptató kocák bélsár-rezisztómja egy hazai nagy létszámú sertésállományban

A mű megjelenési adatai: 2020

Az átadott fájlok száma: 1

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

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

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

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

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

az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,

a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,

csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

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



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

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

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

Budapest, 2020. év 11. hó 16. nap



aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

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

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

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