

Az antimikrobiális rezisztenciagének jelenléte állatorvosi vakcinajelölt törzsekben, probiotikumokban és tejtermékekben

One Health szemléletű elemzés

Kerek Ádám^{1,2*}, Nagy Zoltán³, Jerzsele Ákos^{1,2}

¹Állatorvostudományi Egyetem, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, Budapest, Magyarország

²Fertőző Állatbetegségek, Antimikrobiális Rezisztencia, Állatorvosi Közegészségügy és Élelmiszerlánc-biztonság Nemzeti Laboratórium, Állatorvostudományi Egyetem, Budapest

³CEVA-Phylaxia Zrt., Innovációs és Kutatás-fejlesztési Igazgatóság, Budapest, Magyarország

*Levelező szerző, e-mail: kerek.adam@univet.hu

Beérkezett: 2025. augusztus 15.; elfogadva: 2026. január 13.

Összefoglalás

Az antimikrobiális rezisztencia (AMR) terjedése globális kihívás, amelyben egyre hangsúlyosabb az állategészségügyi készítmények és az élelmiszerlánc szerepe. Jelen tanulmány célja vakcinajelölt *Escherichia coli* törzsek, állatgyógyászati probiotikumok és nyerstej-eredetű élelmiszerek antimikrobiális rezisztenciagénekkel (ARG) való terheltségének vizsgálata volt. A fenotípusos és genetikai vizsgálatok során minden esetben kimutathatók voltak közegészségügyi szempontból fontos ARG-k. Ezek több esetben plazmidon voltak, ami a horizontális génátadás kockázatát is felveti. Az eredmények felhívják a figyelmet az említett termékek lehetséges szerepére a rezisztenciagének terjesztésében. Szükséges a szabályozás felülvizsgálata és az ARG-szűrés beemelése az engedélyezési eljárásokba, a One Health szemlélet jegyében.

Kulcsszavak: antimikrobiális rezisztencia, *Escherichia coli*, probiotikumok, tejtermékek, új generációs szekvenálás (NGS)

Presence of antimicrobial resistance genes in veterinary vaccine candidate strains, probiotics, and dairy products – A One Health-based overview

Ádám Kerek^{1,2}, Zoltán Nagy³, Ákos Jerzsele^{1,2}

¹Department of Pharmacology and Toxicology, University of Veterinary Medicine, Budapest, Hungary

²National Laboratory of Infectious Animal Diseases, Antimicrobial Resistance, Veterinary Public Health and Food Chain Safety, University of Veterinary Medicine, Budapest, Hungary

³Innovation and Research and Development Directorate, CEVA-Phylaxia Zrt., Budapest, Hungary

Summary

The spread of antimicrobial resistance (AMR) is a major public health threat. While antibiotic misuse in medicine is a key driver, veterinary products and the food chain are increasingly recognized as antimicrobial resistance gene (ARG) sources. This review summarizes a four-year Hungarian study on ARGs in vaccine candidate *Escherichia coli* strains, probiotics for companion and food animals, and raw milk-based products.

Our objectives included identifying the extent and diversity of ARGs in these matrices, characterizing the mobile genetic elements associated with ARGs, and evaluating the potential for horizontal gene transfer, particularly within commensal or industrially used microbial populations. A combination of next-generation sequencing (NGS), in silico

resistance gene profiling, and standardized phenotypic antimicrobial susceptibility testing (minimum inhibitory concentration – MIC – determination) was applied to all sample groups.

The results consistently confirmed the presence of clinically relevant ARGs in all three matrices. Notably, the detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes (e.g., bla_{CTX-M}, bla_{TEM}), tetracycline resistance (*tet*), macrolide resistance (*erm*), and vancomycin resistance (*van*) genes was frequent in both industrial and artisanal samples. The high prevalence of ARGs located on plasmids and other mobile genetic elements such as transposons and integrons underlines the potential for cross-reservoir transmission, especially under favorable ecological conditions. Phenotypic MIC testing validated many of the predicted genotypic resistances, and in several probiotic isolates, multidrug resistance (MDR) phenotypes were also observed.

In raw milk-derived food products, the ARG burden increased throughout the processing chain, likely influenced by the dynamics of fermentation and microbial competition. Probiotic products, although widely perceived as safe, were found to occasionally harbor ARGs potentially transferrable to commensal or pathogenic organisms in the gut microbiome. Alarming, the presence of mobile ARGs in vaccine strains and probiotic bacteria challenges current assumptions of biosafety, especially given the lack of mandatory ARG screening in certain regulatory pathways.

In conclusion, our findings highlight the necessity for regulatory agencies to incorporate mandatory ARG profiling in pre-market evaluations of veterinary medicinal products, probiotics, and raw milk food items. These findings also support the development of standardized microbiological safety criteria, particularly for products intended for oral administration or consumption without thermal processing. From a One Health perspective, the ARG reservoirs found in veterinary and food-associated microorganisms should not be evaluated in isolation. Instead, integrated surveillance strategies are required to map transmission pathways and develop actionable risk mitigation measures. The study demonstrates the urgent need for harmonized legislative oversight and a broader interpretation of AMR risk factors beyond clinical antibiotic use.

Keywords: antimicrobial resistance, *Escherichia coli*, probiotics, dairy products, next-generation sequencing (NGS)

Bevezetés

Sir Alexander Fleming már 1946-ban felhívta rá a figyelmet, hogy az antimikrobiális szerek alkalmazása szükség-szerűen maga után vonja a velük szembeni rezisztencia kialakulását. Az első antibiotikumot, a penicillint 1928-ban egy véletlen során fedezte fel. Terápiás célra csak 1942-től használták, de a rezisztencia már néhány éven belül jelentkezett. Fleming felismerte, hogy aligha létezik olyan kemoterápiás szer, amely ellen a baktériumok ne tudnának kialakítani rezisztenciát valamilyen evolúciós vagy ko-szelektív mechanizmus révén (Gálfi et al. 2015).

Az antibiotikumok bevezetése alapjaiban változtatta meg a fertőző betegségek kezelését, ezek egyidejű túlhasználatában azonban hozzájárult az antimikrobiális rezisztencia (AMR) globális terjedéséhez (Micoli et al. 2021). Az AMR mára az egyik legsúlyosabb közegészségügyi kihívássá vált (Barbosa–Levy 2000; Van Boeckel et al. 2015; von Wintersdorff et al. 2016). A legóvatosabb előrejelzések szerint, amennyiben a jelenlegi tendenciák nem változnak, 2050-re az AMR évente akár 10 millió ember halálát is okozhatja, szemben a 2014-ben becsült évi 700 ezerrel (O’Neill 2014). A megoldást az antibiotikum-felhasználás célzott csökkentése jelentheti, amihez számos alternatív megoldás nyújthat segítséget. Az egyik a megelőzés, például a járványvédelmi előírások szigorú betartása (Farkas et al. 2024) vagy a fertőző betegségek kialakulásának megelőzése vakcinák révén (Rappuoli et al. 2017). Szintén idetartoznak az alternatív megoldások: a pro- és prebiotikumok alkalmazása (Kovács et al. 2021) vagy az antimikrobiális peptidok használata (Sebők et al. 2024), valamint a különféle növé-

nyi kivonatok és illóolajok (Kerek et al. 2022, 2023; Olasz et al. 2023), de akár trigliceridek és közepes szénláncú zsírsavak is (Hetényi et al. 2024).

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) által koordinált One Health stratégia a humán, állat- és környezeti egészségügy összehangolt fellépését tűzte ki célul az AMR visszaszorítása érdekében. Ennek részeként több antibiotikum hatóanyag, így a harmadik és negyedik generációs cefalosporinok, a fluorokinolonok és a kolisztin állatgyógyászati használata is szigorú korlátozások alá esett, továbbá több nagy régióban betiltották az antibiotikumok hozamfokozóként történő alkalmazását (EU: 2006-tól teljes tiltás; USA: 2017-től a humán szempontból fontos antibiotikumoknál megszűntek a termelési indikációk; Kína: 2020-tól széles körű tiltás). Globálisan ugyanakkor nem egységes a szabályozás (Millet–Maertens 2011; McEwen–Collignon 2018; Wen et al. 2022; Da Silva et al. 2023). Ezzel párhuzamosan egyre inkább előtérbe kerültek az olyan antibiotikum-alternatívák, mint a probiotikumok, amelyek számos jótékony tulajdonsággal rendelkeznek, és immunmoduláló hatásuk révén kedvezően befolyásolják a bélmikrobiom egyensúlyát (Hill et al. 2014).

A leggyakrabban használt probiotikus törzsek a *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* és *Bifidobacterium* nemzetségekből kerülnek ki (Simon 2005; Gareau et al. 2010). Számos jótékony tulajdonságuk ismert: immunstimuláció, bakteriocinok termelése, versengés a tápanyagért és adhéziós helyekért a patogén mikrobákkal, a toxintermelés gátlása, sőt bizonyos esetekben daganatellenes hatást is megfigyeltek (O’Mahony et al. 2001; Guelpen et al. 2006). Ugyanakkor, ha ezek a probiotikumok antimikrobiális rezisztenciagéneket (ARG)

hordoznak, azok horizontális géntranszfer útján képesek lehetnek a bélmikrobiom más tagjainak is átadni ezeket (Sanders et al. 2010). Az Európai Élelmiszer-biztonsági Hatóság (EFSA) és más hasonló szervezetek szigorú feltételeket szabnak a probiotikumok engedélyezéséhez, különösen élelmiszer-termelő állatoknak szánt felhasználás esetén. Ezek a szabályozások a társállatok esetében azonban gyakran hiányoznak (Osmanagaoglu et al. 2010).

Egy másik, ehhez kapcsolódó terület a nyers tej és az abból készült fermentált tejtermékek, például a kefir, a joghurt vagy a sajtok, amelyek hasonlóképpen potenciális ARG-rezervoároként működhetnek. Liu és munkatársai metagenomikai vizsgálatai szerint a nyers tej mikrobiótája és rezisztómája szignifikánsan gazdagabb, mint a pasztörizált tejé, és már azt is leírták, hogy az ezekben található ARG-k horizontális géntranszferrel a bélmikrobiom tagjaiba is átkerülhetnek (Liu et al. 2020). Tóth és munkatársai kutatásai pedig arra világítanak rá, hogy a fermentációs kultúrákban alkalmazott mikroorganizmusok ARG-tartalma jelentősen befolyásolja a végtermékek biztonságát, így ezek szűrése elengedhetetlen (Tóth et al. 2020b). Az Európai Élelmiszer-biztonsági Hatóság (EFSA) az élelmiszerláncban alkalmazni kívánt mikroorganizmusok biztonságossági értékelésében a *Qualified Presumption of Safety* (QPS) megközelítést alkalmazza, amelyben a baktériumokra vonatkozó általános kvalifikáció a klinikailag releváns antimikrobiális szerekkel szembeni szerzett (*acquired*) rezisztenciagének hiányának igazolása. Ennek megfelelően a fermentációs kultúrák törzsszintű AMR-szűrésében kulcs lépés a mobilis, szerzett ARG-k kizárása (EFSA BIOHAZ Panel 2023).

Az említett kihívások tükrében vizsgálataink célja egy komplex állategészségügyi megközelítés volt, egyrészt vakcinajelölt baktériumtörzsek, továbbá Magyarországon elérhető fontosabb, élelmiszer-termelő állatoknak és társállatoknak szánt probiotikumos készítmények, valamint különféle nyers tejek és abból készült nyers tejtermékek ARG-hordozásának feltérképezése, a One Health szemlélet szellemében. Kutatásunk során mindezt új generációs szekvenálás segítségével, valamint fenotípusos vizsgálatokkal tártuk fel, ami rávilágított az említett termékek potenciális szerepére az antibiotikum-rezisztencia terjesztésében.

Anyag és módszer

A baktériumtörzsek, a készítmények és termékek eredete

Munkánk során összesen nyolc baromfi-eredetű *Escherichia coli* törzset vontunk be a vizsgálatokba, amelyek egy előzetes szűrővizsgálat során maradtak fenn. A vizsgálatba bevont törzsek egy teoretikus szűrővizsgálat *pilot study* részét képezték, és a CEVA-Phylaxia Zrt. bocsátotta rendelkezésünkre. A törzseket sorszámmal láttuk el a vizsgálatban; ezek tulajdonjoga a CEVA vállalatot illeti.

A probiotikumos készítmények szabadon hozzáférhető, kereskedelmi forgalomban kapható állatgyógyászati termékek voltak, amelyeket hazai állatpatikákból, illetve állatgyógyászati termékeket forgalmazó cégektől szereztünk be. A készítményeket szintén sorszámmal láttuk el. A bennük megtalálható mikroorganizmusok között az alábbi fajok szerepeltek: *Enterococcus faecium*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchnerii*, *Lactobacillus acidophilus* és *Bacillus amyloliquefaciens*. A készítmények kereskedelmi nevét tulajdonjoguk védelme érdekében nem tüntettük fel. A törzsek fajazonosságát MALDI-TOF tömegspektrométer segítségével azonosítottuk (Flextra-LAB Kft., Budapest, Magyarország).

A tejtermékminták egy Körösladányban működő tejtermelő kisgazdaságból származtak. A mintavételezés során arra törekedtünk, hogy egy adott terméktétel teljes gyártási láncát lefedjük. Minden mintatípusból öt párhuzamos mintát gyűjtöttünk annak érdekében, hogy az eredmények statisztikailag összehasonlíthatók legyenek. Az első mintavétel a nyers elegytejéből történt; ezt követően a gazdaság saját aludttejjel, illetve CHY-MAX® PLUS oltóenzimmal (17 ml/100 ml arányban) beoltva készített nyers sajtot. A beoltás után készült sajtokból vett öt minta képezte a második vizsgálati pontot. Végezetül a 17 °C-on, 70 százalékos relatív páratartalom mellett, fenyőfa polcokon egy hónapon át érlelt sajtokból is vettünk újabb öt mintát. Valamennyi mintát egyedi sorszámmal ellátott, 50 ml-es steril centrifugacsövekben (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország) gyűjtöttük, majd –80 °C-on, ultramélyhűtőben tároltuk feldolgozásig. A minták minden esetben közvetlen, személyes szállítással kerültek be a laboratóriumba a mintavételt követően.

Fenotípusos érzékenységi vizsgálatok

Az antimikrobiális rezisztencia fenotípusos kifejeződését az izolált baktériumtörzsek minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározásával vizsgáltuk, a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) irányelveit (*Clinical and Laboratory Standards Institute 2017*), valamint az EFSA ISO 10932:2010 szabványt alkalmazva (EFSA Panel on Additives... 2018). A töréspontokat a CLSI és a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST 2023) segítségével határoztuk meg. A vizsgálatban szereplő hatóanyagokat a nemzetközi szakirodalom alapján választottuk ki, a főbb antibiotikum-csoportok minél szélesebb lefedésére törekedve.

A –80 °C-on tárolt baktériumtörzseket a vizsgálatot megelőzően 3 ml kation-adjuvált Müller–Hinton-levest (CAMHB) tartalmazó csövekbe oltottuk, majd 18–24 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Másnap a baktériumszuszpenziókat nefelométer segítségével 0,5 McFarland-

értékre állítottuk be (CheBio Fejlesztő Kft., Budapest, Magyarország). A vizsgálathoz szükséges hatóanyagokból (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) törzsoldatokat készítettünk a CLSI ajánlása szerint (*Clinical and Laboratory Standards Institute 2018*). A vizsgálatokhoz 1024 µg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, az egyes hatóanyagok gyártó által meghatározott tisztaságára korrigálva.

A MIC-vizsgálatokat 96 lyukú mikrotiter lemezekon végeztük (VWR International, Magyarország). Az első oszlop kivételével minden lyukba 90 µl CAMHB-t pipettáltunk. Az első oszlopba a törzsoldatok kétszeres hígítása került, majd kettes alapú hígítási sort készítettünk a 10. oszlopig. A 11. oszlop pozitív kontrollként, a 12. oszlop negatív kontrollként szolgált. Végül a hígítási sor lyukaiba a 11. oszloptól visszafelé 10 µl baktériumszuszpenziót mértünk be.

A lemezeket 18–24 órán át 37 °C-on inkubáltuk, majd a MIC-értékeket a SWIN automata MIC-leolvasó és VIZION v3.4 rendszer segítségével értékeltük (Thermo Fisher Scientific, Budapest, Magyarország). Referencia-törzsként *Escherichia coli* ATCC 25922-t alkalmaztunk.

Új generációs szekvenálás

A baktériumokból és a tejtermékekből származó nukleinsav kivonásához a QIAmp Dneasy PowerFood Microbial kit (100), cat.no. 21000-100 kitet használtunk (Qiagen, Hilden, Németország) a gyártó protokollja szerint. A tejmintákból a protokoll szerint 1,8 ml mintát használtunk fel; a sajtok esetében 0,4 grammot steril szikével aprítottunk, majd kiegészítettük 1 ml steril foszfát-puffer oldattal. Ezt követően a protokoll szerint haladva, azonban attól eltérően a rázatást Qiagen Tissue Lyzer LT készülékben (Qiagen, Hilden, Németország), 50 Hz-en végeztük, tíz percig. Az egyes mintákat 50 µg/ml-ben eluáltuk. Végezetül fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk Qubit® dsDNA BR Assay kittel (Thermo Fisher SSC, Budapest, Magyarország).

A DNS-könyvtárak készítése Illumina® Nextera XT DNA Library Preparation Kit segítségével történt (Illumina, San Diego, USA). A DNS-fragmensek jelöléséhez a Nextera XT Index Kit v2 Set C (Illumina, San Diego, USA) indexeket használtuk. Első lépésben az amplifikált cDNS-mintákat 2,5 µl végtérfigatban 0,2 ng/µl koncentrációra hígítottuk, majd a tagmentáló reakcióhoz összekevertük 5 µl Tagment DNA-pufferrel, valamint 2,5 µl Amplicon Tagment Mix reagenssel. A reakcióelegyet 55 °C-on hat percig inkubáltuk GeneAmp PCR System 9700 készülékben (Applied Biosystems, Waltham, USA), végül lehűtöttük 10 °C-ra. Ezt követően azonnal hozzáadtunk 2,5 µl Neutralize Tagment puffert, és öt percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A DNS-könyvtár készítéséhez 7,5 µl Nextera PCR Master mixet összekevertünk 2,5–2,5 µl i5 és i7 index primerrel, és a tagmentált DNS-mintához adtuk, majd PCR-rel amplifikáltuk. A PCR 95 °C-os 30 mp kezdeti

denaturáció után tizenkét cikusból állt (95 °C – 10 mp, 55 °C – 30 mp, 72 °C – 30 mp), amit 72 °C-on öt percig tartó végső elongációs lépés követett, majd a mintákat lehűtöttük 10 °C-ra. Az így keletkezett indexált DNS-könyvtárat Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel tisztítottuk (Geneaid Biotech, Hszinpej, Tajvan), az oszlopos tisztítási protokollt követve. Majd Qubit® dsDNA HS Assay kittel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk minőség-ellenőrzés céljából.

A DNS-ből létrehozott párosított leolvasási szekvenciák (paired-end readek) vizsgálata Illumina NextSeq 500 szekvenátorral történt (*Metzker 2010*).

Bioinformatikai elemzés

A nyers szekvenciák minőség-ellenőrzését a FastQC v0.11.9 szoftver segítségével végeztük (*Andrews 2012*), majd TrimGalore v0.6.6 (*Krueger 2022*) segítségével elvégeztük a nem kielégítő minőségű szakaszok szűrését. A leolvasási szekvenciákat (ún. readeket) hosszabb szekvenciákká (kontigokká) illesztettük össze a MEGAHIT v1.2.9 szoftver (*Li et al. 2015*) segítségével. Az így kapott kontigokból meghatároztuk az összes lehetséges leolvasási keretet (Open Reading Frame, ORF) Prodigal v2.6.3 segítségével (*Hyatt et al. 2010*), majd ezek bázis-sorrendje szerint származtattuk a fehérjeszekvenciákat. Végül a Resistance Gene Identifier (RGI) v5.1.0 szoftverrel összehasonlítottuk a Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) adatbázisban (*Alcock et al. 2020*) található ARG-szekvenciákkal (letöltve: 2021. 04. 23.). Az eredmények közül azokat hagytuk meg, amelyek legalább strict minősítésűek voltak, vagyis elérték a CARD adatbázis meghatározott küszöbértékét.

Fontos megjegyezni, hogy a CARD adatbázis nem kizárólag szerzett (*acquired*) rezisztenciagéneket, hanem fajra/nemzetségre jellemző, természetes (*intrinsic*) rezisztencia-determinánsokat is tartalmaz. Ennek megfelelően az interpretáció során elkülönítettük a kromoszomális, fajspecifikus (*intrinsic*) találatokat a plazmidhoz vagy mobilis genetikai elemekhez (MGE) társuló, szerzett (*acquired*) génektől; utóbbiak célzott ellenőrzéséhez a ResFinder adatbázis taláataival is összevetést végeztünk (*EFSA BIOHAZ Panel 2023*).

Vizsgáltuk az azonosított rezisztenciagének potenciális mobilitását. Ehhez a MobileElementFinder (v1.0.3) vettük igénybe (*Johansson et al. 2021*), amely a kontigonon prediktálja a mobilis genetikai elemeket (MGE). Kizárólag azokat az ARG-eket tekintettük ebből a szempontból potenciálisan mobilisnak, amelyek az MGE-khez az adatbázisban szereplő baktériumok jellemző leghosszabb kompozit transzpozon távolságán belül voltak megtalálhatók a kontigonon. Mindezeket túl a PlasFlow v1.1 szoftver segítségével (*Krawczyk et al. 2018*) vizsgáltuk a plazmidon való kódolást, a fág genomok jelenlétét a kontigokon pedig a VirSorter v2.2.2 (*Roux et al. 2015*) szoftver segítségével határoztuk meg.

Eredmények

A következő alfejezetekben részletesen ismertetjük a vakcinajelölt törzsek, a probiotikumtörzsek, valamint a nyerstej-eredetű minták vizsgálata során kapott eredményeket. Minden vizsgálati cél esetében összevetésre kerültek a CARD és a ResFinder adatbázisokon alapuló bioinformatikai azonosítás, valamint a fenotípusos (MIC-alapú) validálás eredményei. A leggyakoribb ARG-eket, plazmidhoz kötődő géneket, mobilis genetikai elemeket külön kiemeljük. A CARD-ban jelzett találatok között lehetnek fajspecifikus, természetes (*intrinsic*) rezisztómaelemek is, ezért a bemutatás során külön kezeljük az MGE-khez társuló, szerzett (*acquired*) ARG-eket.

Vakcinajelölt törzsek antimikrobiális rezisztencia profilja

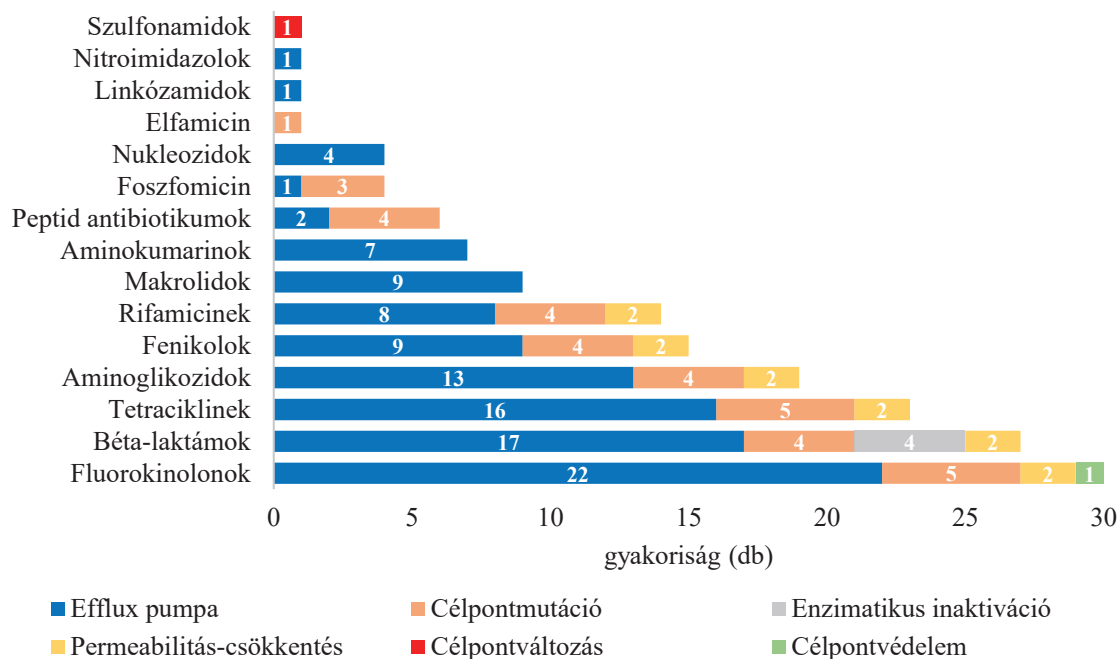
Összesen nyolc *Escherichia coli* törzset vontunk be a vizsgálatba, amelyek potenciális vakcinajelölteként szerepeltek egy pilot studyban. A teljes genom szekvenálása (WGS) és a CARD adatbázis alapján összesen 57 különböző ARG-t azonosítottunk ezekben a törzsekben. Az 1. ábra részletesen bemutatja az azonosított rezisztenciagének gyakoriságát az antibiotikum-hatóanyagcsoportok és a főbb rezisztenciamechanizmusok tükrében. Az 57 azonosított gén közül több a fajra jellemző, kromoszomális (természetes/*intrinsic*) rezisztóma része – különösen az efflux/porin/regulátor típusú determinánsok –, míg a plazmidhoz/MGE-hez társuló gének

szerzett (*acquired*) rezisztenciát jeleznek, és kockázati szempontból eltérő megítélés alá esnek.

Az azonosított rezisztenciagének túlnyomó része efflux pumpát határozott meg; fluorokinolonokkal szemben 22, β -laktámok esetén 17, tetraciklinek esetén pedig 16 ilyen gént azonosítottunk. Enzimatis inaktivációt okozó géneket kizárólag a β -laktám hatóanyagokkal szemben találtunk: ezek *ampC*, *ampC1*, *ampH* és *bla_{TEM-1}* gének voltak. Az 1. és 2. táblázatok részletesen bemutatják valamennyi kimutatott ARG-t.

A fenotípusos vizsgálat során meghatározott MIC-értékek jól tükrözik az egyes rezisztenciagének kifejeződését. Amoxicillin és amoxicillin–klavulánsav esetén a megfigyelt rezisztencia az *ampC*, *ampH* és *bla_{TEM-1}* géneknek tudható be, amelyek közül az *ampH* plazmidon volt megtalálható, az *ampC* és a *bla_{TEM-1}* gén pedig egyúttal mobilis genetikai elemek (MGE) voltak. A tetraciklinekkel szembeni rezisztencia megjelenése a *tetB* és *tetR* efflux pumpát meghatározó géneknek, valamint a fagon található *mdfA* génnek köszönhető. A plazmidon leírt *sul2* gén egyben MGE-n hordozott ARG volt, amely a szulfonamid-rezisztencia megjelenéséért felelős. Fluorokinolonok esetén pedig a rezisztencia az *acrA*, *acrB* és *tolC* efflux pumparendszernek tulajdonítható (1. táblázat).

Az említett plazmidon/fagon/MGE-n azonosított gének – például *ampH*, *sul2*, valamint egyes β -laktám- és tetraciklin-rezisztencia determinánsok – a szerzett (*acquired*) kategóriába sorolhatók, míg az *acrA*–*acrB*–*tolC* rendszerhez hasonló, kromoszomális efflux/porin/regulátor determinánsok az *E. coli* természetes (*intrinsic*) rezisztómájához tartoznak.



1. ábra

Az *Escherichia coli* ($n=8$) vakcinajelölt törzsekben azonosított egyes rezisztenciagének csoportosítása az antibiotikum-hatóanyagcsoportok és a rezisztenciamechanizmusok függvényében. A leggyakoribb rezisztenciamechanizmus az efflux pumpa volt, előfordulási gyakorisága alapján pedig a legtöbb efflux pumpa gén a fluorokinolonok, a béta-laktámok, a tetraciklinek és az aminoglikozidok esetében volt leírható.

1. táblázat | A vizsgált *Escherichia coli* (n=8) vakcinajelölt baktériumtörzsek fenotípusos és genotípusos eredményeinek összehasonlítása. A pirossal kiemelt értékek a töréspontok alapján rezisztens értékek számítanak.

Antibiotikumok	Minimális gátló koncentrációk (µg/ml)								Break-point (µg/ml)	Fenotípusos kifejeződés			
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.		Rezisztenciagén			Rezisztencia típusa
1. amoxicillin	4	2	1	1	2	2	16	64	≥8 ^A	³ ampC	¹ ampH	^{1,3} bla _{TEM-1}	béta-laktamáz enzim
2. amoxicillin-klavulánsav*	8	4	4	4	4	4	8	64	≥8 ^A				
3. cefotaxim	0,06	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	≥0,25 ^A				
4. cefkvinom	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	≥0,125 ^A				
5. imipenem	0,25	0,125	0,5	0,5	0,25	1	0,125	0,5	≥0,5 ^A	<i>soxS</i>	<i>marA</i>	<i>tolC</i>	efflux pumpa
6. gentamicin	32	32	64	16	16	32	64	32	≥2 ^A	² acrD		³ kdpE	efflux pumpa
7. oxitetraciklin	64	1	0,5	0,5	1	2	1	64	≥8 ^A	<i>tetB</i>	<i>tetR</i>	² mdfA	efflux pumpa
8. doxiciklin	32	2	1	1	1	2	2	32	≥4 ^A				
9. szulfametoxazol	256	256	256	256	256	256	256	256	>64 ^A	^{1,3} sul2			célpontcsere
10. trimetoprim	0,5	0,5	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	≥2 ^A				
11. potenciált szulfonamid**	16	2	4	2	2	8	4	1	≥0,5 ^A	^{1,3} sul2			célpontcsere
12. enrofloxacin	0,03	0,03	0,03	0,25	0,25	0,03	1	4	≥2 ^B	<i>acrA</i>	<i>acrB</i>	<i>tolC</i>	efflux pumpa
										<i>gyrA</i>		^{1,3} qnRSI	célpont-módosítás
13. kolisztin	0,25	0,25	0,125	0,25	0,25	0,125	0,25	0,25	≥2 ^A	³ ugd	<i>pmrF</i>	sejtfal-túltermelés	

*amoxicillin és klavulánsav 2:1 arányban, **trimetoprim és szulfametoxazol 1:19 arányban

¹plazmid, ²bakteriofág, ³mobilis genetikai elem (MGE), ^AEUCAST, ^BCLSI

Élelmiszer-termelő állatoknak szánt probiotikumok rezisztencia-génkészlete

Az élelmiszer-termelő állatoknak szánt készítmények közül öt, kereskedelmi forgalmi engedéllyel rendelkezőt választottunk ki, amelyek mindegyike baromfi részére is engedélyezett volt, és takarmányba keverve is adagolhatóak (2. táblázat). Ezt követően mindegyik készítményből 1-1 gramm mintát küldtünk új generációs szekvenálásra. A nyers adatok bioinformatikai feldolgozását követően elemeztük az egyes rezisztenciagének jelentőségét és rezisztenciamechanizmusait.

Az A-készítményben található *Bacillus licheniformis* és *Bacillus subtilis* törzsek esetén penicillinekkal szembeni ARG-t nem azonosítottunk, amit jól tükröz a fenotípusos érzékenység is. Gentamicin esetén a magas MIC-értékek (8 és 16 µg/ml) rezisztenciára utalnak, ami az *aadK* (enzimatis inaktiváció), a *ykkC* és a *ykkD* (efflux pumpa) gének kifejeződésének tulajdonítható. *Bacillus licheniformis* esetén a magas oxitetraciklin MIC-érték (8 µg/ml), *Bacillus subtilis* esetén pedig a magas doxiciklin MIC-érték (64 µg/ml) mögött a *vmLR* gén (célpontmutáció) vagy a *ykkC* és *ykkD* (efflux pumpa) gének kifejeződése állhat. Klindamicin hatóanyagra az előbbi törzs mutat rezisztenciát (32 µg/ml), amit okozhat a *vmLR* vagy *ermD* gén (célpontmutáció), illetve az *lmrB*

2. táblázat | A kiválasztott, baromfival takarmányba keverve etethető probiotikus készítmények tulajdonságai

Termék	Probiotikumtörzs	Törzsszám	CFU/g	Célállat
A	<i>Bacillus licheniformis</i>	DSMZ5749	1,6×10 ⁹	baromfi, sertés, szarvasmarha
	<i>Bacillus subtilis</i>	DSMZ5750	1,6×10 ⁹	
B	<i>Enterococcus faecium</i>	DSM7134	1×10 ⁹	brojler, liba, pulyka, kacska
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM12837		
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSM16243		
C	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	CECT5940	1×10 ¹⁰	baromfi
D	<i>Lactobacillus plantarum</i>	DSM12837	1×10 ⁹	baromfi
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	DSM16243		
	<i>Enterococcus faecium</i>	DSM7134		
E	<i>Enterococcus faecium</i>	CECT4515	1×10 ¹⁰	baromfi, sertés

CFU – Telepformáló egység

gén (efflux pumpa) kifejeződése. A magas tiamulin MIC-értékek (128 µg/ml) mindkét törzs esetén a *vmlR* génnek (célpontmutáció) tulajdoníthatók.

A B-készítményben található ARG-k mind *Enterococcus faecium* eredetűek. A nemzetség cefalosporin hatóanyagokra *ab ovo* rezisztens, amit jól tükröz a ceftriaxon MIC-értéke (32 µg/ml), penicillinekre viszont általában érzékenynek bizonyulnak. Az *Enterococcus* spp. cefalosporinokkal szembeni *ab ovo* rezisztenciája klasszikus, faj-/nemzetség-specifikus, természetes (*intrinsic*) rezisztenciajelenség, és nem szerzett (*acquired*) ARG-átvitelt jelez. Gentamicin esetén az *AAC(6')-Ii* gén (enzimatis inaktiváció) okozhatja a rezisztenciát (32 µg/ml), florfenikol esetén a rezisztencia (8 µg/ml) az *msrC* génnek vagy az *eatAv* génnek (célpontmutáció) tulajdonítható. Tiamulinnal szemben (64 µg/ml) szintén az *msrC* gén vagy az *eatAv* gén (célpontmutáció) okozza a magas

MIC-értéket, amely *Lactobacillus plantarum* esetén is megfigyelhető (64 µg/ml).

A C-készítménynél egyértelműen csak a tiamulin esetén (128 µg/ml) sikerült azonosítani a rezisztenciáért felelős *clbA* gént (célpontmutáció). Gentamicin-rezisztencia figyelhető meg *Lactobacillus plantarum* (64 µg/ml), *Pediococcus acidilactici* (32 µg/ml) és *Enterococcus faecium* (32 µg/ml) esetén is, amit az *AAC(6')-Ii* gén (enzimatis inaktiváció) okozhat. *Pediococcus acidilactici* esetén az oxitettraciklin- (32 µg/ml) és doxiciklin- (16 µg/ml) rezisztenciát az *msrC* vagy az *eatAv* gén (célpontmutáció) okozhatja. Szintén mindhárom törzs rezisztenciát mutat florfenikolra (8 µg/ml) és tiamulinra (>64 µg/ml), ami az *msrC* vagy az *eatAv* gén (célpontmutáció) aktiválódásának következménye lehet.

A D- és E-készítmények esetén az aminoglikozid-rezisztenciát (64 µg/ml) az *AAC(6')-Ii* gén (enzimatis inaktiváció) okozhatja, florfenikol (8 µg/ml) és tiamulin

3. táblázat | Az egyes készítményekből izolált törzsek minimális gátló koncentráció (MIC) értékei. Narancssárgával jelöltük, ahol az antimikrobiális rezisztencia gén (ARG) feltételezhetően magyarázza a fenotípusos rezisztenciát.

Termék	Probiotikus törzs	PEN	AM	AMK	CTR	GEN	OTC	DOX	TIL
A	<i>Bacillus licheniformis</i>	0,125	1	2	16	8	8	0,03	0,5
	<i>Bacillus subtilis</i>	1	0,5	0,5	0,25	16	0,125	64	0,5
B	<i>Enterococcus faecium</i>	8	1	1	32	32	0,25	0,06	1
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	16	4	16	8	8	4	2
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1	16	8	32	4	4	0,5	0,06
C	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,03	1	2	4	32	0,25	0,25	0,5
D	<i>Lactobacillus plantarum</i>	4	2	0,5	32	64	0,5	0,125	4
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1	16	4	32	32	32	16	4
	<i>Enterococcus faecium</i>	8	1	1	32	32	0,25	0,06	1
E	<i>Enterococcus faecium</i>	4	1	1	32	64	0,25	0,06	4

PEN – penicillin, AM – amoxicillin, AMK – amoxicillin–klavulánsav 2:1 arányban, CTR – ceftriaxon, GEN – gentamicin, OTC – oxitettraciklin, DOX – doxiciklin, TIL – tilozin

4. táblázat | (folytatás) Az egyes készítményekből izolált törzsek minimális gátló koncentráció (MIC) értékei. Narancssárgával jelöltük, ahol az antimikrobiális rezisztencia gén (ARG) feltételezhetően magyarázza a fenotípusos rezisztenciát.

Termék	Probiotikus törzs	FLO	KLI	TIA	VAN	GAT	PSA	SUL	TRI
A	<i>Bacillus licheniformis</i>	2	32	128	0,25	0,015	4	64	0,125
	<i>Bacillus subtilis</i>	2	2	128	0,25	0,015	2	64	0,5
B	<i>Enterococcus faecium</i>	8	4	64	2	0,5	256	256	256
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	4	0,03	128	64	2	256	256	64
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	4	0,03	1	64	0,5	128	64	256
C	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2	0,5	128	1	0,015	4	128	0,5
D	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8	4	128	64	1	256	256	64
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	8	0,03	128	64	8	256	256	256
	<i>Enterococcus faecium</i>	8	4	128	1	2	256	256	256
E	<i>Enterococcus faecium</i>	8	4	64	2	1	256	256	256

FLO – florfenikol, KLI – klindamicin, TIA – tiamulin, VAN – vankomicin, GAT – gatifloxacin, PSA – potenciált szulfonamid (trimetoprim és szulfametoxazol 1:19 arányban), SUL – szulfametoxazol, TRI – trimetoprim

esetén (64 µg/ml) az *msrC* vagy az *catAv* gén (célpont-mutáció) aktiválódásának következménye lehet a rezisztencia. Az egyéb hatóanyagok esetén tapasztalt magas MIC-értékek *ab ovo* rezisztencia következményei (3–4. táblázat).

A vizsgált készítmények szekvenálását követően az egyes mintákban azonosított ARG-eket a 3. és 4. táblázat tartalmazza. Az egyik legfontosabb rezisztenciamechanizmus az enzimatis inaktiváció. Ilyen rezisztenciát meghatározó gén az *aadk*, amely az A-készítményben *Bacillus* spp. eredetű, azonosított aminoglikozid-rezisztenciát okozó gén volt. Az *AAC(6')-II* gén megtalálható volt a B-, D- és E-készítményekben; ez szintén aminoglikozid-rezisztencia kialakításáért felelős gén, amely *Enterococcus* spp. eredetű volt. Az A-készítmény esetén ezenkívül *mphk* gén került azonosításra, amely a makrolid antibiotikumok rezisztenciáját okozhatja. A célpont-mutációk közül ki kell emelni az A-készítményben azonosított *mprF* gént, amely peptid antibiotikum-rezisztenciához vezethet. Meg kell említeni a C-készítményben azonosított, diaminopirimidin-rezisztenciát kódoló *dfrA43* gént, amelynek lefedettsége 82,56 százalékos, azonossága pedig csak 35,75 százalék, azonban dsDNS fagon kódolt génként azonosított *Bacillus* spp. eredetű ARG.

Efflux pumpát kódoló gének közül a legtöbb az A-készítményben volt megtalálható. Ezek közül ki kell emelni a fluorokinolon-rezisztencia szempontjából lényeges *blt* gént és *bmr* gént, valamint a peptid antibiotikum-

rezisztencia szempontjából jelentős *bcrA* és *bcrB* géneket. A B- és D-készítményekben is megtalálható volt a makrolid- és fluorokinolon-rezisztenciát eredményező efflux pumpát kódoló *efmA* gén. Meg kell említeni az A-készítményben megtalálható aminoglikozid, tetraciklin és fenikol multirezisztenciáért felelős *ykkC* és *ykkD* gének jelenlétét is. Összességében elmondhatjuk, hogy MGE nem került azonosításra, és plazmidon kódolt ARG-t sem találtunk. Ez alapján az itt azonosított rezisztencia-determinánsok döntően természetes (*intrinsic*), kromoszomális hátterűek voltak.

Társállatoknak szánt probiotikumok rezisztencia-génkészlete

Összesen tizenhárom, társállatoknak szánt készítmény vizsgálatát végeztük el. Az N-készítmény kivételével (DSM7134) az összes többi készítményben ugyanaz az *Enterococcus faecium* törzs volt (NCIMB10415). Valamennyi törzs esetén nagyon hasonló MIC-értékeket figyeltünk meg (5. táblázat), hiszen mindegyik törzs érzékenynek bizonyult penicillinre, amoxicillinre, amoxicillin–klavulánsavra, oxitetraciklinre, doxiciklinre, klindamicinre, tilozinra és vankomicinre. Gentamicin (64 µg/ml) és potenciált szulfonamid esetén (256 µg/ml) az összes törzs rezisztensnek bizonyult. A negyedik generációs fluorokinolonok közé tartozó gatifloxacin esetén hat törzs volt érzékeny, három pedig rezisztens (2 µg/ml).

5. táblázat | Az egyes készítményekből izolált probiotikumtörzsek minimális gátló koncentráció (MIC) értékei köz- és állategészségügyi jelentőségű antibiotikum hatóanyagokra nézve. Az ismert törésponttal rendelkező baktériumok és hatóanyagok esetén zöld háttérrel emeltük ki az érzékenynek számító értékeket, és piros háttérrel jelöltük a rezisztensnek számító értékeket.

Készítmény	Állatfaj	Faj	PEN	AMX	AMK	GEN	OTC	DOX	KLI	PSA	GAT	FLO	TIL	VAN
			Minimális gátló koncentrációk (µg/ml)											
F	kutya, macska	<i>Enterococcus faecium</i>	4	1	1	64	0,25	0,06	4	256	0,5	8	2	1
G	kutya, macska		8	1	1	64	0,25	0,06	4	256	0,5	8	2	1
H	macska		4	1	2	32	0,25	0,06	4	256	1	8	1	1
I	kutya		8	1	2	32	0,25	0,06	4	256	0,5	8	1	2
J	kutya, macska		4	1	1	64	0,25	0,06	4	256	0,5	8	2	2
K	kutya, macska		8	1	1	64	0,25	0,06	4	256	0,5	8	2	1
L	kutya		8	1	1	64	0,25	0,06	8	256	2	8	1	1
M	kutya, macska		8	1	1	64	0,25	0,06	4	256	2	8	2	2
N	kutya		8	1	1	32	0,25	0,06	8	256	2	8	1	1
O	kutya		<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	16	0,25	8	4	2	0,06	256	2	2	2
P	macska	<i>Pediococcus pentasaccus</i>	0,5	16	4	64	32	16	0,06	256	8	8	2	>32
Q	kutya	<i>Pediococcus pentasaccus</i>	1	16	4	32	32	32	0,06	256	8	8	4	>32
R	kutya, macska	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0,25	8	2	64	32	8	0,06	256	4	8	2	>32

PEN – penicillin, AMX – amoxicillin, AMK – amoxicillin–klavulánsav 2:1 arányban, GEN – gentamicin, OTC – oxitetraciklin, DOX – doxiciklin, KLI – klindamicin, PSA – potenciált szulfonamid (trimetoprim és szulfametoxazol 1:19 arányban), GAT – gatifloxacin, FLO – florfenikol, TIL – tilozin, VAN – vankomicin

A *Lactobacillus* törzsek közül egy *Lactobacillus plantarum* törzset sikerült szintenyészetben izolálni, amely penicillinre, amoxicillin–klavulánsavra, gentamicinre, oxitetraciklinre, doxiciklinre, klindamicinre, tilozinra és vankomicinre volt érzékeny. Rezisztens volt azonban amoxicillinre (16 µg/ml), potenciált szulfonamidra (256 µg/ml) és gatifloxacinra (2 µg/ml). A *Pediococcus* fajok közül két *Pediococcus pentasaccus* és egy *Pediococcus acidilactici* törzset sikerült izolálni, amelyek kizárólag a klindamicin hatóanyagra voltak érzékenyek (0,03 µg/ml MIC); az általunk vizsgált összes többi hatóanyagra rezisztenciát mutattak.

A 6. táblázat az új generációs szekvenálás során kapott eredményeket foglalja össze: itt láthatók a készítményekben izolált rezisztenciagének, azok taxoneredete, az egyes gének ARG-családjá, továbbá, hogy milyen rezisztenciamechanizmust határoznak meg az adott gének, illetve milyen antibiotikum-csoportokkal szemben alakítanak ki rezisztenciát.

Nyers tej és tejtermékek rezisztencia-génkészlete

A nyers tej és az abból készült nyers tejtermékek esetén 112-féle ARG-t azonosítottunk (5–6. táblázat). Közegészségügyi szempontból az egyik legfontosabb rezisztenciamechanizmus az enzimatis úton történő inaktivációért felelős β-laktamáz-termelés. Összesen 9-féle (ACT, CMY, EC, ORN, OXA, OXY, PLA, RAHN, TER) géncsaládba tartozó 19 gént azonosítottunk, amelyek különböző mértékű β-laktamáz-termelésért felelősek. Ezek közül egy géncsalád felelős a világon széles körben elterjedt, kiterjedt spektrumú β-laktamáz-termelésért (OXA). Ez utóbbi géncsaládból egy gént (*bla_{OXA-662}*) a nyerstej-mintából, egy gént (*bla_{OXA-309}*) pedig a friss sajtminatából sikerült kimutatnunk. A CARD több fajspecifikus, kromoszomális (természetes/*intrin-sic*) β-laktamázt is ARG-ként tart nyilván, ugyanakkor egyes géncsaládoknál az MGE-khez kapcsoltság (szerzett/*acquired* jelleg) is előfordulhat; ezért a kockázátértékelésben indokolt a mobilis (*acquired*) β-laktamázok elkülönített kezelése.

A fluorokinolonokkal szemben specifikus efflux pumpát meghatározó *abaQ* gént kizárólag nyerstej-mintákból mutattuk ki, ellenben az *emrA*, *emrB*, *emrR*, *mdtH*, *patA* és *patB* gének szinte az összes mintából kimutathatók voltak a termékpálya során. A csökkent permeabilitásért felelős és egyben efflux pumpát meghatározó *marA* gén valamennyi mintában, a *ramA* gén viszont csak a nyerstej-mintákban és az érett sajtminatákban volt megtalálható. Az igen széles körben elterjedt, multirezisztenciáért felelős, efflux pumparendszert és célpontmódosítást meghatározó *acR-tolC* és *soxR* gének az összes mintában kimutathatók voltak, hasonlóan a permeabilitást is csökkentő *soxS* génhez.

Az aminoglikozid hatóanyagok enzimatis inaktivációjáért felelős AAC(6') géncsalád tagjai közül az AAC(6')-I_f gént kimutattuk a nyerstej-mintában és az

érett sajtban is. Az AAC(6')I_i és AAC(6')-I_{ib} gének csak az érett sajtban voltak megfigyelhetők, ami utalhat a termék kontaminációjára. Az *aadA27* és APH(3'')-I_b gén, valamint az APH(6)-I_d gén főként a nyers tejből volt kimutatható, egy esetben azonosítottuk friss sajtból. Azonban az érés során eltűntek a mintákból, az ANT(3'')-I_{Ic} gén pedig csak a nyers tejben volt megfigyelhető.

Különösen aggasztó a peptid antibiotikumokkal szemben célpontmódosításért felelős gén nagyszámú jelenléte az összes mintában (*arnT*, *bacA*, *eptB*, ICR-Mo, *pmrF*). Az *eptA* és *ugd* gént viszont csak az érett sajtminatákból tudtuk kimutatni. A csökkent permeabilitásért felelős gének közül kizárólag a nyerstej-mintákban azonosítottuk az *ompA* gén jelenlétét. Kizárólag az érett sajtminatákból volt kimutatható az *yojI*, efflux pumpát meghatározó gén. Az összes többi, peptid hatóanyaggal szembeni rezisztenciát kialakító gén multidrug efflux pumpát meghatározó gén volt.

Az azonosított gének közül összesen 57 gén helyezkedett el plazmidon, és 7 gén volt fágon. MGE-n hordozott géneként pedig 15 gént azonosítottunk. A különböző mintákban voltak olyan gének, amelyek az egyik esetben plazmidon, a másik esetben fágon voltak megtalálhatók. A plazmidon megfigyelt MGE gének közül ki kell emelni a kizárólag az érett sajtból kimutatott *sulI* gént, amely gén a szulfonamid hatóanyagokkal szemben célpontmódosítás révén alakít ki rezisztenciát. A *tetM* gén szintén csak az érett sajtminatákban, plazmidon volt megtalálható; ez egyben MGE gén, amely a tetraciklin hatóanyagokkal szemben alakít ki rezisztenciát célpontvédelem útján. Szintén ki kell emelni az aminoglikozid-rezisztencia kialakításáért felelős, de csak a nyerstej-mintákból kimutatott, enzimatis úton megvalósuló rezisztenciát meghatározó APH(3'')-I_b és APH(6)-I_d géneket. A fágon található egyetlen, MGE-n hordozott ARG gén a *soxS* gén volt. Szintén jelentős az érett sajtban kimutatott, fertőtlenítőszerrel szembeni rezisztenciát kialakítani képes, efflux pumpát meghatározó, plazmidon található *qacEdelta1* gén jelenléte, amely egyben MGE volt.

Következtetések

A DNS-alapú baktériumvakcinák alkalmazása esetén az Egészségügyi Világszervezet (WHO) (*Standardization 2016*), az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) (*Food and Drug Administration 2007*), valamint az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) (*European Medicines Agency 2023*) egyaránt potenciális veszélyként jelöli meg az ARG beépülését a recipiens DNS-ébe. Ennek vizsgálatát azonban nem teszik kötelezővé a vakcinafejlesztés során.

Összességében elmondhatjuk, hogy kiterjedt spektrumú béta-laktamázt (ESBL) termelő törzset nem találtunk, és a kolisztinnel szembeni rezisztencia szempontjából fontos *mcrI* gén sem fordult elő. A *pmrE* gén

kizárólag kromoszomálisan volt kódolva. A *pmrE* (*ugd*) gén mobilitása miatt problémát okozhat, ezek azonban nem fejeződtek ki. Ki kell emelni a *marA* gént, amely fontos regulátor gén a multirezisztenciáért felelős *acrAB* efflux pumparendszer működésében, valamint az *ompF* gén regulációja révén a porinszintézis downregulációjáért is felel. A makrolid rezisztenciát kódoló gének csak abban az esetben lennének jelentősek, ha mobilisak lennének – foszomicin esetén ugyanez a helyzet. A *gyrA* génmutáció meglehetősen nem előnyös, annak ellenére, hogy nem mobilis. A *qnrSI* gén plazmidon való kódolása és mobilitása miatt biztosan kizárható azon törzsek felhasználása, amelyekben ez detektálható. A *sul2* gén mobilitása szintén kizáró tényező. Az *ampC* gén is jelentős gyakorlati problémákat okozhat a laktamáztermelés miatt. A kockázatelemzésben alapvető különbség van a kromoszomális, fajspecifikus természetes (*intrinsic*) rezisztómaelemek és az MGE-hez társuló, szerzett (*acquired*) ARG-k között; utóbbiak a horizontális géntranszfer révén közvetlenebb közegészségügyi kockázatot jelentenek. A jelen vizsgálatban kizáró tényezőként megjelölt *qnrSI* és *sul2* gének tipikusan szerzett (*acquired*) és mobilis determinánsok, míg a *marA*–*acrAB*–*ompF* szabályozási tengely elsősorban a természetes (*intrinsic*) alkalmazkodási háttér része.

A haszonállatoknak szánt probiotikum-készítmények ARG génkészletét vizsgálva az efflux pumpát kódoló gének közül a legtöbbet az A-készítményben azonosítottuk. Kiemelendő a fluorokinolon-rezisztenciát okozó *blt* gén és *bmr* gén; az előbbi Ahmed és munkatársai *Bacillus subtilis*-ben azonosították (Ahmed et al. 1995), az utóbbit pedig Neyfakh és munkatársai, valamint Klyachko és munkatársai írták le (Neyfakh et al. 1991; Klyachko et al. 1997). Peptid antibiotikum-rezisztencia szempontjából jelentős *bcrA* és *bcrB* géneket találtunk; Podlesek és munkatársai ezeket *Bacillus licheniformis*-ben írták le (Podlesek et al. 1995). Meg kell említeni az aminoglikozid, tetraciklin és fenikol multirezisztenciáért felelős *ykkC* és *ykkD* gének jelenlétét is, amelyeket *Bacillus subtilis* esetén Jack és munkatársai írták le (Jack et al. 2000). Az egyik legfontosabb rezisztenciamechanizmus az enzimikus inaktiváció. Ilyen rezisztenciáért felelős *aadk* gént azonosítottunk, amely aminoglikozid-rezisztenciát okoz. Agersø és munkatársai *Bacillus licheniformis* esetén írták le a gént (Agersø et al. 2019). Efflux pumpák közül *mphk* gén került azonosításra, amely makrolidok rezisztenciáját okozhatja; Pawlowski és munkatársai *Bacillus subtilis* esetén mutatták ki (Pawlowski et al. 2018). Szintén azonosításra került a *bcrC* gén, amely célpontmutációként peptid antibiotikum-rezisztenciát okozhat (Podlesek et al. 1995). A célpontmutációk közül ki kell emelni az *mprF* gént, amely peptid antibiotikum-rezisztenciához vezethet; *Bacillus subtilis* eredetű géneként került azonosításra (Ernst et al. 2009; Hachmann et al. 2009, 2011). A B- és D-készítményekben makrolid- és fluorokinolon-rezisztenciát eredményező efflux pumpát kódoló *efmA* gént írtunk le, amelyet Urshev és munkatársai

társai *Enterococcus faecium* esetén MFS-típusú pumpaként tárgyaltak (Urshev–Yungareva 2021). Az *AAC(6′)-Ii* gén megtalálható volt a B-, D- és E-készítményekben is: ez szintén aminoglikozid-rezisztencia kialakításáért felelős gén, amelyet *Enterococcus faecium* esetén azonosítottak (Urshev–Yungareva 2021).

A társállatoknak szánt probiotikum-készítményekben összesen 19-féle ARG-t azonosítottunk, amelyek közül 11 plazmidon volt található. Fágon nem azonosítottunk gént. Xia és munkatársai *Enterococcus faecium* törzsben 18 ARG-t azonosítottak, amelyek közül egyik sem volt MGE (Xia et al. 2023) – ezzel ellentétben mi két gén esetén írtuk le a mobilitás valószínűségét. Az egyik ilyen gén az *APH(3′)-Ia* volt, amely F-készítményben volt megtalálható. Ennek a rezisztenciagénnek az aktiválódása enzimikus úton (foszfo-transzferáz) képes inaktiválni az aminoglikozid antibiotikumokat. A másik gén a *tetS* gén volt, amely az M-készítményben volt megtalálható. Ez a gén célpontvédelem útján (mozaikos riboszóma) a tetraciklin hatóanyagokkal szemben – a hatóanyag bekötődésének megakadályozása révén – képes kialakítani az érzékenység csökkenését.

A MIC-értékek meghatározása során rezisztensnek számító értékek és az egyes készítmények *Enterococcus faecium* törzseiben azonosított ARG-k között több esetben összefüggés mutatható ki. Az *AAC(6′)-Ii* gén expressziója enzimikus úton (acetiltranszferáz) képes rezisztenciát kialakítani az aminoglikozid hatóanyagokkal szemben. Ez a gén az összes vizsgált készítményben megtalálható volt, és fenotípusosan az összes törzs esetén megfigyelhető rezisztencia (gentamicin 64 µg/ml) háttérben álló egyik gén lehetett. Ezzel szemben Takeuchi és munkatársai kutatásai során az általuk izolált *Enterococcus faecium* törzsek 22 százalékában ez az érték >500 µg/ml volt (Takeuchi et al. 2005).

Ki kell emelni, hogy a *CRP* gén általában kromoszomálisan található, azonban egy esetben (F-készítmény) ez a gén átugrott plazmidra. Az *eatAv* gén kifejeződése célpontvédelem (ABC-F típus) révén alakít ki rezisztenciát linkozamidokkal és pleuromutilinokkal szemben; ez a gén az összes készítmény *Enterococcus faecium* törzseiben megtalálható volt. Az *efmA* egy MFS-típusú efflux pumpát határoz meg makrolid és fluorokinolon hatóanyagok esetén, ami a gatifloxacin-rezisztencia (2 µg/ml) mögött állhat. Az *rsmA* gén egy RND-típusú multidrug efflux pumpát határoz meg, amely fenikolokkal, fluorokinolonokkal és diaminopirimidinekkel szemben alakíthat ki rezisztenciát. Ez a gén szintén az összes *Enterococcus faecium* törzsben megtalálható volt, és magyarázhatja az összes esetben tapasztalt, potenciált szulfonamidokkal szembeni rezisztenciát (256 µg/ml), továbbá a gatifloxacinnal szemben megfigyelt (2 µg/ml MIC), valamint a florfenikollal szemben megfigyelt (8 µg/ml MIC) rezisztencia mögött állhat. Xu és munkatársai egy szennyvízből származó törzs antimikrobiális érzékenységi vizsgálata során potenciált szulfonamidnál (szulfometoxazol-trimetoprim) extrém magas (9000

µg/ml) értéket találtak (Xu et al. 2007). Wenzler és munkatársai klinikai izolátumokkal dolgoztak, ahol a medián MIC-érték gatifloxacinra (2 µg/ml) megegyezett az eredményünkkel (Wenzler et al. 2004).

Összességében tehát elmondhatjuk, hogy a MIC-értékek tükrében összefüggés figyelhető meg több azonosított ARG és ezek fenotípusos kifejeződése között. Eredményeink alapján az összes fenotípusos rezisztencia mögött sikeresen azonosítottunk ARG-t. Különösen aggasztó a plazmidon található gének igen magas aránya (57,9 százalék), továbbá az, hogy két esetben ezek MGE-k voltak. Az általunk leírt eredmények alapján tehát – az élelmiszer-termelő állatokhoz hasonlóan – a társállatoknak szánt probiotikus készítmények forgalomba hozatala előtt is szükségszerű elvégezni ezeket a szűrővizsgálatokat. Az új generációs szekvenálás során egy készítmény esetén, amely *Lactobacillus plantarum* (NCIMB41638), *Lactobacillus fermentum* (NCIMB41636) és *Lactobacillus rhamnosus* (NCIMB41640) törzseket tartalmaz, nem találtunk ARG-t. Az ebben az esetben tapasztalt fenotípusos rezisztenciát így nem tudjuk genotípusosan génekkel alá támasztani.

Az F-készítmény *Enterococcus faecium* (NCIMB10415) törzset tartalmazott. Ebben tizenöt ARG-t azonosítottunk, amelyek közül hét volt plazmidon található, és egy (*tetS*) gén volt MGE-n hordozott ARG. Összesen négy gén volt ténylegesen *Enterococcus* fajból eredeztethető; a többi gén *Lactococcus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Hafnia*, *Acinetobacter* és *Streptococcus* fajokból került át a törzsbe. A G- és L-készítményekben szintén *Enterococcus faecium* volt (NCIMB10415), amelyből három ARG-t azonosítottunk; ezek mind kromoszomális gének és *Enterococcus* spp. eredetűek voltak. A H-, I- és N-készítmények *Lactobacillus plantarum* (DSM12837), *Pediococcus acidilactici* (DSM16243) és *Enterococcus faecium* (NCIMB10415) fajokot tartalmaztak. Mindhárom készítmény esetén ugyanannak a négy ARG-nek a jelenlétét azonosítottuk; ezek a gének kromoszomálisan voltak megtalálhatóak, és mind *Enterococcus* spp. eredetű volt.

A J-készítmény *Pediococcus pentasaccus* (DSM1283U), *Lactobacillus brevis* (DSM12835), *Lactobacillus bucherii* (DSM12856), *Lactobacillus plantarum* (DSM12836), *Lactobacillus rhamnosus* (NCIMB30121), *Lactobacillus acidophilus* (CECTU529) és *Enterococcus faecium* (NCIMB10415) törzseket tartalmazott, amelyek közül a *Pediococcus* és *Lactobacillus* fajok inaktívált formában voltak a készítményben. Négyféle rezisztenciagénjük megegyezik az I-készítményben találtakal, azonban ezek közül az *AAC(6)-Ii* gén plazmidon volt található, míg a többi gén kromoszomális. Az összes gén *Enterococcus* spp. eredetű volt. A K-készítmény összetétele megegyezik az előzővel, itt azonban csak két kromoszomálisan található ARG-t tudtunk azonosítani, amelyek *Enterococcus* spp. eredetűek voltak.

Az M-készítményben *Enterococcus faecium* (NCIMB10415) törzs van, ez tartalmazta a legtöbb azo-

nosított ARG-t: összesen tizennégy darabot. Ezek közül nyolc plazmidon volt megtalálható, és közülük az *APH(3')-Ia* gén egyben MGE-n hordozott ARG volt. A gének közül öt darab volt *Enterococcus* spp. eredetű; a többi horizontális géntranszferrel más fajokból szerezhetette a törzs, nevezetesen *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillales*, *Enterobacteriaceae*, *Enterobacterales* és *Streptococcus* fajokból. Tetraciklin hatóanyagokkal szembeni rezisztencia kialakításáért felelős gén a *tetC*, amely főként Gram-negatív baktériumokban efflux pumpa kifejeződéséért felelős, és általában plazmidon található. A *tetM* és a *tetS* gének riboszómavédelmi fehérjékért felelős gének; mobilis genetikai elemeken találhatóak, Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumokban egyaránt. A rezisztenciát célpontvédelem útján alakítják ki (Roberts 2005). Pan és munkatársaihoz hasonlóan (Pan et al. 2011) mi is plazmidon azonosítottuk a *tetM* gént, vizsgálatunk során azonban *Enterococcus*-eredetűként azonosítottuk. Nawaz és munkatársai *Lactobacillus plantarum* vizsgálata során azonosították ezeket a géneket, amelyek génátvitelét *Enterococcus*-izolátumba kísérletes körülmények között sikeresen bizonyították (Nawaz et al. 2011).

A nyers tej és az abból készült tejtermékek ARG-vizsgálata során összesen 112-féle ARG-t azonosítottunk. Nyers tej esetén 31-féle ARG-t mutattunk ki. Tóth és munkatársai kutatásuk során ugyancsak nyers tejből 48-féle ARG-t azonosítottak (Tóth et al. 2020a); míg Andriyanov és munkatársai hozzánk hasonlóan 29-féle ARG-t (Andriyanov et al. 2022). Vizsgálataink során összesen 19 olyan ARG-t mutattunk ki a mintákból, amelyek β-laktamáz-termelésért felelősek. Ezek között két olyan gént azonosítottunk ($bla_{OXA-662}$, $bla_{OXA-309}$), amelyek OXA-típusú (Ambler D) β-laktamázok. Az OXA-enzimek egy részénél a spektrum kiterjedése az ESBL irányába ismert jelenség (Figueiredo et al. 2012). Tóth és munkatársai plazmidon található és egyben MGE PC1-béta-laktamáz (*blaZ*) gént azonosítottak (Tóth et al. 2020a), amelyet Aragão és munkatársai nyers kecskesajtból mutattak ki (Aragão et al. 2019). Ezt a géncsaládot mi nem tudtuk kimutatni, azonban összesen öt β-laktamáz-termelésért felelős géncsaládot azonosítottunk (*ACT*, *TER*, *OXA*, *ORN*, *CMY*), amelyekből plazmidon megtalálható géneket mutattunk ki. Különösen aggasztó az ESBL-termelésért felelős $bla_{OXA-662}$ gén plazmidon való hordozása. Andriyanov és munkatársai négy eltérő β-laktamáz (*B-18*, *CME-12*, *GOB-41*, *CSP-1*) termeléséért felelős gént azonosítottak (Andriyanov et al. 2022). Elafify és munkatársai ESBL-termelésért felelős $bla_{CTX-M-15}$, $bla_{CTX-M-14}$ és bla_{SHV-14} géneket is azonosítottak (Elafify et al. 2020).

Oniciuc és munkatársai glikopeptid-rezisztenciáért felelős *vanRM*, *vanUG*, *vanXYC*, *vanYB* és *vanTC* géneket azonosítottak nyers tejből és tejtermékekből (Alexa Oniciuc et al. 2020). Vizsgálataink során ezek a gének nem érték el az azonossági küszöbértéket a mintáinkban. A tetraciklin hatóanyagokkal szembeni célpontvédelemért felelős *tetM* gént az összes mintából kimutattuk.

Ning és munkatársai nyers tejből szintén kimutatták a jelenlétét (Ning et al. 2023). Ez a gén az érett sajtmin-tákban plazmidon volt megtalálható, ezenkívül MGE is volt egyben. Az efflux pumpát meghatározó *tetB* gént azonban csak a nyers tejben tudtuk kimutatni. Oniciuc és munkatársai emellett *tetA* és *tetO* géneket is azonosítottak (Alexa Oniciuc et al. 2020), Rodrigues és munkatársai pedig nyers tejből és sajtból azonosítottak efflux pumpát meghatározó *tetK* gént (Rodrigues et al. 2017). Tóth és munkatársai plazmidon megtalálható *tet38* gént mutattak ki nyerstej-mintákból, amely gén tetraciklinek sejtéből való kipumpálásáért felelős (Tóth et al. 2020a). Egy másik vizsgálatukban ugyanezt a gént plazmidon írták le (Tóth et al. 2020b). A mi vizsgálatunkban *tet33* gént azonosítottunk több mintában, amely szintén plazmidon volt megtalálható. Az aminoglikozidok enzimikus inaktivációjáért felelős gének közül a nyers tejben és az érett sajtban az *AAC(6')-If* gént mutattuk ki. Viszont az *AAC(6')Ii* és *AAC(6')-Iib* géneket csak az érett sajtban tudtuk kimutatni, az *aadA27*, *APH(3'')-Ib* és *APH(6)-Id* gének pedig elsősorban a nyers tejben voltak megtalálhatók. Az *ANT(3'')-Iic* gén kizárólag a nyers tejben volt megfigyelhető. Ashraf és munkatársai nyerstej- és tejtermékmintákban kimutatták az *AAC(6')-APH(2'')* génkomplex jelenlétét (Ashraf et al. 2023), amelyet Liu és munkatársai is detektáltak különböző állati eredetű nyers tejfélékben (Liu et al. 2022). Endres és munkatársai az *AAC(6')* gén jelenlétét mutatták ki nyers juhtejben és abból készült sajtmin-tákban (Endres et al. 2023). Parry-Hanson Kunadu és munkatársai nyers sajt-ból *AAC(6')-Iy* gént mutattak ki (Parry-Hanson Kunadu et al. 2018).

A fluorokinolon hatóanyagokkal szembeni rezisztenciáért felelős gének közül valamennyi mintában azonosítottuk az efflux pumpákat meghatározó *emrA*, *emrB*, *emrR*, *mdtH*, *patA* és *patB* géneket, valamint a csökkent permeabilitásért felelős és egyben efflux pumpát meghatározó *marA* gént; viszont a *ramA* gén csak nyerstej-mintákban és érett sajtmin-tákban volt megtalálható. A széles körben elterjedt, multidrug-rezisztenciáért felelős, efflux pumparendszert és célpontmódosítást meghatározó *acR-tolC* és *soxR* gének az összes mintában kimutathatók voltak, hasonlóan a permeabilitást is csökkentő *soxS* génhez. A fluorokinolonokkal és tetraciklinekkel efflux pumpa révén rezisztencia kialakítását meghatározó *adeF* gént valamennyi mintából kimutattuk. Andriyanov és munkatársai nyerstej-mintákban szintén azonosították ezt a gént (Andriyanov et al. 2022). A fluorokinolonokkal szemben efflux pumpa által rezisztenciát meghatározó *abaQ* gént csak a nyerstej-mintákban azonosítottuk, hasonló módon, mint Tóth és munkatársai (Tóth et al. 2020b).

Konklúzió

A vizsgálatunk során alkalmazott állategészségügyi megközelítések mindegyike során kimutathatók voltak ARG-k, közülük több MGE-n hordozott volt. Ez nem-

csak az állatok terápiás menedzsmentjét, hanem az élelmiszerláncon keresztül potenciálisan az emberi egészséget is veszélyezteti.

A One Health megközelítés alapján javasolható a genetikai ARG-szűrés bevezetése az állatgyógyászati készítmények forgalomba hozatali engedélyezési eljárása során. Ezt támasztja alá a jelen vizsgálatban is kimutatott, plazmid-mediált gének jelenléte, amelyek közvetlen kockázatot jelenthetnek az antibiotikum-rezisztencia horizontális terjedésére. A nyers tejtermékek és egyéb nem hőkezelt, állati eredetű élelmiszerek rezisztómamonitorozásának rendszeresítése szintén időszerű. Az érlelt sajtokból kimutatott, közegészségügyi jelentőséggel bíró gének jelenléte is ezt támasztja alá. A horizontális génátvitelre hajlamosító elemek feltérképezése a termékfejlesztés előtti szakaszban különösen fontos olyan törzsek esetében, amelyek közvetlen humán expozíciónak lehetnek kitéve.

A kutatás összesített eredményei hangsúlyozzák, hogy az antimikrobiális rezisztenciagének megjelenése nemcsak a patogén baktériumok szintjén jelent problémát, hanem a technológiai, terápiás célra szánt mikroorganizmusokban is. Az ilyen típusú vizsgálatok széles körű elterjesztése, valamint ezek integrálása a szabályozási környezetbe elengedhetetlen a rezisztencia globális szintű visszaszorítása érdekében. A rezisztenciagének horizontális géntranszfer útján történő átugrása a bélmikrobiom alkotóiba komoly közegészségügyi kockázatot hordozhat. A Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2019-es jelentése szerint az Amerikai Egyesült Államokban évente 2,8 millió fertőzés köthető bizonyítottan antibiotikum-rezisztens fertőzésekhez, amelyek közül 35 000 eset végzetes kimenetelű (Centers for Disease Control and Prevention 2019).

Köszönetnyilvánítás

A tanulmány az Innovációs és Technológiai Minisztérium Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült. Az RRF-2.3.1-21-2022-00001 számú projekt a Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszköz és a Nemzeti Helyreállítási Alap által nyújtott támogatással, az RRF-2.3.1-21 pályázati program finanszírozásában valósult meg.



Irodalomjegyzék

- Agersø, Y., Bjerre, K., Brockmann, E., Johansen, E., Nielsen, B., Siezen, R., Stuer-Lauridsen, B., Wels, M. & Zeidan, A. A. (2019) Putative antibiotic resistance genes present in extant *Bacillus licheniformis* and *Bacillus paralicheniformis* strains are probably intrinsic and part of the ancient resistome. *PLoS ONE*, Vol. 14. No. 1. e0210363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210363>
- Ahmed, M., Lyass, L., Markham, P. N., Taylor, S. S., Vázquez-Laslop, N. & Neyfakh, A. A. (1995) Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *Journal of Bacteriology*, Vol. 177. No. 14. pp. 3904–3910. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.3904-3910.1995>
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H.-K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., Faltyn, M., Hernandez-Koutoucheva, A., Sharma, A. N., Bordeleau, E., Pawlowski, A. C., Zubyk, H. L., Dooley, D., Griffiths, E., Maguire, F., Winsor, G. L., Beiko, R. G., Brinkman, F. S. L., Hsiao, W. W. L., Domselaar, G. V. & McArthur, A. G. (2020) CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, Vol. 48 (D1). pp. D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Alexa Oniciuc, E. A., Walsh, C. J., Coughlan, L. M., Awad, A., Simon, C. A., Ruiz, L., Crispie, F., Cotter, P. D. & Alvarez-Ordóñez, A. (2020) Dairy Products and Dairy-Processing Environments as a Reservoir of Antibiotic Resistance and Quorum-Quenching Determinants as Revealed through Functional Metagenomics. *mSystems*, Vol. 5. No. 1. e00723-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00723-19>
- Andrews, S. (2012) FastQC. A quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc> [Letöltve: 2022. 04. 25.]
- Andriyanov, P. A., Zhurilov, P. A., Kashina, D. D., Tutrina, A. I., Lis-kova, E. A., Razheva, I. V., Kolbasov, D. V. & Ermolaeva, S. A. (2022) Antimicrobial Resistance and Comparative Genomic Analysis of *Elizabethkingia anophelis* subsp. *endophytica* Isolated from Raw Milk. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), Vol. 11. No. 5. Article No. 648. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050648>
- Aragão, B. B., Trajano, S. C., Silva, J. G., Silva, B. P., Oliveira, R. P., Pinheiro Junior, J. W., Peixoto, R. M. & Mota, R. A. (2019) Short communication: High frequency of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in artisanal coalho cheese made from goat milk produced in northeastern Brazil. *Journal of Dairy Science*, Vol. 102. No. 8. pp. 6923–6927. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16162>
- Ashraf, D., Ombark, R. A., Samir, A. & Abdel-Salam, A. B. (2023) Characterization of multidrug-resistant potential pathogens isolated from milk and some dairy products in Egypt. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, Vol. 10. No. 2. pp. 275–283. <https://doi.org/10.5455/javar.2023.j679>
- Barbosa, T. M. & Levy, S. B. (2000) The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, Vol. 3. No. 5. pp. 303–311. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0167>
- Centers for Disease Control and Prevention (U.S.) (2019) Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2017) CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated from Animals. 1st edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. <https://clsi.org/standards/products/veterinary-medicine/documents/vet06> [Letöltve: 2024. 04. 22.]
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2018) CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 11st edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. <https://clsi.org/shop/standards/m07>
- Da Silva, R. A., Arenas, N. E., Luiza, V. L., Bermudez, J. A. Z. & Clarke, S. E. (2023) Regulations on the Use of Antibiotics in Livestock Production in South America: A Comparative Literature Analysis. *Antibiotics*, Vol. 12. No. 8. Article No. 1303. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081303>
- EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards) – Koutsoumanis, K., Allende, A., Álvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Nonno, R., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcelli, P. S., Suárez, J. E., Fernández, E. N., Istace, F., Aguillera, J., Brozzi, R., Liébana, E., Guerra, B., Correia, S. & Herman, L. (2023) Statement on how to interpret the QPS qualification on ‘Acquired antimicrobial resistance genes’. *EFSA Journal*, Vol. 21. No. 10. e08323. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8323>
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) – Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., de Lourdes Bastos, M., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Flachowsky, G., Gropp, J., Kolar, B., Kouba, M., López-Alonso, M., López Puente, S., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R. E., Wallace, R. J., Wester, P., Glandorf, B., Herman, L., Kärenlampi, S., Aguilera, J., Anguita, M., Brozzi, R. & Galobart, J. (2018) Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal*, Vol. 16. No. 3. e05206. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>
- Elafify, M., Khalifa, H. O., Al-Ashmawy, M., Elsherbini, M., El Latif, A. A., Okanda, T., Matsumoto, T., Koseki, S. & Abdelkhalik, A. (2020) Prevalence and antimicrobial resistance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in milk and dairy products in Egypt. *Journal of Environmental Science and Health. Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, Vol. 55. No. 3. pp. 265–272. <https://doi.org/10.1080/03601234.2019.1686312>
- Endres, C. M., Moreira, E., de Freitas, A. B., Castel, A. P. D., Graciano, F., Mann, M. B., Frazzon, A. P. G., Mayer, F. Q. & Frazzon, J. (2023) Evaluation of Enterotoxins and Antimicrobial Resistance in Microorganisms Isolated from Raw Sheep Milk and Cheese: Ensuring the Microbiological Safety of These Products in Southern Brazil. *Microorganisms*, Vol. 11. No. 6. Article No. 1618. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061618>
- Ernst, C. M., Staubitz, P., Mishra, N. N., Yang, S.-J., Hornig, G., Kalbacher, H., Bayer, A. S., Kraus, D. & Peschel, A. (2009) The bacterial defensin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysis and antimicrobial peptide repulsion. *PLoS Pathogens*, Vol. 5. No. 11. e1000660. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000660>
- EUCAST (2023) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0. <http://www.eucast.org>
- European Medicines Agency (2023) Guideline on plasmid DNA vaccines for veterinary use. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-plasmid-dna-vaccines-veterinary-use_en.pdf [Letöltve: 2023. 10. 17.]
- Farkas, M., Könyves, L., Csorba, S., Farkas, Z., Józwiák, Á., Süth, M. & Kovács, L. (2024) Biosecurity situation of large-scale poultry farms in Hungary according to the databases of National Food Chain Safety Office Centre for Disease Control and Biosecurity Audit System of Poultry Product Board of Hungary in the period of 2021–2022. *Magyar Állatorvosok Lapja*, Vol. 146. No. 12. pp. 723–742. <https://doi.org/10.56385/magyallorv.2024.12.723-742>
- Figueiredo, S., Bonnin, R. A., Poirer, L., Duranteau, J. & Nordmann, P. (2012) Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*.

- Clinical Microbiology and Infection, Vol. 18. No. 9. pp. 907–913. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03708.x>
- Food and Drug Administration (2007) Guidance for Industry: Considerations for Plasmid Deoxyribonucleic Acid Vaccines for Infectious Disease Indications. Department of Health and Human Services – Food and Drug Administration. <https://www.federalregister.gov/documents/2007/10/29/E7-21266/guidance-for-industry-considerations-for-plasmid-deoxyribonucleic-acid-vaccines-for-infectious> [Letöltve: 2022. 05. 09.]
- Gálfi P., Csikó G. & Jerzsele Á. (2015) Állatorvosi gyógyszerteraz III. Második, javított kiadás. Robbie-Vet Kft., Budapest.
- Gareau, M. G., Sherman, P. M. & Walker, W. A. (2010) Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology*, Vol. 7. No. 9. pp. 503–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2010.117>
- Guelpen, B. V., Hultdin, J., Johansson, I., Hallmans, G., Stenling, R., Riboli, E., Winkvist, A. & Palmqvist, R. (2006) Low folate levels may protect against colorectal cancer. *Gut*, Vol. 55. No. 10. pp. 1461–1466. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.085480>
- Hachmann, A.-B., Angert, E. R. & Helmann, J. D. (2009) Genetic analysis of factors affecting susceptibility of *Bacillus subtilis* to daptomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 53. No. 4. pp. 1598–1609. <https://doi.org/10.1128/AAC.01329-08>
- Hachmann, A.-B., Sevim, E., Gaballa, A., Popham, D. L., Antelmann, H. & Helmann, J. D. (2011) Reduction in membrane phosphatidylglycerol content leads to daptomycin resistance in *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 55. No. 9. pp. 4326–4337. <https://doi.org/10.1128/AAC.01819-10>
- Hetényi, N., Bersényi, A. & Hullár, I. (2024) Physiological Effects of Medium-Chain Fatty Acids and Triglycerides, and Their Potential Use in Poultry and Swine Nutrition: A Literature Review. *Magyar Állatorvosok Lapja*, Vol. 146. No. 11. pp. 651–659. <https://doi.org/10.56385/magvallorv.2024.11.651-659>
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C. & Sanders, M. E. (2014) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term *probiotic*. *Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology*, Vol. 11. No. 8. pp. 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
- Hyatt, D., Chen, G.-L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W. & Hauser, L. J. (2010) Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, Vol. 11. Article No. 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>
- Jack, D. L., Storms, M. L., Tchiew, J. H., Paulsen, I. T. & Saier, M. H. (2000) A broad-specificity multidrug efflux pump requiring a pair of homologous SMR-type proteins. *Journal of Bacteriology*, Vol. 182. No. 8. pp. 2311–2313. <https://doi.org/10.1128/JB.182.8.2311-2313.2000>
- Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P. & Petersen, T. N. (2021) Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 76. No. 1. pp. 101–109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>
- Kerek, Á., Csanády, P. & Jerzsele, Á. (2022) Antibacterial efficiency of propolis – Part 1. *Magyar Állatorvosok Lapja*, Vol. 144. No. 5. pp. 285–298.
- Kerek, Á., Szabó, Á., Dobra, P. F., Bárdos, K., Ózsvári, L., Fehérvári, P., Bata, Z., Molnár-Nagy, V. & Jerzsele, Á. (2023) Determining the *In Vivo* Efficacy of Plant-Based and Probiotic-Based Antibiotic Alternatives against Mixed Infection with *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in Domestic Chickens. *Veterinary Sciences*, Vol. 10. No. 12. Article No. 706. <https://doi.org/10.3390/vet-sci10120706>
- Klyachko, K. A., Schuldiner, S. & Neyfakh, A. A. (1997) Mutations affecting substrate specificity of the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Bmr. *Journal of Bacteriology*, Vol. 179. No. 7. pp. 2189–2193. <https://doi.org/10.1128/jb.179.7.2189-2193.1997>
- Kovács, D., Palkovicsné Pézsa, N., Farkas, O. & Jerzsele, Á. (2021) Usage of antibiotic alternatives in pig farming: Literature review. *Magyar Állatorvosok Lapja*, Vol. 143. No. 5. pp. 281–282.
- Krawczyk, P. S., Lipinski, L. & Dziembowski, A. (2018) PlasFlow: Predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. *Nucleic Acids Research*, Vol. 46. No. 6. e35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1321>
- Krueger, F. (2022) Trim Galore. Perl. <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore> [Letöltve: 2022. 04. 25.]
- Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K. & Lam, T.-W. (2015) MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics (Oxford, England)*, Vol. 31. No. 10. pp. 1674–1676. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/31/10/1674/177884> [Letöltve: 2022. 04. 25.]
- Liu, H., Dong, L., Zhao, Y., Meng, L., Wang, J., Wang, C. & Zheng, N. (2022) Antimicrobial Susceptibility, and Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Different Raw Milk Samples in China. *Frontiers in Microbiology*, Vol. 13. Article No. 840670. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.840670>
- Liu, J., Zhu, Y., Jay-Russell, M., Lemay, D. G. & Mills, D. A. (2020) Reservoirs of antimicrobial resistance genes in retail raw milk. *Microbiome*, Vol. 8. No. 1. Article No. 99. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00861-6>
- McEwen, S. A. & Collignon, P. J. (2018) Antimicrobial Resistance: A One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, Vol. 6. No. 2. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
- Metzker, M. L. (2010) Sequencing technologies – The next generation. *Nature Reviews: Genetics*, Vol. 11. No. 1. pp. 31–46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Micoli, F., Bagnoli, F., Rappuoli, R. & Serruto, D. (2021) The role of vaccines in combatting antimicrobial resistance. *Nature Reviews: Microbiology*, Vol. 19. No. 5. pp. 287–302. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00506-3>
- Millet, S. & Maertens, L. (2011) The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: From challenges to opportunities. *Veterinary Journal (London, England)*, Vol. 187. No. 2. pp. 143–144. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.05.001>
- Nawaz, M., Wang, J., Zhou, A., Ma, C., Wu, X., Moore, J. E., Cherie Millar, B. & Xu, J. (2011) Characterization and Transfer of Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria from Fermented Food Products. *Current Microbiology*, Vol. 62. No. 3. pp. 1081–1089. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9856-2>
- Neyfakh, A. A., Bidnenko, V. E. & Chen, L. B. (1991) Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: Similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 88. No. 11. pp. 4781–4785. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.4781>
- Ning, K., Zhou, R. & Li, M. (2023) Antimicrobial resistance and molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk in Hunan Province. *Peer Journal*, Vol. 11. e15847. <https://doi.org/10.7717/peerj.15847>
- Olasz, Á., Jerzsele, Á., Balta, L., Dobra, P. F. & Kerek, Á. (2023) In vivo Efficacy of Different Extracts of Propolis in Broiler Salmonellosis. *Magyar Állatorvosok Lapja*, Vol. 145. No. 8. pp. 461–475. <https://doi.org/10.56385/magvallorv.2023.08.461-475>
- O'Mahony, L., Feeney, M., O'Halloran, S., Murphy, L., Kiely, B., Fitzgibbon, J., Lee, G., O'Sullivan, G., Shanahan, F. & Collins, J. K. (2001) Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, Vol. 15. No. 8. pp. 1219–1225. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2001.01027.x>
- O'Neill, J. (2014) Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*. <https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20>

- Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf
- Osmanagaoglu, O., Kiran, F. & Ataoglu, H. (2010) Evaluation of in vitro Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* OZF Isolated from Human Breast Milk. Probiotics and Antimicrobial Proteins, Vol. 2. No. 3. pp. 162–174. <https://doi.org/10.1007/s12602-010-9050-7>
- Pan, L., Hu, X. & Wang, X. (2011) Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods. Food Control, Vol. 22. No. 8. pp. 1316–1321. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.02.006>
- Parry-Hanson Kunadu, A., Holmes, M., Miller, E. L. & Grant, A. J. (2018) Microbiological quality and antimicrobial resistance characterization of *Salmonella* spp. in fresh milk value chains in Ghana. International Journal of Food Microbiology, Vol. 277. pp. 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.025>
- Pawlowski, A. C., Stogios, P. J., Koteva, K., Skarina, T., Evdokimova, E., Savchenko, A. & Wright, G. D. (2018) The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. Nature Communications, Vol. 9. No. 1. Article No. 112. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02680-0>
- Podlesek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B., Zgur-Bertok, D., Komel, R. & Grabnar, M. (1995) *Bacillus licheniformis* bacitracin-resistance ABC transporter: Relationship to mammalian multidrug resistance. Molecular Microbiology, Vol. 16. No. 5. pp. 969–976. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02322.x>
- Rappuoli, R., Bloom, D. E. & Black, S. (2017) Deploy vaccines to fight superbugs. Nature, Vol. 552. No. 7684. pp. 165–167. <https://doi.org/10.1038/d41586-017-08323-0>
- Roberts, M. C. (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiology Letters, Vol. 245. No. 2. pp. 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.034>
- Rodrigues, M. X., Silva, N. C. C., Trevilin, J. H., Cruzado, M. M. B., Mui, T. S., Duarte, F. R. S., Castillo, C. J. C., Canniatti-Brazaca, S. G. & Porto, E. (2017) Molecular characterization and antibiotic resistance of *Staphylococcus* spp. isolated from cheese processing plants. Journal of Dairy Science, Vol. 100. No. 7. pp. 5167–5175. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12477>
- Roux, S., Enault, F., Hurwitz, B. L. & Sullivan, M. B. (2015) VirSorter: Mining viral signal from microbial genomic data. Peer Journal, Vol. 3. e985. <https://doi.org/10.7717/peerj.985>
- Sanders, M. E., Akkermans, L. M. A., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J., Hörmannspurger, G., Huys, G., Levy, D. D., Lutgendorff, F., Mack, D., Phothirath, P., Solano-Aguilar, G. & Vaughan, E. (2010) Safety assessment of probiotics for human use. Gut Microbes, Vol. 1. No. 3. pp. 164–185. <https://doi.org/10.4161/gmic.1.3.12127>
- Sebők, C., Márton, R. A., Mecke, M., Neogrady, Z. & Mátis, G. (2024) Antimicrobial peptides as new tools to combat infectious diseases. Magyar Állatorvosok Lapja, Vol. 146. No. 3. pp. 181–191. <https://doi.org/10.56385/magyallorv.2024.03.181-191>
- Simon, O. (2005) Micro-Organisms as Feed Additives – Probiotics. Advances in Pork Production, Vol. 16. pp. 161–167. <https://www.banffpork.ca/documents/BO07-SimonO.pdf>
- Standardization (2016) WHO Expert Committee on Biological Standardization: Sixty-sixth Report. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241209991>
- Takeuchi, K., Tomita, H., Fujimoto, S., Kudo, M., Kuwano, H. & Ike, Y. (2005) Drug resistance of *Enterococcus faecium* clinical isolates and the conjugative transfer of gentamicin and erythromycin resistance traits. FEMS Microbiology Letters, Vol. 243. No. 2. pp. 347–354. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.022>
- Tóth, A. G., Csabai, I., Krikó, E., Tózsér, D., Maróti, G., Patai, Á. V., Makrai, L., Szita, G. & Solymosi, N. (2020a) Antimicrobial resistance genes in raw milk for human consumption. Scientific Reports, Vol. 10. No. 1. Article No. 7464. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63675-4>
- Tóth, A. G., Csabai, I., Maróti, G., Jerzsele, Á., Dubecz, A., Patai, Á. V., Judge, M. F., Nagy, S. Á., Makrai, L., Bányai, K., Szita, G. & Solymosi, N. (2020b) A glimpse of antimicrobial resistance gene diversity in kefir and yoghurt. Scientific Reports, Vol. 10. No. 1. Article No. 22458. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80444-5>
- Urshev, Z. & Yungareva, T. (2021) Initial safety evaluation of *Enterococcus faecium* LBB.E81. Biotechnology & Biotechnological Equipment, Vol. 35. No. 1. pp. 11–17. <https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1840438>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A. & Laxminarayan, R. (2015) Global trends in antimicrobial use in food animals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 112. No. 18. pp. 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Wen, R., Li, C., Zhao, M., Wang, H. & Tang, Y. (2022) Withdrawal of antibiotic growth promoters in China and its impact on the foodborne pathogen *Campylobacter coli* of swine origin. Frontiers in Microbiology, Vol. 13. Article No. 1004725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1004725>
- Wenzler, S., Schmidt-Eisenlohr, E. & Daschner, F. (2004) Comparative in vitro Activities of Three New Quinolones and Azithromycin against Aerobic Pathogens Causing Respiratory Tract and Abdominal Wound Infections. Chemotherapy, Vol. 50. No. 1. pp. 40–42. <https://doi.org/10.1159/000077284>
- Wintersdorff, C. J. H. von, Penders, J., Niekerk, J. M. van, Mills, N. D., Majumder, S., Alphen, L. B. van, Savelkoul, P. H. M. & Wolffs, P. F. G. (2016) Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. Frontiers in Microbiology, Vol. 7. Article No. 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
- Xia, M., Mu, S., Fang, Y., Zhang, X., Yang, G., Hou, X., He, F., Zhao, Y., Huang, Y., Zhang, W., Shen, J. & Liu, S. (2023) Genetic and Probiotic Characteristics of Urolithin A Producing *Enterococcus faecium* FUA027. Foods, Vol. 12. No. 5. Article No. 1021. <https://doi.org/10.3390/foods12051021>
- Xu, J., Gallert, C. & Winter, J. (2007) Multiple antibiotic resistances of *Enterococcus* isolates from raw or sand-filtered sewage. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 74. No. 2. pp. 493–500. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0668-z>