

# **DIPLOMAMUNKA**

**Török Bence**

**2023**

# **TDK DOLGOZAT**

**Török Bence**

**2022**

# ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék



*Microbial Evolution and Growth Arena* (MEGA-plate), gyorsított evolúciós és koszelekciós vizsgálatok *Escherichia coli* törzsszel, kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) termelésre

Készítette:

**Török Bence**

V. évf. ao. hallgató

Témavezető:

Dr. Kerek Ádám

ÁTE, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, PhD-hallgató

**Budapest**

**2022**

## Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....	3
1. Bevezetés .....	4
2. Irodalmi áttekintés .....	5
2.1. Az antibiotikum rezisztencia jelentősége.....	5
2.2. A béta-laktamázok indukálta rezisztencia, az ESBL termelés.....	5
2.3. Az evolúciós és koszelekciós vizsgálatok jelentősége.....	9
2.4. A vizsgált antibiotikumok jellemzői és jelentőségük .....	11
2.5. Az <i>Escherichia coli</i> okozta fertőzések jelentősége.....	13
2.6. Új generációs szekvenálás .....	14
3. Célkitűzések.....	16
4. Anyag és módszer .....	17
4.1. A MEGA-plate készítésének módszertana .....	17
4.1.1. Fertőtlenítési protokoll .....	17
4.1.2. A fertőtlenítés hatékonyságának ellenőrzése.....	18
4.1.3. MEGA-plate táptalaj öntés .....	18
4.1.4. Az egyes hatóanyagok vizsgálata .....	20
4.1. A vizsgált baktérium törzs .....	22
4.2. Minimális gátló koncentráció meghatározás .....	22
4.3. Az ESBL termelés vizsgálatának módszerei .....	23
4.4. Új generációs szekvenálás .....	24
4.5. Bioinformatikai elemzés .....	24
5. Eredmények .....	25
5.1. A MEGA-plate fertőtlenítésének hatékonysága .....	25
5.2. A vizsgált hatóanyagok MIC értékei .....	25
5.3. Az új generációs szekvenálás eredményei.....	26
5.4. A genomban bekövetkezett mutációk.....	29
5.5. Szerotipizálás és virulencia faktorok változása .....	30
5.6. Az ESBL termelés vizsgálatának eredményei .....	30
6. Következtetések.....	31
7. Összefoglalás.....	33
8. Summary.....	34
9. Irodalomjegyzék.....	35
10. Köszönetnyilvánítás .....	41

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AMR	Antimikrobiális rezisztencia
ARG	Antimikrobiális rezisztencia gén
CFU	Teleformáló egység ( <i>Colony forming unit</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Kiterjedt spektrumú béta-laktamázok ( <i>Extended-spectrum beta-lactamases</i> )
ExPEC	Extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i>
MDR	Multirezisztens ( <i>Multidrug-resistant</i> )
MEGA	Mikrobiális evolúció és növekedési színtér ( <i>Microbial evolution and growth arena</i> )
MIC	Minimális gátló koncentráció ( <i>Minimal inhibitory concentration</i> )
NGS	Új generációs szekvenálás ( <i>Next generation sequencing</i> )
PBP	Penicillin kötő fehérje ( <i>Penicillin binding protein</i> )
TSB	Trypton-szója leves ( <i>Tryptic soy broth</i> )

## 1. BEVEZETÉS

Az utóbbi években nagyon sokat hallani tudományos és nem tudományos fórumokon egyaránt az antimikrobiális rezisztencia (AMR) problémaköréről és ennek egyre növekvő jelentőségéről. Az Európai Unióban az antimikrobiális szerek felhasználásáról szóló legutóbbi rendeletek megjelenése is azt mutatja, hogy a problémával a jelenben kell foglalkoznunk, mert a rezisztencia ilyen mértékű terjedése tarthatatlan lesz és katasztrofális következményekkel járhat mind az élelmiszeripar, mind állataink, mind pedig az emberiség számára. Az iparosodott állattartás, zsúfoltság és sokszor sérülő állathigiéniai körülmények magával hozták a fertőző, sok esetben bakteriális eredetű fertőzések egyre gyakoribbá válását, amelyekre eddig a penicillin felfedezése óta kézenfekvőnek tartottuk az antibiotikumok hatékonyságát. Azonban egyre több kutatás lát napvilágot, hogy az eddig jól bevált hatóanyagokkal szemben a rezisztencia folyamatosan nő, nagyobb dózisra van szükség az adott betegség gyógykezelésére, sőt van, hogy egyes esetekben már egyáltalán nem hatékonyak bizonyos antibiotikumok.

Az Egy egészség koncepció (*One Health*) keretén belül nemcsak állati, hanem emberi megbetegedések kezelésében történő hatékonyság megőrzésében kell gondolkodnunk, ma már sok olyan bizonyítottan bakteriális betegségben szenvedő beteg életéért küzdenek az orvosok, akik egyik ismert antibiotikus kezelésre sem reagálnak. Bizonyos baktériumfajok jóval hajlamosabbak a rezisztencia kialakítására, mint például a *Staphylococcus aureus* és az *Enterobacteriaceae* család tagjai, beleértve az *Escherichia coli*-t (*E. coli*). Utóbbi kiemelten fontos, hiszen minden emlős és madár bélrendszerében megtalálható, gyorsan szaporodik és egyes patogén törzsei súlyos emberi és állati megbetegedések okozói lehetnek. Gyakorisága miatt az élelmiszeripari kontaminációban betöltött szerepe is magasabb, mint más baktériumoknak. Rendkívül gyorsan képes különböző mechanizmusok révén számos antibiotikummal szemben rezisztenciát kialakítani, emellett pedig variábilis extrakromoszomális DNS-sel, plazmiddal is rendelkezhet, amely segítségével ezen gének más baktériumok számára is könnyen átadhatók. Különösen alkalmas valós idejű *in vitro* gyorsított evolúciós és koszelekciós vizsgálatok elvégzésére, melyet követően könnyen nyomon követhetőek a bekövetkezett fenotípusos, illetve genotípusos változások.

## **2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS**

### **2.1. Az antibiotikum rezisztencia jelentősége**

Az AMR napjaink egyik legfontosabb és sokat kutatott témája mind állat- és humánegészségügyi szempontból. A legóvatosabb becslések szerint is 700 000 főre teszik az ennek következtében évente bekövetkező halálozások számát és dollártrilliókra rúgó károkat okoz a gazdaság számára [1], a jelenlegi halálozás mértéke 2050-re 10 millióra nőhet [2]. A nozokomiális (kórházi) fertőzésekben az egyik legkritikusabb tényező az AMR előfordulása, hiszen súlyos fertőzések forrása lehet egy-egy hosszú kórházi kezelés során [3]. Néhány országban még a mai napig használhatók antibiotikumok haszonállatokban hozamfokozás céljából, melynek során az állatok ellenőrizetlenül, sokszor szubterápiás dózisban kapnak antimikrobiális szereket [4]. Az állati eredetű élelmiszerek forrásai lehetnek olyan zoonotikus fertőzéseknek, melyeket például az *E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus* és *Pseudomonas* fajok okoznak, melyek hajlamosak multirezisztencia kialakítására [5]. Egyes államok egyáltalán nem korlátozzák az antibiotikumok humánegészségügyi felhasználását, ezek recept, illetve pontos diagnózis felállítása nélkül hozzáférhetők a lakosság számára [3]. Az AMR terjedhet kromoszómálisan vagy plazmidon konjugációval, bakteriofágok által transzdukcióval, valamint szétesett baktériumok örökítőanyagának bekebelezése révén transzformációval. A rezisztencia mechanizmusai közé tartoznak a transzpozonok, melyek az integrálódó DNS szegmensek felcserélődését okozzák, az integront alkotó génkazetták főleg a multirezisztencia terjedéséért felelnek [6, 7]. Az antibiotikumokból fennmaradó reziduumok az emberi és állati vizelettel, bélsárral és egyéb szennyező anyagok révén a környezetbe jutnak, és az itt jelen lévő baktériumokra is evolúciós és koszelekciós nyomást fejtenek ki. Egyes országok, mint Kanada, Japán és Dánia, felismerve a rezisztencia jelentette veszélyt, bizonyos antibiotikumok (pl. ceftiofur) önkéntes visszaszorítása mellett döntöttek az állategészségügyben, aminek következtében jelentősen visszaszorult a kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) termelés a patogén baktériumok között [8].

### **2.2. A béta-laktamázok indukálta rezisztencia, az ESBL termelés**

Az első felfedezett  $\beta$ -laktám antibiotikum a penicillin volt, melyet a *Penicillium notatum* termel. Az 1900-as évek első felében széleskörűen és felelőtlenül alkalmazták elsősorban streptococcusok okozta megbetegedésekben, ennek eredményeképpen kiszelektálódtak azon törzsek, amelyek képesek voltak a penicillint enzimatikusan bontani. Mivel a fertőzések egyre kevésbé reagáltak a penicillines kezelésre, létrehozták a

penicillináz-stabil penicillineket, mint a meticillin. Ezek széleskörű használata főleg bőrfertőzésekben történt, egészen a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) 1980 körüli megjelenéséig [9]. Az 1970-es években kifejlesztett ampicillin és amoxicillin szélesítették a penicillinek spektrumát, ám ezek nem hatékonyak *Pseudomonas aeruginosa* ellen. Az első már ez ellen is hatékony szer a karbenicillin volt, de mivel ez nem elég stabil a  $\beta$ -laktamázokkal szemben, hamar felváltotta a piperacillin és tikarcillin. A  $\beta$ -laktámok másik nagy csoportja a cefalosporinok, szintén gombák által (pl. *Cephalosporium acremonium*) termelt vegyületek, azonban a penicillinektől eltérően a bennük található tiazolidin ötagú gyűrű helyett hattagú gyűrűvel rendelkeznek, amelyhez egy karboxil-csoport kötődik, így a kötődési helyén akadályozzák meg a baktériumok  $\beta$ -laktamáz enzimje általi lebontást. A rezisztencia kialakítása a  $\beta$ -laktám antibiotikumokkal szemben jó részt a baktériumok által termelt  $\beta$ -laktamáz enzimmel történik, amely hidrolizálja a  $\beta$ -laktám gyűrűt, ezáltal inaktíválva a hatóanyagot [10]. Hamar kiderült, hogy az első generációs cefalosporinok ellen gyorsan kialakul a rezisztencia, amely plazmidon kódolt is lehet, és ezt az *Enterobacteriaceae* család és a *Pseudomonas aeruginosa* gyorsan el tudja terjeszteni. Éppen ezért a széles spektrumú, 3-4. generációs cefalosporinokat csak súlyos, életet veszélyeztető helyzetekben használjuk. A monobaktámok szintén a béta laktámok közé tartoznak, azonban ezek csak Gram-negatív baktériumokra hatnak, köztük a *Pseudomonas aeruginosa* ellen is, indikációjuk az életet veszélyeztető helyzetekre korlátozódik, mint a szeptikémia, *meningitis*, *peritonitis* és multirezisztens (MDR) *E. coli* okozta húgyúti fertőzések. A Gram-negatív baktériumok esetén a legelterjedtebb béta laktamázt kódoló gén a *tem-1*, mely nevét annak az athéni betegről kapta (Temoniera), akiből 1963-ban először izolálták [11]. Egy kutatás kimutatta, hogy a monobaktámoknak hasonló béta laktamáz-gátló hatásuk van, mint a gyakran alkalmazott klavulánsavnak. Tehát bennük egyesül az antibakteriális és  $\beta$ -laktamáz ellenes hatás is [12]. A karbapenemek csoportjába szintén életmentő, ritkán használt szerek tartoznak. Kimagasló hatékonyságúak Gram-negatív baktériumok ellen, de Gram-pozitív baktériumok ellen is jó a hatékonyságuk. Életet veszélyeztető fertőzésekben nagyon fontos szerek. Mára már ellenük is kialakult rezisztencia, amit a baktériumok a *kpc-2* génnel (karbapenemázzal) érnek el. Ez az enzim képes hidrolizálni, az egyébként más  $\beta$ -laktamáznak ellenálló karbapenemeket [13]. Ennek ellenére mind a karbapenemek, mind a monobaktámok indikációjukból adódóan keveset használt szerek, így ritka ellenük a rezisztencia az Európai Unióban [14].



A  $\beta$ -laktámok hatásmechanizmusuk szerint a sejtfal-szintézis gátló antibiotikumok közé tartoznak. A peptidoglikán váz kialakulásának terminális szakaszában gátolják a keresztkötések kialakulását. A penicillinek esetén ún. penicillin kötő fehérje (PBP) található a sejtfalban, melyek minden sejtfallal rendelkező baktériumban megtalálhatók. Ezen baktériumok szaporodásához elengedhetetlen legalább egy darab PBP, amely fajoként változó, hogy melyik  $\beta$ -laktámra lesz érzékeny [10]. A  $\beta$ -laktamáz túltermelésért felelős géneknek három nagy csoportja van, az ESBL (pl. *ctx-m-27*), a metallo  $\beta$ -laktamázok (pl. *mbl1b*), és az *AmpC*-típusú  $\beta$ -laktamázok (pl. *AmpC*). Egy kórházi vizsgálat során, mely 200 db *E. coli* izolátumot vizsgált, 78%-ban mutattak ki MDR törzseket, melyek metallo  $\beta$ -laktamáz és *AmpC*-típusú géneket is hordoztak. A velük szembeni kezelésben a leghatékonyabbnak az amikacin, a klóramfenikol és a kolisztin bizonyult [15]. Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA, *European Food Safety Authority*) 2017-2018-as felmérése szerint az ampicillin, szulfonamid és flourokinolon rezisztencia az egyik legmagasabb, míg ezzel szemben harmadik generációs cefalosporinokra nagyon alacsony. Érdeemes megemlíteni, hogy a tagállamok közül 12 javuló tendenciát mutat az ESBL/*AmpC*-termelő *E. coli* előfordulását illetően, míg 6 országban a helyzet súlyosbodott a korábbi évekhez képest. Magyarországon a legmagasabb az összes tagállam közül az *AmpC*-termelő *E. coli* előfordulása brojlercsirke húsban (45%). Hízósértés mintákban pedig az ESBL-termelő *E. coli* jelenléte 50% fölötti [14]. Egy friss magyar kutatás szerint, melyben élelmiszertermelő állatok (sertés és baromfi) bélsármintáit vizsgálták nagyrészt *E. coli* tenyészeteken, sertések mintáinak 72%-a, míg a baromfi minták 34,2%-a bizonyult ESBL termelés szempontjából pozitívnak [16]. A karbapenem bontó  $\beta$ -laktamázoknak 4 nagy csoportja van (A, B, C, D), a kezdő aminosav-szekvencia homológiája alapján. Az A, C és D csoportok szerin-hidrolázok, amelyek hatékonyak a legtöbb  $\beta$ -laktámmal szemben, azonban a B csoport cink-metalloenzimekből áll, ezáltal hatékonyabb a karbapenemek lebontásában. Ezt a hatást úgy érik el, hogy egy stabil, hosszú ideig megmaradó, acil-enzimkomplexet képeznek [17]. Az elmúlt években ezen enzimek evolúciója felgyorsult, a *TEM*, *CMY* és *SHV* (Sulfhydryl Variable) típusú laktamáz gének mellett a 2000-es évek elején egy új, ellenállóbb variáns is létrejött, a *CTX-M*, mely már a legtöbb cefalosporinnak is ellenáll. A *CTX-M* típusú gének főleg *E. coli*-ban rendkívül nagy jelentőségűek, hiszen kutatások kimutatták, hogy a transzmisszibilis DNS-szakaszokon kódolt, így lehetővé teszi a horizontális génátadást [18]. Egy kutatás kimutatta, hogy a baromfiiparban felhasznált antibiotikumoknak rendkívül fontos szerepe van a rezisztencia terjesztésében, a kutatásban szereplő brojlercsirkék 60%-ából sikerült kimutatni  $\beta$ -laktamázt. Továbbá sertésekből és

húsmarhákból is kimutatták a *shv-12*, *ctx-m-2*, *ctx-m-14*, *ctx-m-15* és *ctx-m-44* géneket. A hordozó baktériumok az *E. coli* és *Klebsiella pneumoniae*, melyek zoonotikus szerepe jelentős [19]. A *ctx-m-27* egy különösen nagy jelentőséggel bíró  $\beta$ -laktamáz, mely nagyon hatékonyan képes lebontani a legtöbb cephalosporint és karbapenemet is [20], a világon mára széleskörben elterjedt és felfedezték már plazmidon kódolt változatát is [21, 22]. A hordozó mikrobák súlyos humán megbetegedést (húgyúti fertőzés, bakterémia) okozhatnak, különösen fontos az ember állatoktól való fertőződésének veszélye. Kimutatták házikedvencekből, kacsból, sertésből és legnagyobb mennyiségben csirkéből, így kiemelten fontos közegészségügyi jelentősége az élelmiszeripar szempontjából [23]. Több eltérő telepről származó egészséges brojlercsirkéből is sikerült kimutatni egyéb ESBL-hordozó *E. coli* törzseket, melyeknek jelentős része zoonotikus, illetve képes túlélni emberben is. Ezen, főleg plazmidokon kódolt rezisztenciagének terjedésének nagy veszélye a horizontális géntranszferben rejlik, hiszen a plazmidokon kódolt gének átadhatók különböző fajok között is, mint pl. a *Salmonella enterica* és *E. coli* [24]. A vadmadarak és galambok szerepe kiemelkedő lehet a MDR törzsek terjesztésében, a vizsgált galambok egynegyede hordozott MDR törzseket. Vadmadarak vizsgálata során több, mint 50%-ban találtak ESBL termelő *E. coli* törzseket [25]. Lovakból és társállatokból (kutyák és macskák) szintén mutattak ki ESBL termelő törzseket, melyek hozzájárulnak a zoonózisok kialakulásához [26], bár ezek gyakorisága elmarad a madarak és gazdasági haszonállatokban azonosított esetekhez képest. Hasonló a helyzet egyes, extraintesztinális fertőzést okozó *E. coli* (ExPEC) törzsek esetén, az emberi megbetegedések forrásai lehetnek élelmiszertermelő állatok, különösképpen a baromfifélék [27]. Egy humán patogén faj, az *Escherichia fergusonii*, mely nagyon hasonlít az ExPEC törzsekre szintén képes CTX-M, SHV és TEM gének által kódolt laktamázok termelésére, amelyek karbapenem, és cefalosporin rezisztenciát okoznak [28]. Baromfiból és sertésből származó *E. coli* törzsek vizsgálata során kimutattak *ctx-m-9*, *cmv-2* és *ctx-m-1* géneket is, melyek közül előző kettő főleg baromfi, utóbbi pedig főleg a sertés mintákban fordult elő. A baromfi eredetű minták jó része ExPEC-re jellemző géneket is hordozott [29]. Egy másik, finn kutatásban nyers baromfihúsból izoláltak *E. coli* törzseket, melyek közül 23% ExPEC törzs volt, ezek képesek emberben is emésztőcsatornán kívüli megbetegedést okozni, ám a vizsgálatban szereplő törzsek egyike sem volt rezisztens cefalosporinokra és ciprofloxacinnra sem, csupán egy törzs esetén találtak nalidixsav rezisztenciát [30].

Emberi megbetegedéseket tekintve, egy iráni kutatás húgyúti fertőzésekből izolált *E. coli* törzseken végzett rezisztencia vizsgálatokat, amelyben legmagasabb rezisztenciát ampicillinre mérték, ezt követte a nalidixsav és a szulfametoxazol-trimetoprim. Ez egybevág az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság által gyűjtött adatokkal [31]. A több antibiotikumra rezisztens *E. coli* törzsek ellen hatásos lehet több antimikrobiális szer kombinációban történő alkalmazása, mint például a florfenikol-amikacin vagy a florfenikol-gentamicin kombináció, amelyek kifejezett szinergizmust mutatnak, sőt bizonyos mértékig a mutációkat is akadályozzák mind *in vitro*, mind *in vivo* modellekben [32].

### **2.3. Az evolúciós és koszelekción vizsgálatok jelentősége**

A kísérletes evolúció olyan laboratóriumi módszer, amely lehetővé teszi az evolúciós folyamatok jelen időben történő tanulmányozását. Ennek egyik módszere a populációk versenyeztetéssel történő alkalmazkodása, megváltozott környezeti feltételekhez. A legtöbb adaptáció a kompromisszumokon alapszik, tehát olyan tulajdonságok kerülnek előtérbe, melyek növelik az élőlények fitneszét [33]. Ilyen vizsgálattal bizonyították például, hogy a az antimikrobiális peptidekkel szemben is képesek a baktériumok kialakítani rezisztenciát [34]. Ezt szemlélteti például az *E. coli* citrát hasznosításáért felelős mutáció létrejötte, melyhez 31 000 generációváltásra volt szükség, a megismételt 12 vizsgálat során is csak egy alkalommal következett be ugyanez a változás [35]. Évtizedeken keresztül a kísérleti evolúció volt az élő attenuált vakcinák fejlesztésének módszere, melynek során a kórokozókat sorozatosan passzálták eltérő gazdafajokban vagy táptalajon, amíg azok elvesztették patogenitásuk jelentős részét [36, 37]. A koevolúciós vizsgálat arra utal, hogy egy adott populáció génjei és tulajdonságai hatással vannak a faj egyes egyedeire, mely hatások az utódnemzedékekben figyelhetők majd meg. A mikrobákkal végzett vizsgálatok általában egyetlen klónból indulnak ki [38, 39].

Az úgynevezett laboratóriumi evolúciós vizsgálatok (ALE, *Adaptive Laboratory Evolution*) ellenőrzött, megbízható körülmények között zajló evolúciós vizsgálatokat tesznek lehetővé, melyek molekuláris vizsgálatokkal kiegészíthetők [40]. Elsőként Brown és Oliver 1982-ben dolgozta ki azt a rendszert, mely során etanollal szemben toleráns gombafajokat állított elő kísérletes úton, folyamatos szelekciós nyomás segítségével [41]. A módszer alapja a folyamatos környezeti stressz alkalmazása, ami szelekciós nyomásként hatott a baktérium populációra. A stresszor lehet szélsőséges hőmérséklet, pH, vagy akár gátló vagy toxikus anyag. A módszer során a stresszfaktor fokozatos növelésével érik el a stressztűrő mutánsokra irányuló szelekciós nyomást. Külön szempont a reprodukciós

képesség fenntartása, hiszen a mutációknak a populációban el kell terjednie és az utódokban rögzülni [42]. Butler 1996-ban *Streptomyces* élesztőgombákkal folytatta Brown és Oliver korábbi kísérleteit [43]. Az etanolt a táptalajba szakaszosan, pumpa segítségével juttatták be [42]. A korai laboratóriumi evolúciós vizsgálatok kezdetben meghatározott gyógyszerkoncentrációkkal történtek, melyhez olyan koncentrációt választottak, ami az ún. mutációs szelektációs ablakban (MSW, *Mutant Selection Window*) lehetőséget adott egy-egy rezisztens mutáns kiszelektálására. Egyre nagyobb koncentrációkra volt ahhoz szükség, hogy a szelektációs nyomást fenntartsák, amihez olyan kísérleti rendszerre volt szükség, mely folyamatosan biztosította a növekvő hatóanyag koncentrációt és ezzel az evolúciós adaptációt [44, 45]. Toprak és mtsai. 2011-ben kifejlesztettek egy olyan rendszert, amit mobidosztátnak neveztek el, ennek segítségével folyamatosan növekvő antibiotikum koncentrációt előállítva tudták fenntartani a növekvő szelektációs nyomást. A módszerrel az *E. coli* klóramfenikol, doxiciklin és trimetoprim hatóanyagokkal szemben vizsgálták a rezisztencia evolúcióját [46]. A laboratóriumi rövidtávú evolúciós vizsgálatok fejlődését a genom szekvenálás egyre szélesebb körben való elterjedése tette lehetővé. A baktériumok esetén az ilyen vizsgálatokat a rövid generációs idő, a nagy populációs méret és a kísérletek megismételhetősége teszi lehetővé. A vizsgálatok során sikerült feltárni az egyes mutációk közötti összefüggéseket és az adaptációs mechanizmusokat [40].

Az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia terjedéséhez különös mértékben hozzájárul az egyes fertőzések során kialakult baktériumpopulációk mérete, például egy tuberkulózis elváltozásban  $10^7$ - $10^8$  telepformáló egység (CFU) baktérium is felszaporodhat [47]. A szelektációs nyomást elősegíti a nem megfelelően kiválasztott gyógyszer dózis [48], a stressz [49], a rezisztencia mechanizmusok pedig mobilis genetikai elemek révén plazmidok, transzpozonok és integronok segítségével is tovább adhatók [50]. Mikrofluidikus eszközt használva, mely ciprofloxacint egyenletesen növekvő koncentrációját tartalmazó speciális edény volt, a baktériumok rezisztenciája mindössze 10 óra alatt kialakult, melyhez három gén és egy nukleotid szubsztitúciós változásra volt szükség [51].

A baktériumok gyorsított evolúciós vizsgálatára több próbálkozás történt, ilyen a chemostat (egy folyamatos hígításon alapuló technika), mely térben és időben változó környezetet hoz létre (a baktériumokat tartalmazó térben antibiotikum van), ebben az extrém körülmények közötti túlélést vizsgálták [52]. Ezzel a technikával a baktériumok folyamatos átoltása és hígítása mellett az egyes stressz faktorokkal szemben létrejött mutációkat, ezek

előfordulását, valamint genomszekvenálással annak pontos mechanizmusát is vizsgálni lehet [53]. Maga a folyamat hosszútávú evolúciós kísérletekkel is vizsgálható (LTEE, *Long Term Evolutionary Experiment*), ami egymással párhuzamosan akár naponta hat baktérium generációt is képes létrehozni és vizsgálni. Ehhez egy plazmid- és profágmentes törzset használtak, hogy a horizontális géntranszfer ne alakulhasson ki [54].

A Harvard Egyetem kutatói 2016-ban egy olyan evolúciós és koszelekciós vizsgálatra alkalmas laboratóriumi rendszert hoztak létre, mely alkalmas a baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulásának vizsgálatára. Az eszköz neve *Microbial Evolution and Growth Arena* (MEGA-plate) lett. Új generációs szekvenálással (NGS) az erről származó minták vizsgálata lehetővé teszi az egyes mechanizmusokat kódoló gének változásának és megjelenésének nyomon követhetőségét [55].

#### **2.4. A vizsgált antibiotikumok jellemzői és jelentőségük**

Az amoxicillin egy  $\beta$ -laktám antibiotikum, mely időfüggő baktericid hatását a bakteriális sejtfal szintézisének gátlásával éri el, melynek során a PBP A1 alegységéhez köt. A szervezetből való kiürülése nagyrészt vizelettel történik, aktív formában [56]. Spektruma széles, számos Gram-pozitív és Gram-negatív baktérium ellen hatásos, többek között az *E. coli* ellen is, azonban az ESBL termelő törzsek képesek lebontani, így sok esetben mára rezisztencia alakult ki ellene [57].

A cefotaxim a  $\beta$ -laktámok közé tartozó harmadik generációs cefalosporin, mely időfüggő baktericid hatással rendelkezik. Széles spektruma hatékonyvá teszi számos Gram-pozitív és Gram-negatív anaerob baktériummal szemben is [58]. Megoszlása a szervezetben gyors, felezési ideje viszonylag rövid mind i.v., mind i.m. injektálást követően [59]. Dezacetil hidrolizátuma szinergista hatást fejt ki, mely hatékonyabbá teszi a bélbaktériumok ellen [60]. A leggyakoribb rezisztenciát vele szemben a *CTX-M* típusú gének által kódolt mechanizmusok alakítják ki, melyek előfordulása egyre szélesebb körben megfigyelhető az *Enterobacteriaceae* család tagjai körében, mind kromoszomálisan és plazmidon kódolva is [61, 62].

A kolisztin, (polymyxin E) egy kritikusan fontos antibiotikum, melyet a *Bacillus polymyxa* termel. Hatásspektruma többnyire Gram-negatív baktériumokra terjed ki, mint a *Pseudomonas aeruginosa*, *Avibacterium baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* és *E. coli*, melyek lipopoliszacharid membránjához kötődve annak destabilizációját okozza [63]. Hatásmódja koncentrációfüggő baktericid, azonban *Neisseria*, *Proteus*, *Burkholderia*

*pseudomallei* és Gram-pozitív baktériumok ellen nem hat. Életet veszélyeztető fertőzésekben szisztémásan adva kiválasztása vesén keresztül történik, szájon át felszívódása minimális [64]. A rezisztencia vele szemben már világszerte jelen van, mely közül a legfontosabb a plazmidon kódolt *mcr-1* gén által kialakított rezisztencia, mely aktiválódásával a baktériumok a lipopoliszacharid réteg kationos töltéseit növelik, így a kolisztin kevésbé képes kapcsolódni ehhez. Az MCR géncsalád mellett – melynek mára legalább 22 variánsa létezik – sok más gén segítségével is kialakíthatnak a baktériumok rezisztenciát ellene, többek között kromoszóma mutációkkal, efflux pumpákkal és egyéb, eddig ismeretlen mechanizmusokkal [65]. Európában a baromfiiparban a vele szembeni rezisztencia relatíve alacsony, azonban ennek növekedése miatt az állatorvosok kizárólag nem invazív, igazoltan fogékony *E. coli* okozta fertőzés kezelésére használhatják [66].

A neomicin az aminoglikozidok családjába tartozó, koncentrációfüggő baktericid hatású antibiotikum. A riboszóma 30S alegységéhez kötve gátolja a megfelelő fehérjeszintézist a baktériumban, ezáltal misztranszlációt eredményez. Topikálisan alkalmazva hatékony, nem szívódik fel, per os adva rendkívül kis mértékben abszorbálódik a gasztrointesztinális traktusban [67]. A neomicint a baromfiiparban főleg colibacillosis megelőzésére, illetve kezelésére használják [68]. Több kutatás is fontos patogének (*E. coli*, *Avibacterium paragallinarum*, *Clostridium perfringens*) kifejezett rezisztenciáját mutatta ki a neomicinnel szemben [69].

Az oxitetraciklin a tetraciklinek családjának tagja, bakteriosztatikus tulajdonságát a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok széles köre ellen képes kifejteni, beleértve ebbe a spirochétákat, *Actinomyces*, *Rickettsia*, *Mycoplasma* és egyéb sejtfal nélküli mikroorganizmusokat is [70]. A riboszóma 30S alegységéhez kötődik, a fehérjeszintézist az elongáció szakaszában gátolja [71]. A legkevésbé lipofil a tetraciklinek közül, a gasztrointesztinális traktusból ezért kevésbé szívódik fel [72], reziduumok legnagyobb részben a csontokban és májban találhatóak [72, 73]. A madarak bélsarában is nagymértékben jelen van, a környezetben jelen lévő baktériumok rezisztenciájára is nagymértékben hatással van [74]. Mára az *E. coli*, *Klebsiella* és *Pseudomonas* fajok jó része rezisztenciát mutat a tetraciklinekre [71].

A florfenikol a fenikolok csoportjába tartozó széles spektrumú antibiotikum, mely bakteriális fehérje-szintézis gátló. Bakteriosztatikus hatású, az 50S riboszóma alegységen hat [75]. Hatékony többek között *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella* és *Staphylococcus* törzsek

ellen is [76]. Rendkívül jól felszívódik és hasznosul brojlersírkében mind per os, i.v. és i.m. adva [77]. A baktériumok számos módon védekeznek ellene az acetilációtól kezdve az efflux pumpákig. Napjainkban a rezisztencia növekvő tendenciát mutat ellene a globális kereskedelem és a helytelen használata miatt [75].

Az enrofloxacin egy második generációs fluorokinolon, mely koncentrációfüggő baktericid hatását a bakteriális DNS-giráz enzim gátlásával éri el. Széles spektrumú, mind Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok ellen hatásos [78]. Magas a biológiai hasznosulása és jó a megoszlása, azonban kevésbé akkumulálódik a szövetekben, de a rezisztencia terjedése miatt az USA-ban tilos élelmiszertermelő állatoknak adni [72]. A bélsárral ürülő metabolitok gyorsan lebomlanak a környezetben, ezért a valós veszélyt az állatokban kialakult rezisztens baktériumtörzsek jelentik [79].

A szulfametoxazol és trimetoprim bakteriális folsavszintézis gátló antibiotikumok. Az előbbi a dihidropteroát-szintetáz, míg utóbbi a dihidrofolát-reduktáz enzimet gátolja [80]. Szinergista hatásukat kombinációban kihasználva rendkívül széles spektrumú hatóanyagok, többek között az *Enterobacteriaceae* család, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Yersinia*, *Brucella*, *Burkholderia* genusok ellen [81]. Együtt alkalmazva 4:1 (szulfametoxazol-trimetoprim) arányban használják őket. Csírkékben (szemben a kutyával és emberrel) mindkét hatóanyag csak nagyjából 50%-ban szívódik fel per os adva [82]. Mára a rezisztencia mindkét szerrel szemben rendkívül gyakori, különösen az enterális baktériumok között a *dhfr* és *dhps* átadható géneknek köszönhetően [80].

### **2.5. Az *Escherichia coli* okozta fertőzések jelentősége**

Az *E. coli* egy széleskörben elterjedt baktériumfaj. A legtöbb emlős és madár faj normál bélmikrobiomjának tagja, ezért a természetes vizekben és egyéb helyeken is gyakran megtalálható. Széleskörű elterjedésének köszönhetően más baktériumfajokhoz képest sokkal gyakrabban kerülhet kapcsolatba antibiotikumokkal, amelyek hozzájárulnak a rezisztens törzsek szelektálódásához. Morfológiáját tekintve egy közepes nagyságú (1,1-1,5 x 2,0-6,0 µm), pálcika alakú, Gram-negatív baktérium, amely csillóval, burokkal és fimbriával rendelkezik [83]. Ellenállóképessége közepes, de rezisztencia kialakítására gyorsan képes megfelelő körülmények között. Osztódási ideje rendkívül gyors, éppen ezért alkalmas az antibiotikumok hatására kialakuló rezisztencia vizsgálatára. Baromfiban és egyéb állatokban számos kórkép okozója, például légzsákgyulladás, köldökgyulladás, hashártyagyulladás, csonthártyagyulladás és szeptikémia [84]. Gazdasági jelentősége

kiemelt, hiszen az enterális és egyéb kórképek kialakulásában szerepet játszhatnak különböző, patogén törzsei, melyek közül a baromfit érintő megbetegedések potenciális veszélyt jelenthetnek az emberek számára az élelmiszeriparban [85]. A kontaminált hús ExPEC törzsek forrása lehet, melyek emberben gyakran húgyúti megbetegedéseket, de akár szepszist és meningitist is okozhatnak [86]. A humán ún. *foodborne* – élelmiszer közvetítette – fertőzések legfőbb forrása a bélsárral szennyezett baromfihús, melyben többek között húgyúti fertőzést okozó *E. coli* törzseket is kimutattak [87]. Az importált húsok is tartalmazhatnak ESBL-termelő, *CTX-M* típusú géneket hordozó *E. coli* törzseket, a baromfihús mellett a második legmagasabb rezisztens törzs hordozást sertéshúsból mutatták ki. Az elmúlt években is történtek visszavezethető halálos kimenetelű fertőzések a hőkezeletlen, kontaminált ételek fogyasztását követően világszerte [88], ezek a fertőzések a plazmidon kódolt rezisztenciagének átadása miatt is fokozott figyelmet igényelnek [84]. Az extrakromoszomális DNS-átadás jelenségét is megfigyelték az *E. coli* és más baktériumfajok között horizontálisan, az így átadott gének akár ESBL gének is lehetnek, melyek patogénebb törzsekbe való átjutása komolyabb egészségügyi kockázatot jelenthet [89].

## 2.6. Új generációs szekvenálás

A molekuláris biológia módszerei közül teljes genomszekvenálás (WGS, Whole Genome Sequencing) segítségével azonosíthatjuk a patogén *E. coli* törzseket, kimutathatjuk a plazmidon vagy fágon kódolt géneket és azok mobilis genetikai elemként való kódolását is [90]. WGS módszerrel a következő géneket mutatták ki egy állatokból, emberekből és ételekből izolált *E. coli* baktériumokban: *qnrS1*, *qnrB19*, *mcr-1*, *ctx-m-1,15,55*, *cmy-2*, *gyra/parc/pare*, *ampC* and *pmrB*, melyek közül az *mcr-1* kiemelten fontos, kolisztin-rezisztencia gén [91]. A kiemelkedő eredmények ellenére klinikai szempontból ezen módszer túlságosan hosszú ideig tart és a rezisztenciagének jelenléte nem feltétlenül tükrözi a valós, fenotípusosan is megnyilvánuló érzékenységet [92].

A legszélesebb körben alkalmazott módszer az ún. NGS, amely segítségével a teljes genom is szekvenálható, de célzottan a DNS fontosabb szakaszai is vizsgálhatók. Lényege, hogy a genomnak sok millió apró fragmentumát párhuzamosan vizsgálja és az egyes bázisokat többször is kiértékeli bioinformatikai módszerekkel, így csökkentve a hiba lehetőségét [93]. A kifejezés nem egy bizonyos technikát takar, hanem minden Sanger-technika utáni genomszekvenálási eljárást. Napjainkban rendkívül gyorsan fejlődik ez a technológia, jelenleg is nagyon sok lehetőség közül választhatunk, mint például a 454 GS FLX Titanium software, AB SOLiD System, a HiSeq2000, és az Illumina NextSeq 500 [94].



Felhasználása számos területen képes a diagnosztikai munkát meggyorsítani és nagy mértékben pontosítani a vizsgálati eredményeket; ilyen például az onkológiában a ráktípusok identifikálásában és ennek megfelelően a személyre szóló terápiák alakításában betöltött szerepe is [95]. De a mikrobiológiától, a vírus- és baktériumtörzsek pontos kimutatásától az élelmiszer-hamisítások detektálásán át a személyre szabott genetikai vizsgálatokig és kezeléseikig határtalan lehetőségek elé néz [95, 96].

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen kutatás célja, hogy hazai laboratóriumi körülmények között kialakítsunk egy működőképes MEGA-plate rendszert, mely evolúciós és koszelekciós vizsgálati módszerekkel teszi lehetővé az antibiotikum rezisztencia kialakulásának vizsgálatát valós időben, laboratóriumi körülmények között, mind a humán- és állategészségügyben.

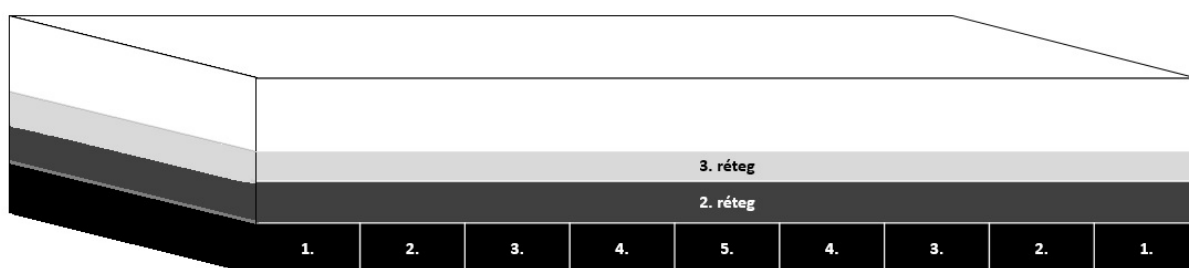
A MEGA-plate fertőtlenítési protokolljának kialakítása és standardizálása mellett célunk volt az egyes antibiotikumok vizsgálata. Ezek közül elsőként a cefotaxim hatóanyag vizsgálatát végeztük el, hiszen mint harmadik generációs cefalosporin baromfifélékre egyáltalán nincs engedélyezve, a vele szembeni rezisztencia viszont folyamatosan nő és szerepe feltételezett az ESBL termelés kialakulásában is. Jelen módszerrel a rezisztencia kialakulása valós időben vizsgálható és az így indukált antibiotikum érzékenység változás fenotípusos vizsgálatokkal – minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározással nyomon követhető.

További célunk volt, hogy a genomban bekövetkező változásokat NGS segítségével nyomon kövessük, az egyes feltételezett mechanizmusokat vizsgáljuk (pl. efflux-pumpa, bontóenzimek), különös tekintettel az antibiotikum indukálta kromoszómában bekövetkező mutációkra.

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. A MEGA-plate készítésének módszertana

A Harvard Egyetemen 120x60 cm-es méretben, polikarbonát lemezből készítették el a tenyésztőedényt [55]. A laboratóriumi lehetőségeink egy 60x30 cm-es polikarbonát edény elkészítését tették lehetővé, mely 5 mm-es anyagvastagságban készült (Innoterm Kft., Budapest, Magyarország), a ragasztás vízhatlan tetrahidrofurán ragasztóval történt. Az edény alját kilenc egyenlő sávra osztottuk, mely biztosította az alsó rétegben a növekvő antibiotikum koncentrációt tartalmazó táptalajok elkülönítését (**1. ábra**).



**1. ábra** A MEGA-plate rétegei. Az alsó réteg (1-5-1.) kilenc elkülönülő sávban biztosítja a növekvő antibiotikum koncentrációt, a középső réteg (2.) egybefüggő szilárd réteg, mely biztosítja a hatóanyag egyenletes diffúzióját a felső réteg (3.) irányába, mely a baktérium diffúz növekedését biztosítja félfolyékony réteggént.

A táptalajöntés során három réteget alakítottunk ki. Az alsó réteg kilenc elkülönülő rekeszből áll, melyek a vizsgált antibiotikum 0x, 1x, 10x, 100x és 1000x növekvő hatóanyag koncentrációját tartalmazzák az edény két szélétől befelé haladva (1-5. rekeszek), a 2. réteg egybefüggő szilárd réteg a homogenitást biztosítja az 1. és 3. réteg között. A 3. réteg a baktériumok diffúz növekedését biztosító félfolyékony réteg, melyben megvalósul a baktériumok növekedése növekvő hatóanyag koncentráció grádienssel szemben.

#### 4.1.1. Fertőtlenítési protokoll

A Harvard Egyetem fertőtlenítési protokolljában 10%-os NaOCl-t (hipó) használtak egy éjszakai inkubációs idővel [55]. Környezetvédelmi okokból változtattunk a módszeren, egyrészt a NaOCl jelentős környezetszennyezést jelent, másrészt a maradékanyag elkerülése végett, ami befolyásolhatná a baktériumok növekedését. Szakirodalmi adatokra hagyatkozva 7,5%-os hidrogén-peroxidot készítettünk [97, 98], stabilizált tömény (30%) hidrogén-peroxid (VWR International Kft., Magyarország) hígításával, aminek egy literét három liter

csapvízzel hígítottuk. Az edényt steril fülke alá helyeztük, majd a 7,5%-os hidrogén-peroxiddal feltöltöttük, fedőlemezének belső felületét és peremét NaOCl-dal töröltük át, melyhez a 4,5%-os hipó oldatát négyszeresére hígítottuk (0,9%-os). Végül steril fülke alatt inkubáltuk 15 percig, majd vákuumszivattyú segítségével leszívtuk a hidrogén-peroxidot és 30 percre UV-fényt kapcsoltunk.

#### **4.1.2. A fertőtlenítés hatékonyságának ellenőrzése**

A fertőtlenítés előtt steril vattapálcával mintát vettünk az edény aljáról, az oldalfaláról, a ragasztás mentén és a fedőlemez belső felületéről. A mintákat tripton-szója agart tartalmazó Petri-csészére oltottuk ki. A fertőtlenítést követően megismételtük a mintavételt. Ezen kívül az edényt feltöltöttük három liter tripton-szója levessel (TSB). A kioltott mintákat és a lefedett edényt 37 °C-os inkubátorba helyeztük. 18-24 órás inkubációt követően a Petri-csészéken CFU-t számoltunk; a leves zavarosodását pedig 3 héten keresztül figyeltük napi szinten.

#### **4.1.3. MEGA-plate táptalaj öntés**

A táptalaj elkészítéshez 2%-os BD Bacto Agart (VWR International Kft., Magyarország) használtunk, tápanyag kiegészítőként egy darab LB-Lennox (VWR International Kft., Magyarország) kapszulát adtunk táptalaj literenként, korábbi tapasztalataink alapján a legfelső réteghez egy plusz kapszulát adtunk. A gombás kontamináció elkerülése érdekében cikloheximidet (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) adtunk a táptalajhoz, 64 µg/ml koncentrációban.

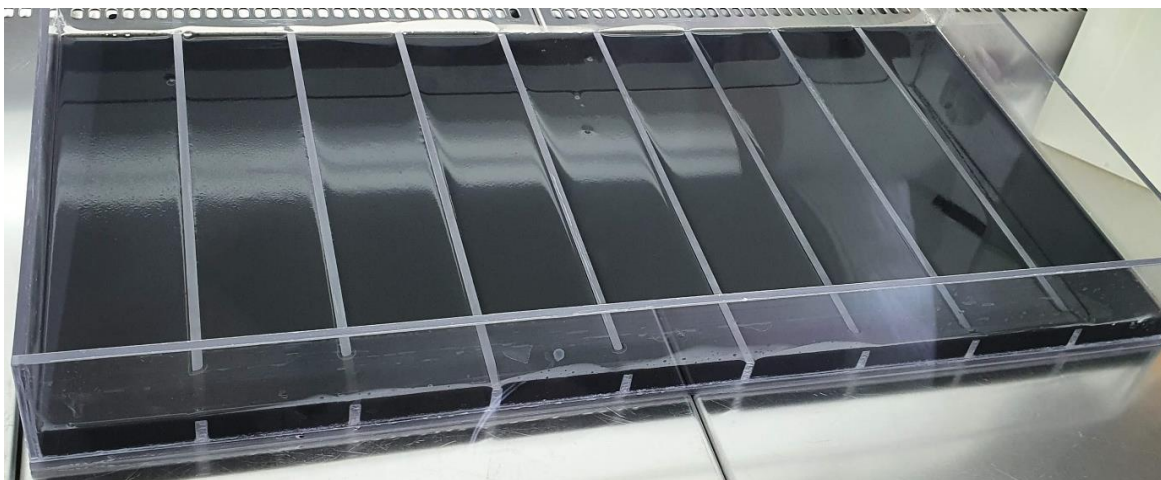
A teljes táptalaj öntést három lépésben végeztük. Először a legalsó réteg kilenc db 252 ml térfogatú, eltérő antibiotikum koncentrációt tartalmazó részét készítettük el, mely rekeszek a növekvő antibiotikum koncentrációt tartalmazó sávok megszilárdulás előtti keveredését akadályozzák meg. Ehhez külön üvegekben készítettük el az agart, mely az ioncserélt vizet és üvegenként egy ml akril fekete festéket tartalmazott, kontrasztosítás céljából. Ezt követően 121 °C-on 40 percig autoklávoztuk, majd amint 50 °C körüli hőmérsékletre hűlt vissza, hozzáadtuk a cikloheximidet, melyhez 226,8 mg cikloheximidből és 14 ml ioncserélt vízből törzsoldatot készítettünk, ezt steril fülke alatt cellulóz szűrőn keresztül átszűrtük. Az alsó réteg esetén így mindegyik sáv táptalajához 1 ml cikloheximidet mértünk, ezzel kialakítva a 64 µg/ml koncentrációt. A második réteg egy egybefüggő agar réteg 760 ml mennyiségben, ez felül rétegezi az eltérő antibiotikum koncentrációkat tartalmazó alsó réteget, ezzel megteremtve a homogenitást az alsó és a harmadik réteg

határfelületei között. A második rétegbe 3-3 ml cikloheximidet és akril festéket mértünk. Miután ez megszilárdult, a harmadik réteghez 0,28%-os félfolyékony réteget készítettünk, melyhez 2 ml cikloheximidet adtunk, tintát azonban nem (**1. táblázat**). A félfolyékony réteggel biztosított a baktériumok táptalajban történő terjedése diffúz módon, a növekvő antibiotikum koncentrációval szemben.

**1. táblázat** A táptalajöntés során kialakított egyes rétegek és cikloheximid koncentrációjuk

Cikloheximid, 226,8 mg/14 ml											
Összetevő/réteg	1.									2.	3.
Mennyiség (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2
Cikloheximid (mg)	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	48,6	32,4
Agar összesen (ml)	252	252	252	252	252	252	252	252	252	760	500
Koncentráció (µg/ml)	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64

Ezt követően ellenőriztük a ráoltott baktérium egyenletes növekedését a tenyésztőedényben. Ehhez egy hatóanyagtól mentes agart készítettünk, mindkét rövid szélére 100-100 µl *E. coli* szuszpenziót oltottunk. Az egyenletes növekedés érdekében a legfelső rétegéhez egy plusz kapszulát adtunk, így mindkét szélről kiindulva a tenyésztőedény közepéig 3 nap alatt képes benőni a baktérium. A növekedés vizuális nyomon követéséhez fekete akrilfestéket használva kontrasztosítottuk a baktérium telepeket. Ehhez 252 ml táptalajonként 1 ml festéket adtunk, kivéve a legfelső réteget (**2. ábra**). A kész rendszer adott baktérium, adott hatóanyag növekvő koncentráció-grádiensével szembeni evolúciós és koszelekciós AMR vizsgálatára alkalmas.



**2. ábra** A táptalaj kontrasztosítása fekete akril festékkal, a legfelső réteg kivételével

#### 4.1.4. Az egyes hatóanyagok vizsgálata

Első lépésként meghatároztuk a vizsgált mikroba adott antibiotikumra vonatkozó MIC értékét. Kutatásunk során cefotaxim hatóanyaggal végeztük el az evolúciós és koszelekciós vizsgálatot, ehhez meg kellett határozni a kiindulási baktérium törzsünk MIC értékét erre a hatóanyagra, mely 2 µg/ml volt. Ez szükséges lépés az egyes sávokhoz szükséges hatóanyagmennyiség kiszámolásához. Evolúciós előnyt biztosítva a rezisztencia kialakulásának érdekében ennek az ¼ értékét vettük kiindulási értéknek. A szélső két sávba nem került antibiotikum. Ezt követően kiszámoltuk, hogy a MIC értéknek a tízes alapú hatóanyag koncentráció növelése szerint a 2. rekeszbe 0,5 µg/ml, a 3. rekeszbe 5 µg/ml, a 4. rekeszbe 50 µg/ml és végül az 5. rekeszbe 500 µg/ml hatóanyag kerül. Egy alsó rekeszbe 252 ml táptalaj kerül, tehát pl. a 2. sávba 126 µg hatóanyag (1x szorzó) szükséges és így tovább. A középső sáv esetén 126 mg hatóanyagból törzsoldatot készítettünk 25 ml ioncserélt vízben, majd steril fülke alatt átszűrtük azt cellulóz szűrőn. A két szélső sávba hatóanyag nem került, így azoknál 250 ml vízben oldott agart használtunk (1 ml tintával és 1 ml cikloheximiddel számolva), a többi rekesz esetén 27 ml-el kevesebb vízzel készítettük a táptalajokat (1 ml tintával és 1 ml cikloheximiddel számolva), hiszen a táptalaj 50 °C körüli hőmérsékletre történő hűtését követően kerül sor steril fülke alatt az 1 ml cikloheximid és a hozzá tartozó 25 ml antibiotikum koncentrátum bemérésére. Ez összesen minden rekesz esetén 252 ml végtérfogatot jelent. Az 5. rekesz törzsoldatából kettőt készítettünk, az egyik az 1000x koncentrációnak felel meg, amikor az 5. rekesz táptalajához öntjük. A másiktól a többi réteghez ebből kihígítva készítettünk törzsoldatokat, a 4. rekeszhez ebből a törzsoldatból kimértünk 2,5 ml-t, amit 22,5 ml TSB-hez adtunk, így megkaptuk a 4. rekesz 25 ml törzsoldatát (100x koncentráció). A 3. rekeszhez kimértünk 0,25 ml-t, amit 24,75 ml TSB-hez adtunk, így megkaptuk a 3. rekesz 25 ml törzsoldatát (10x koncentráció). A 2. rekeszhez kimértünk 0,025 ml-t, amit 24,975 ml TSB-hez adtunk, így megkaptuk a 2. rekesz 25 ml törzsoldatát (1x koncentráció), ezzel elkészítve az 1x, 10x, 100x és 1000x hatóanyag koncentrációkat tartalmazó törzsoldatokat (**2. táblázat**).

**2. táblázat** A szükséges hatóanyag mennyiségének kiszámítása és a rendszer összeállítása

Összetevők	Rétegek										
	1.									2.	3.
Festék (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2
Cikloheximid (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2
Agar (ml)	250	225	225	225	225	225	225	225	250	754	496
TSB (ml)	-	24,975	24,75	22,5	-	22,5	24,75	24,975	-	-	-
5. törzsoldat (ml)	-	0,025	0,25	2,5	25	2,5	0,25	0,025	-	-	-
MIC szorzó	-	1	10	100	1000	100	10	1	-	-	-

A lemez elkészítését és a baktérium ráoltását követően a MEGA-plate tetejét az illesztés mentén leragasztottuk, egy 10 cm-es szakasz kivételével. Előbbit a bakteriális befertőződés esélyének minimalizálása érdekében, utóbbit a felesleges víz elpárolgása érdekében végeztük, hogy az ne okozzon kondenzvíz lecsapódást az edényen belül, ami megzavarná a baktériumok diffúzióját. Ezt követően 37 °C-os termosztátba helyeztük és naponta steril fülke alatt a tetejét eltávolítva nyomon tudtuk követni a baktérium diffúzióját, majd mintát vettünk belőle további vizsgálatokra. A **3. ábrán** a cefotaxim hatóanyag példáján jól látható, hogy az edény szélére oltott *E. coli* törzs teljesen benőtte az edényt, az egyes sávok határán kiszelektálódott vonalak faágszerű rajzolatai is jól kivehetők.



**3. ábra** A cefotaximot tartalmazó táptalajon növekvő *E. coli*, az egyes hatóanyag koncentrációk határán történő rezisztens vonalak kiválásának faágszerű rajzolatával

#### 4.1.A vizsgált baktérium törzs

A vizsgálatokhoz az ATCC 25922 *E. coli* referenciatörzset használtuk (LGC Ltd, Teddington, Nagy-Britannia), mely egy 1946-os Seattle-ben izolált törzs. Választásunk azért erre a fajra esett, mert egyrészt közegészségügyi jelentősége óriási, másrészt a biológiai biztonsági szintje (BSL-I. osztály) alacsony [99].

#### 4.2. Minimális gátló koncentráció meghatározás

Az AMR fenotípusos kifejeződését adott antibiotikummal szemben MIC érték meghatározás segítségével értékeltük. A vizsgálatot a *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) módszertana szerint végeztük, a breakpointokat a CLSI [100] és a *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) adatbázisának [101] segítségével határoztuk meg, egyes esetekben irodalmi adatokra hagyatkoztunk.

A -80 °C-on tárolt baktérium mintákat a vizsgálatot megelőző napon kioltottuk 3 ml TSB-be, majd inkubáltuk 18-24 órán keresztül 37 °C-on. A vizsgálatokat 96-os mikrotiter lemezen (VWR International Kft., Magyarország) végeztük. A munkalemezek első oszlopát kivéve feltöltöttünk minden oszlopot 90 µl TSB-vel (1. lépés). Ezután elkészítettük az egyes hatóanyagok 1024 µg/ml törzsoldatából a megfelelő kiindulási koncentrációkat TSB-ben hígítva. Ez a kezdő koncentráció 16 µg/ml volt ceftriaxon, cefkvinom, cefotaxim, ceftiofur, kolisztin, enrofloxacin esetében; 32 µg/ml volt amoxicillin és neomicin, esetében; 64 µg/ml volt oxitettraciklin és florfenikol, esetében; 128 µg/ml volt potenciált szulfonamid esetében. Ezekből 180 µl-t mértünk a lemezek első oszlopába (2. lépés), majd 2-es alapon hígítási sort készítettünk belőle (3. lépés), a 10. oszlop után a hegyeket a 90 µl felesleg oldattal eldobtuk, így az összes oszlop 90 µl oldatot tartalmazott. Minden törzshöz a munkalemezen egy-egy hígítási sor tartozott.

Ezt követően egy segédlemezen elkészítettük a baktériumok ráoltásához szükséges, 25x értékére hígított baktérium szuszpenziót, munkalemezenként egy oszlopot számolva 240 µl TSB-t mértünk be, majd lyukanként 10-10 µl baktérium szuszpenziót mértünk hozzá (4. lépés). Végül a baktériumtörzseket ráoltottuk a munkalemezekre. A kettes alapú hígítási sort tartalmazó lemezek 11. (pozitív kontroll) oszlopától kezdve, visszafelé haladva minden lyukba 10 µl baktériumszuszenziót mértünk be a segédlemezről (5. lépés). A 11. oszlop pozitív kontrollként (baktériumszuszenziót és levest tartalmazott), míg a 12. oszlop negatív kontrollként (levest tartalmazott) szolgált.



A munkalemezeket 18-24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd elbíraltuk a MIC értékeket szabad szemmel a pozitív kontrollokhoz viszonyítva (**3. táblázat**).

**3. táblázat** A MIC értékek elbírálásának szempontjai lyukanként egy adott mikrotörzs adott hatóanyag koncentrációval történő kezelése esetén

Jelölés	Tapasztalat	Értékelés
+++	jelentős mértékű zavarosodás	pozitív
++	mérsékelt zavarosodás	pozitív
+	enyhe zavarosodás	pozitív
+-	enyhe zavarosodás, a baktérium növekedése nem megítélhető	negatív
-	nincs zavarosság	negatív

#### 4.3. Az ESBL termelés vizsgálatának módszerei

Az ESBL termelés vizsgálatát a CLSI módszertana szerint végeztük [100]. Ehhez a vizsgált baktérium törzsek MIC értékét kellett meghatároznunk ceftazidim, ceftazidim-klavulánsav, cefotaxim és cefotaxim-klavulánsav hatóanyagokra nézve. A klavulánsavas kombinációk esetén minden egyes hígítást tartalmazó lyukban fixen 4 µg/ml klavulánsav koncentrációt kell biztosítani. Ezt úgy értük el, hogy a klavulánsavból törzsoldatot készítettünk, úgy hogy 10 mg klavulánsavat 10 ml desztillált vízben oldottunk fel, majd cellulóz szűrőn átszűrtük, ezt követően pedig 230 ml steril kation kiegyenlített Müller-Hinton leveshez (CAMHB) kevertük, így 10 mg/240 ml oldatot kaptunk. A klavulánsavat tartalmazó munkalemezek ráoltásához a baktériumokat tartalmazó segédlemez oszlopait ezzel az oldattal töltöttük fel 240 µl mennyiségben. Miután ehhez hozzáadtuk a 10 µl baktérium szuszpenziót és ennek a 10 µl-ét a munkalemez 90 µl-éhez adtuk, a 100 µl-es végtérfogatban pontosan 4 µg/ml klavulánsav koncentrációt értünk el.

Ezt követően a lemezeket 37 °C-os termosztátban 18-24 órán keresztül inkubáltuk, majd elbíraltuk azokat. A CLSI alapján ESBL termelőnek tekinthető egy törzs, amennyiben a klavulánsavval kombinációban vizsgált antimikrobiális hatóanyag MIC értékének háromszoros csökkenése figyelhető meg a hatóanyag önmagában történő használata során kapott MIC értékéhez képest. Például, ha ceftazidim esetén a MIC érték 8 µg/ml, azonban ceftazidim-klavulánsav kombinációval már csak 1 µg/ml (nyolcszoros a csökkenés), akkor az adott törzs ESBL termelőnek tekinthető.

#### 4.4. Új generációs szekvenálás

A törzseket tartalmazó baktériumszuszpenzióból a QIAmp DNS-kit (Qiagen, Németország) segítségével izoláltuk a DNS-t a gyártó protokollja szerint. A DNS-ből generált páros végű leolvasásokat Illumina NextSeq 500 szekvenálóval határoztuk meg [102]. Az Illumina termékek által használt eljárás, melyet mi is használtunk a kutatás során egy „pair end” technika, amelyben a hídamplifikáció során oligonukleotidokkal kihorgonyoznak egyszálú DNS szálakat, hozzászintetizálják a másik szálát és hídszerűen meghajlítják. Eltávolítják a reverz szálát és a szekvenálás folyamán a fluoreszcensen megjelölt kapcsolódó nukleotidokat olvassák le [103, 104].

#### 4.5. Bioinformatikai elemzés

A nyers szekvenciák minőségellenőrzését a FastQC v0.11.9 [105] szoftverrel végeztük, majd a nem megfelelő minőségű szekvenciák szűrését a TrimGalore v0.6.6 [106] program segítségével kivitelezte. A leolvasott szekvenciákat a MEGAHIT v1.2.9 [107] segítségével hosszabb szekvenciákká (contigok) igazítottuk. A contigok minőségellenőrzésére a QUAST szoftvert használtuk [108]. Az így kapott contigokból a Prodigal v2.6.3 [109] segítségével meghatároztuk az összes lehetséges nyílt olvasókeretet (ORF). Az antimikrobiális rezisztencia gének (ARG) azonosítását az ORF-ek között a Resistance Gene Identifier (RGI) v5.1.0 segítségével végeztük a CARD adatbázissal összevetve [110]. Csak azokat a géneket vettük figyelembe, amelyek megfeleltek a CARD adatbázis által meghatározott STRICT küszöbkritériumoknak, és legalább 95%-os szekvenciaazonosságot és lefedettséget mutattak.

Az azonosított rezisztenciagének potenciális mobilitásának vizsgálatához a MobileElementFinder (v1.0.3) [111] programot használtuk, amely a mobilis genetikai elemeket (MGE) jelzi előre a contigokon. Ebből a célból csak azokat az ARG-eket tekintettük potenciálisan mobilisnek, amelyek az adatbázisban szereplő leghosszabb, *E. coli*-ra jellemző összetett transzpozon távolságán belül voltak. Emellett a contigok plazmid eredetét a PlasFlow v1.1 szoftver [112], segítségével vizsgáltuk, a fággenomok jelenlétét a contigokon pedig a VirSorter v2.2.2 [113] szoftver segítségével határoztuk meg.

Az adatok további vizsgálata során a *Center for Genomic Epidemiology* online szoftvereit használtuk fel, kromoszóma pontmutációk keresésére a ResFinder 4.1. verzióját [114–116], szerotipizálásra a FimTyper 1.0 [117] és a CHTyper 1.0 [118] verzióját, a virulencia faktorok változásának nyomon követésére pedig a VirulenceFinder 2.0 szoftvert használtuk [115, 119, 120].

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. A MEGA-plate fertőtlenítésének hatékonysága

A 18-24 órás inkubációt követően a fertőtlenítés előtt vett mintákból kioltott Petri-csészéken kis számban baktérium telepek növekedését figyeltük meg, a fertőtlenítést követően vett minták esetén azonban nem nőttek ki CFU-k és a táplevesben sem tapasztaltunk zavarosodást. A táplevessel feltöltött edényt további három héten keresztül inkubáltuk 37 °C-on, azonban ezt követően sem tapasztaltunk benne változást.

### 5.2. A vizsgált hatóanyagok MIC értékei

Meghatároztuk a kiindulási törzsünk MIC értékét a MEGA-platere való ráoltást megelőzően, majd a cefotaxim (CTX) hatóanyag 10-es alapú növekvő koncentrációval való futtatást követően az egyes rekeszekből vett izolátumok esetén is (**4. táblázat**). Cefotaxim esetén a kiindulási MIC érték  $\frac{1}{4}$ -ének 10x koncentrációja már 0,25 µg/ml értékre, a 100x koncentráció 4 µg/ml értékre, az 1000x koncentráció pedig 32 µg/ml értékre növelte a hatóanyag MIC értékét. A többi hatóanyag ezen izolátumokon történő MIC értékének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a CTX 10x koncentrációja oxitetraciklin (OTC) esetén 4x, potenciált szulfonamid (PSA) és amoxicillin (AMX) esetén 2x és florfenikol (FLO) esetén 8x MIC érték növekedést okozott. A CTX 100x koncentrációjának hatására AMX és FLO esetén ez tovább nőtt, neomicin (NEO) esetén 2x, ceftriaxon (CFR) esetén 32x, ceftiofur (CFT) és cefkvinom (CFQ) esetén pedig 8x volt.

**4. táblázat** A cefotaxim hatóanyag tízes alapú növekvő koncentrációját tartalmazó MEGA-plate egyes rekeszeiből izolált *E. coli* baktérium MIC értékei a vizsgált hatóanyagokra nézve. Sötétzöld háttérrel jelölve a megnövekedett MIC értékeket (µg/ml).

	ENR	KOL	CTX	OTC	PSA	AMX	FLO	NEO	CFR	CFT	CFQ
Eredeti	0,03	0,125	0,125	2	8	16	16	32	0,125	0,5	0,25
0x	0,03	0,25	0,125	2	8	16	16	32	0,5	1	0,5
1x	0,03	0,25	0,125	2	8	16	16	32	0,5	1	0,5
10x	0,03	0,25	0,25	8	16	32	128	32	0,5	1	0,5
100x	0,03	0,25	4	8	16	>512	256	64	16	8	4
1000x	0,125	32	32	8	32	>512	256	128	64	32	8

ENR – enrofloxacin, KOL – kolisztin, CTX – cefotaxim, OTC – oxitetraciklin, PSA – potenciált szulfonamid (szulfametoxazol, trimetoprim), AMX – amoxicillin, FLO – florfenikol, NEO – neomicin, CFR – ceftriaxon, CFT – ceftiofur, CFQ - cefkvinom

 megtartott MIC (µg/ml) érték  megnövekedett MIC (µg/ml) érték

A CTX 1000x koncentrációja már minden vizsgált hatóanyag MIC értékét megnövelte, a kiindulási MIC értékhez képest enrofloxacin (ENR) esetén 4x, kolisztin (KOL) esetén 256x, CTX esetén 1056x, OTC és PSA esetén 4x, AMX esetén >94x, FLO esetén 16x, NEO esetén 8x, CFR esetén 512x, CFT esetén 64x és CFQ esetén 32x volt a növekedés mértéke.

### 5.3. Az új generációs szekvenálás eredményei

A kiindulási törzsünk és a cefotaximot tartalmazó MEGA-plate egyes rekeszeiből izolált *E. coli* baktériumok NGS-ét követően azt tapasztaltuk, hogy annak ARG génkészlete nem változott (5. táblázat).

5. táblázat A cefotaxim hatóanyaggal vizsgált minták NGS-e során azonosított ARG-k

ARG	ARG család	Rezisztencia mechanizmus	Antibiotikumok
<i>acrA</i>	RND	efflux pumpa	tetraciklinek, fenikolok, rifamicinek, penicillinek, cefalosporinok, fluorokinolonok
<i>acrB</i>	RND	efflux pumpa	
<i>acrD</i>	RND	efflux pumpa	aminoglikozidok
<i>acrE</i>	RND	efflux pumpa	
<i>acrE</i>	RND	efflux pumpa	penicillinek, cefalosporinok, fluorokinolonok
<i>acrF</i>	RND	efflux pumpa	
<i>acrF</i>	RND	efflux pumpa	
<i>acrS</i>	RND	efflux pumpa	tetraciklinek, fenikolok, rifamicinek, penicillinek, cefalosporinok, fluorokinolonok
<i>ampC - EC-5</i>	béta-laktamáz	enzimatis inaktiváció	
<i>ampH</i>	béta-laktamáz	enzimatis inaktiváció	penicillinek, cefalosporinok
<i>bacA</i> *	undekapril-pirofoszfát	target alteration	peptid antibiotikumok
<i>baeR</i>	RND	efflux pumpa	
<i>baeS</i>	RNS	efflux pumpa	aminoglikozidok
<i>cpxA</i>	RND	efflux pumpa	
<i>CRP</i>	RND	efflux pumpa	penicillinek, makrolidok, fluorokinolonok
<i>emrA</i>	MFS	efflux pumpa	
<i>emrB</i>	MFS	efflux pumpa	fluorokinolonok
<i>emrE</i>	SMR	efflux pumpa	makrolidok
<i>emrK</i>	MFS	efflux pumpa	tetraciklinek
<i>emrR</i>	MFS	efflux pumpa	fluorokinolonok

ABC - ATP-binding cassette, MFS - major facilitator superfamily, RND - resistance-nodulation-cell division

\*mobilis genetikai elem (MGE)

**5. táblázat** A cefotaxim hatóanyaggal vizsgált minták NGS-e során azonosított ARG-k (folytatás)

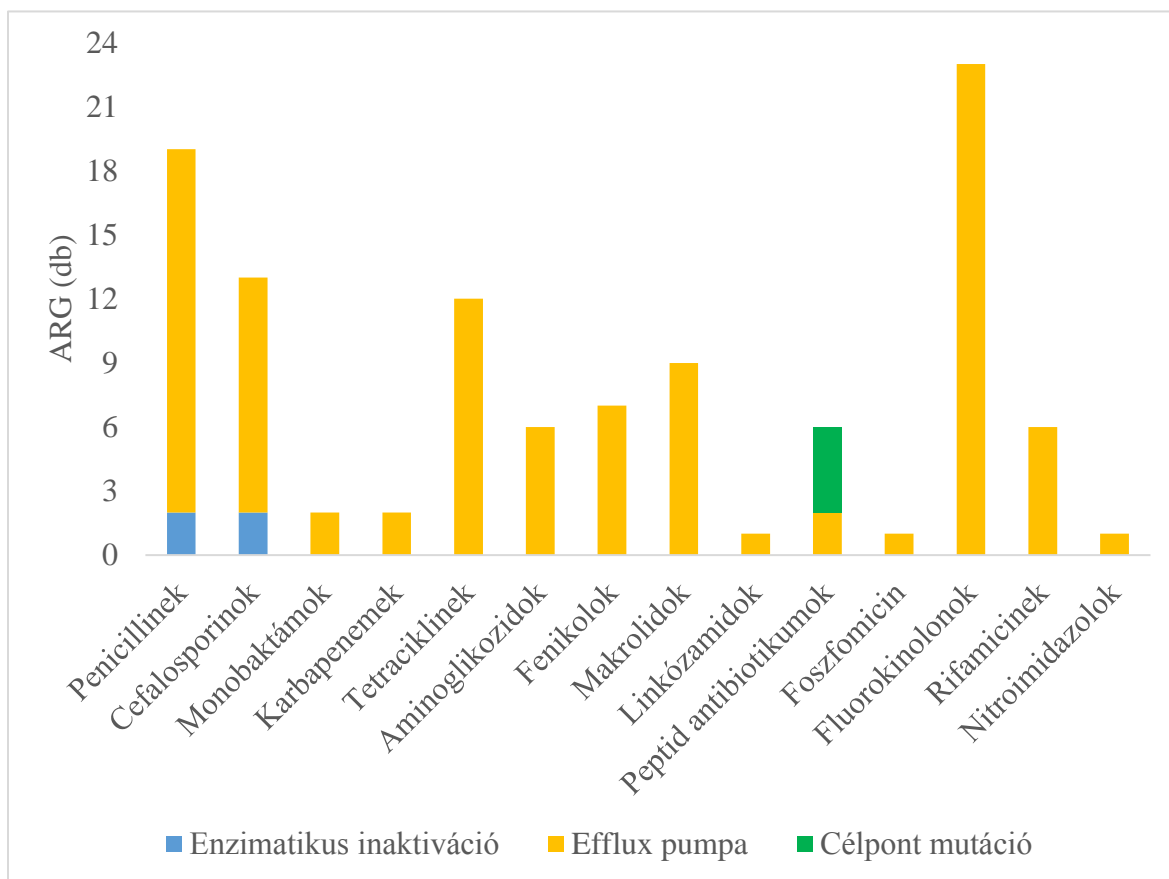
ARG	ARG család	Rezisztencia mechanizmus	Antibiotikumok
<i>eptA</i>	foszfoetanolamin-transzferáz	target alteration	peptid antibiotikumok
<i>evgA</i>	MFS és RND	efflux pumpa	penicillinek, makrolidok, fluorokinolonok, tetraciklinek
<i>evgS</i>	MFS	efflux pumpa	
<i>gadW</i>	AraC regulátor	efflux pumpa	penicillinek, makrolidok, fluorokinolonok
<i>gadX</i>	AraC regulátor	efflux pumpa	
<i>H-NS</i>	MFS	efflux pumpa	penicillinek, cefalosporinok, fluorokinolonok, makrolidok, tetraciklinek
<i>kdpE</i>	regulátor	efflux pumpa	aminoglikozidok
<i>marA*</i>	RND	efflux pumpa	tetraciklinek, fenikolok, rifamicinek, penicillinek, cefalosporinok, karbapenemek, monobaktámok, fluorokinolonok
<i>mdfA*</i>	MFS	efflux pumpa	tetraciklinek
<i>mdtE</i>	RND	efflux pumpa	penicillinek, makrolidok, fluorokinolonok
<i>mdtF</i>	RND	efflux pumpa	
<i>mdtG</i>	MFS	efflux pumpa	foszfomicin
<i>mdtH</i>	MFS	efflux pumpa	fluorokinolonok
<i>mdtM</i>	MFS	efflux pumpa	fenikolok, fluorokinolonok, linkózamidok
<i>msbA</i>	ABC	efflux pumpa	nitroimidazolok
<i>pmrF</i>	foszfoetanolamin-transzferáz	target alteration	peptid antibiotikumok
<i>soxR</i>	RND	efflux pumpa	tetraciklinek, fenikolok, rifamicinek, penicillinek, cefalosporinok, fluorokinolonok
<i>tolC*</i>	ABC, MFS, RND	efflux pumpa	tetraciklinek, fenikolok, rifamicinek, penicillinek, cefalosporinok, karbapenemek, monobaktámok, fluorokinolonok, peptid antibiotikumok, aminoglikozidok
<i>ugd</i>	foszfoetanolamin-transzferáz	target alteration	peptid antibiotikumok
<i>yojI</i>	ABC	efflux pumpa	

ABC - ATP-binding cassette, MFS - major facilitator superfamily, RND - resistance-nodulation-cell division

\*mobilis genetikai elem (MGE)

A legkritikusabb rezisztencia mechanizmus az enzimatis inaktiváció, melyet kódoló gének közül *ampC* és *ampH* géneket azonosítottunk, ezek kifejeződése penicillinekkel és

cefalosporinokkal szemben alakít ki rezisztenciát. Összesen négyféle gén esetén állapítottuk meg, hogy azok mobilis genetikai elemek, azonban ezek mind kromoszómán voltak kódolva. Ezek közül a *bacA* gén peptid antibiotikumokkal szemben enzimatisus célpont mutáció (*target alteration*) révén, az *mdfA* gén tetraciklinekkel szemben efflux pumpaként, a *tolC* és *marA* gének multidrug efflux pumpaként számos csoporttal szemben alakítanak ki rezisztenciát. Plazmidon és fágon kódolt gént nem azonosítottunk (5. táblázat).



**4. ábra** Az NGS során azonosított egyes rezisztencia mechanizmusokat kódoló gének gyakorisága az egyes hatóanyagok tükrében


Összesen 41-féle ARG-t azonosítottunk. A legtöbb ARG efflux pumpát kódolt (35 db), ezt követték a célpont mutációt (*target alteration*) kódoló gének (4 db), a legkevesebb az enzimatisus inaktivációt kódoló gének között volt megtalálható (2 db). Ha az egyes gének által kódolt rezisztencia mechanizmusokat gyakoriságuk szerint az érintett hatóanyagra bontva ábrázoljuk, akkor jól látható, hogy efflux pumpa esetén a legtöbb kódoló gén a fluorokinolonokkal szemben (23 db) volt megfigyelhető, ezt követték a penicillinek (17 db), a tetraciklinek (12 db) és a cefalosporinok (11 db). Enzimatisus inaktiváció mindössze a penicillinekkel és cefalosporinokkal szemben volt megfigyelhető, célpont mutáció (*target alteration*) pedig csak peptid antibiotikumokkal szemben (4. ábra).

## 5.4. A genomban bekövetkezett mutációk

A kromoszóma mutációk azonosítása során a kapott eredmények jól tükrözik a fenotípusosan megjelenő béta-laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia megjelenésével való összefüggéseket. Cefotaxim hatására az *ampC* gén promóter p.L9R és p.R8P szakaszán bekövetkezett CTA-CGA és CGC-CCC nukleotid cseréknek a megszűnése figyelhető meg, azonban a 10x hatóanyag koncentráció hatására a promóter g-7C>A, p.A2P, p.R11G és p.V11G régióiban aktiválódás, az 1000x hatóanyag koncentráció hatására pedig a promóter g-32T>A és p.R8H régióiban azonosított T-A és CGC-CAC nukleotid cserékkel járó folyamat feltételezhetően az *ampC* gén által kódolt enzim túltermelését okozta, megnövelve a MIC értéket 32 µg/ml értékre, ami 256x növekedés. Ezen kívül a 100x és 1000x hatóanyag koncentráció a rifamicin rezisztenciát kódoló *rpoB*-ben is aminosav cseréket indukált, azonban ennek a hatóanyagnak a fenotípusos tulajdonságait nem vizsgáltuk (6. táblázat).

6. táblázat Az egyes cefotaxim koncentrációk hatására bekövetkező kromoszóma pontmutációk

Az adatbázisban található kromoszóma pontmutációk a referencia törzshöz képest									
Gén	Antibiotikum	Mechanizmus	MIC érték szorzók					Nukleotid csere	Aminosav csere
			0x	1x	10x	100x	1000x		
ampC-promoter: g.-32T>A	penicillinek, cefalosporinok	enzimatis inaktiváció	-	-	-	+	+	T - A	-
Az adatbázisban nem található kromoszóma pontmutációk a referencia törzshöz képest									
ampC-promoter: p.L9R	penicillinek, cefalosporinok	enzimatis inaktiváció	+	-	-	-	-	CTA - CGA	leucin arginin
ampC-promoter: p.R8P	penicillinek, cefalosporinok	enzimatis inaktiváció	+	-	-	-	-	CGC - CCC	arginin prolin
ampC-promoter: g.-7C>A	penicillinek, cefalosporinok	enzimatis inaktiváció	-	-	+	-	-	C - A	-
ampC-promoter: p.A2P	penicillinek, cefalosporinok	enzimatis inaktiváció	-	-	+	-	-	GCC - CCA	alanin prolin
ampC-promoter: p.R11G	penicillinek, cefalosporinok	enzimatis inaktiváció	-	-	+	-	-	CGG - GGG	arginin glicin
ampC-promoter: p.V4E	penicillinek, cefalosporinok	enzimatis inaktiváció	-	-	+	-	-	GTA - GAA	valin glutaminsav
ampC-promoter: p.R8H	penicillinek, cefalosporinok	enzimatis inaktiváció	-	-	-	-	+	CGC - CAC	arginin hisztidin
rpoB:p.A1245T	rifamicinek	célpont mutáció, csere	-	-	-	+	+	GCG - ACG	alanin treonin
rpoB:p.E84G	rifamicinek	célpont mutáció, csere	-	-	-	+	-	GAA - GGA	glutaminsav glicin

 azonosított mutáció

## 5.5. Szerotipizálás és virulencia faktorok változása

A szekvenálási adatokból lehetőségünk volt a vizsgált törzs szerotipizálására is, ennek megfelelően O6-os típuspecifikus poliszacharidot (*wzx* és *wzy* gének), valamint H1 (*fliC*) és H30 (*fimH30*) fehérje természetű antigéneket azonosítottunk.

A virulencia faktorok vizsgálata során megállapítottuk, hogy a cefotaxim 100x koncentrációjának hatására megjelent a *papX* gén, mely a motilitás csökkentésére van hatással, az *sfaX* gén pedig eltűnt, ami egy olyan szabályozó fehérjét kódol, mely a DNS-ben az inverziós folyamatokat szabályozza. Az 1000x hatóanyag koncentráció hatására megjelent a vasszint szabályozásért felelős *irp1* gén, valamint a Toll-like receptorok közvetítette citokintermelés csökkentéséért felelős *tcpC* gén, melyek expresszáldódása elősegíti a baktériumok szervezeten belüli invázióját [121].

## 5.6. Az ESBL termelés vizsgálatának eredményei

A CLSI szabvány szerint elvégzett vizsgálat egyik hatóanyagának klavulánsavas kombinációja sem mutatott legalább 3x MIC érték csökkenést egyik izolátumban sem. Így fenotípusosan kijelenthetjük, hogy ESBL gén hatását nem tudtuk kimutatni, amit a genomikai vizsgálatok is alátámasztottak. Tehát egy minta esetén sem tapasztaltuk a hatóanyag önmagában történő használatához képest a klavulánsavval történő kombináció esetén legalább 3x MIC érték csökkenést. Az enzimatis inaktiváció következtében penicillinekkal és cefalosporinokkal szemben kialakult rezisztencia az *ampC* gén aktiválódásának a következménye, mely gén expressziója béta-laktamáz túltermelésért felel, azonban ennek a génnek az expresszáldódása nem okoz kiterjedt spektrumban béta-laktám csoporttal szemben kialakuló rezisztenciát (**7. táblázat**).

**7. táblázat** Az ESBL vizsgálat eredményei a CLSI által előírt ceftazidim (CTZ), cefotaxim (CTX) és azok klavulánsavas (KLA) kombinációjával

Minta	CTZ	CTZ+KLA	Különbség	CTX	CTX+KLA	Különbség
	(µg/ml)			(µg/ml)		
0x	0,03	0,03	-	0,03	0,03	-
1x	0,03	0,03	-	0,03	0,03	-
10x	0,06	0,06	-	0,03	0,06	1x
100x	8	4	1x	2	1	1x
1000x	8	8	-	8	8	-

CTZ – ceftazidim, CTZ+KLA – ceftazidim-klavulánsav, CTX – cefotaxim, CTX+KLA – cefotaxim-klavulánsav



## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

Magyarországon először valósítottuk meg a MEGA-plate rendszert, melyet a Harvard Egyetemen fejlesztettek ki [55]. Korábban Toprak és mtsai. egy mobidosztát segítségével növekvő antibiotikum koncentrációval szelektív nyomást kifejtve *E. coli* klóramfenikol, doxiciklin és trimetoprim rezisztencia kialakulásának evolúcióját vizsgálták [46]. Az *E. coli* ATCC 25922 törzs a cefotaxim MIC értékének 1000x koncentrációját 13 nap alatt benőtte. A Harvard Egyetem által vizsgált trimetoprim esetén ehhez 12 napra volt szükség [55]. A többlépcsős koncentráció grádienssel szemben kialakuló rezisztencia tehát hasonló idő alatt következett be. Más összehasonlító szakirodalom nem áll rendelkezésre.

Vizsgálataink során ellenőrzésként a lemez egyes koncentrációit tartalmazó sávjai fölül vett mintákból izolált *E. coli* újbóli MIC értékének meghatározásával ellenőriztük a rezisztencia kialakulásának kifejeződését. Ennek során megállapítottuk, hogy nagyságrendileg a cefotaxim MIC értékének növekedése követte az egyes sávok növekvő hatóanyag koncentrációját, a kiindulási 0,125 µg/ml érték a 10x koncentráció hatására 0,25 µg/ml, a 100x koncentráció hatására 4 µg/ml és az 1000x koncentráció hatására 32 µg/ml értékre nőtt. A cefotaxim növekvő koncentrációja szelektív nyomást gyakorolt más hatóanyagokkal szembeni rezisztenciát kódoló gének expressziójára is. Ennek során a 10x koncentráció hatására potenciált szulfonamid és amoxicillin esetén 2x, oxitetraciklin esetén 4x, florfenikol esetén 8x MIC érték növekedést tapasztaltunk. A cefotaxim 100x koncentrációjának hatására neomicin esetén 2x, ceftiofur és cefkvinom esetén 8x, florfenikol esetén 16x, ceftiaxon esetén 32x, amoxicillin esetén pedig már 94x volt a MIC mérték növekedése. A cefotaxim 1000x koncentrációja minden vizsgált hatóanyag MIC értékét megnövelte a kiindulási értékhez képest, enrofloxacin, oxitetraciklin és potenciált szulfonamid esetén 4x, neomicin esetén 8x, florfenikol esetén 16x, cefkvinom esetén 32x, ceftiofur esetén 64x, amoxicillin esetén 94x, kolisztin esetén 256x, ceftriaxon esetén 512x mértékben. A legnagyobb mértékű 1056x növekedés cefotaxim esetén volt megfigyelhető. Ilyen jellegű összehasonlító tanulmány nem áll rendelkezésre a szakirodalomban.

Az egyes hatóanyagokkal szemben kialakuló rezisztencia mechanizmusok az általunk vizsgált *E. coli* törzsben kromoszómálisan voltak kódoltak. Összesen 14-féle antibiotikum csoporttal szembeni rezisztencia kialakításáért felelős, 41-féle ARG-t azonosítottunk, melyek közül a legtöbb (35 db) a hatóanyagot a sejtől kipumpáló, ún. efflux pumpa volt. Ezen kívül azonosítottunk enzimátikus inaktivációért felelős géneket (*ampC*, *ampH*), valamint a peptid antibiotikumokkal szemben célpont mutációt kialakító géneket (*bacA*, *eptA*, *pmrF*, *ugd*). Kolistin szempontjából a *bacA* gént kizárhatjuk, mert az bacitracin

rezisztencia kialakításáért felel [122], mely gén vizsgálataink során MGE volt. Az *eptA* gént azért zárhatjuk ki, mert Rajkumari és mtsai. kutatásuk során azt állapították meg, hogy *mcr-1* gén hiányában stressz hatására nem nőtt a gén expressziója [123], vizsgálatunk során nem találtunk *mcr-1* gént. A *pmrF* és *ugd* (*pmrE*) gének regulátor funkcióját Gunn és mtsai. azonosították [124]. A  $\beta$ -laktám csoportot kivéve az összes többi esetben feltételezhetően aktiválódó efflux pumpák voltak felelősek a MIC érték növekedésért, enrofloxacin esetén elsődlegesen az *emrA*, *emrB*, *emrR*, *mdtH* gének; oxitetraciklin esetén az *emrK* és *mdfA* gének; neomicin esetén *baeR*, *baeS*, *cpxA*, *kdpE* gének. Kolisztin esetén a legnagyobb valószínűséggel az efflux pumpát kódoló *yojI* gén aktiválódhatott, Mónica és mtsai. kimutatták, hogy a *tolC* efflux pumparendszer működéséhez nélkülözhetetlen ez a gén [125], *tolC* gént mi is azonosítottunk. Ezen kívül számos MDR efflux pumpát kódoló gént is találtunk (pl. *acrA*, *acrB*, *acrS*, *H-NS*, *marA*, *soxR*, *tolC*).

Cefotaxim hatására a  $\beta$ -laktámok enzimatis inaktiválásáért felelős *ampC* gén esetén a 10x hatóanyag koncentráció hatására a promóter g-7C>A, p.A2P, p.R11G és p.V11G régiókban aktiválódás, az 1000x hatóanyag koncentráció hatására pedig a promóter g-32T>A és p.R8H régióban azonosított T-A és CGC-CAC nukleotid cserékkel járó folyamat feltételezhetően az *ampC* gén által kódolt enzim túltermelését okozta, megnövelve az amoxicillin és cefalosporinok MIC értékét. Az ilyen jellegű mutációk ritkák, ezt mutatja az a tanulmány, melyben egy *E. coli* citrát-hasznosításáért felelős mutáció létrejöttéhez 31 000 generációváltásra volt szükség, és a megismételt 12 vizsgálat során is csak egy alkalommal következett be ugyanez a változás [35].

ESBL termelésért felelős gént nem azonosítottunk, az *ampC* gén nagy mennyiségű  $\beta$ -laktamáz termeléséért felel, más tanulmányok szerint könnyen hiperexpresszáható [126]. Kromoszómálisan kódolt géneként azonosítottuk, az így termelődött  $\beta$ -laktamázt nem gátolják a béta-laktamáz inhibitorok [127], az első plazmidon való kódolását 2004-ben Japánban Nakano és mtsai. írták le [128]. Vizsgálatunk során *ampH* gént is azonosítottunk, mely szerepet játszik az *ampC* expressziójában, azonban Guérin és mtsai. azt találták, hogy a gén kiütése kevésbé befolyásolta az *ampC* kódolta enzimtermelést [129]. Händel és mtsai. vizsgálataik során azt találták, hogy amoxicillin hatására az *ampC* gén upregulációja következett be, ezen kívül az MDR efflux pumpát kódoló *mdtM* és *mdtK* gének is aktiválódtak [130], az *mdtM* gént mi is azonosítottuk, mely florfenikol és enrofloxacin rezisztenciát okoz. Ahhoz, hogy pontosan azonosítani tudjuk, hogy a kialakult rezisztenciákért mely gének aktiválódása felelt, transzkriptomikai vizsgálatok szükségesek.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjaink egyik jelentős problémája az AMR terjedése, mely 2050-re vezető halálozási ok lehet a világon. Ennek megelőzése közös gondolkodást, kooperációt igényel az állat- és humánegészségügy képviselői között. A rezisztencia kialakulásának megértését segítik az evolúciós és koszelekciós vizsgálatok. A Harvard Egyetem által kidolgozott MEGA-plate (*Microbial Evolution and Growth Arena*) első magyarországi megvalósítása lehetővé teszi *in vitro* evolúciós és koszelekciós vizsgálatokat *E. coli* baktériumon; melynek az AMR terjesztésében az egyik legnagyobb jelentősége van. Egy 60x30 cm-es tenyésztőedényt alakítottunk ki, melynek kilenc egyenlő részre osztott rekesze biztosítja a vizsgált hatóanyag tízes alapon növekvő 1x, 10x, 100x és 1000x koncentrációit. Kidolgoztunk egy hatékony fertőtlenítési protokollt, 7,5%-os hidrogén-peroxid és UV-fény használatával, majd teszteltük a rendszer működését cefotaxim hatóanyaggal. Meghatároztuk a vizsgált hatóanyagok minimális gátló koncentrációját (MIC). Cefotaxim esetén a 2 µg/ml MIC értéknek az ¼ részét vettük kiindulási értéknek, hogy evolúciós előnyt biztosítsunk, így az 1000x koncentrációba 13 nap alatt nőtt be a baktérium. Az új minták MIC értékének vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy nem csak a cefotaxim MIC értéke nőtt meg (0,125, 0,25, 4, 32 µg/ml), hanem oxitetraciklin (8 µg/ml), potenciált-szulfonamid (8 µg/ml), amoxicillin (32 µg/ml) és florfenikol (128 µg/ml) esetén már a cefotaxim 10x koncentrációja; neomicin (64 µg/ml), ceftriaxon (16 µg/ml), ceftiofur (8 µg/ml) és cefkvinom (4 µg/ml) esetén a cefotaxim 100x koncentrációja növekedést okozott. Az 1000x cefotaxim koncentráció további növekedést okozott, és már enrofloxacin (0,125 µg/ml), kolisztin (32 µg/ml) hatóanyagok esetén is megfigyelhető volt a hatás. Új generációs szekvenálással történő vizsgálattal az antimikrobiális rezisztencia génkészletben változást nem tapasztaltunk, azonban a cefotaxim 100x és 1000x koncentrációinak hatására az *ampC* génben bekövetkező kromozómális pontmutációk következtében a hatóanyagot lebontó enzimek expresszázódtak, ami a béta-laktám hatóanyagok MIC értékét megnövelte. Ezen kívül számos efflux pumpa aktiválódását feltételezzük, azonban ehhez további transzkriptomikai vizsgálatok szükségesek. ESBL termelésért felelős rezisztencia gént azonban nem azonosítottunk.

A módszerrel olyan evolúciós és koszelekciós vizsgálatokat tudunk végezni, mellyel képesek vagyunk indukálni az AMR kialakulását, hagyományos és molekuláris biológiai módszerekkel pedig nyomon tudjuk követni a hatóanyagok fenotípusos érzékenységre és a bakteriális genomra gyakorolt hatását, mely hozzájárul korunk egyik legégetőbb problémájának, az AMR kialakulásának pontosabb megértéséhez.

## 8. SUMMARY

One of today's major problems is the spread of antimicrobial resistance (AMR), which could be the leading cause of death worldwide by 2050. Preventing this requires joint thinking and cooperation between animal and human health professionals. Understanding the development of resistance is aided by evolutionary and coselection studies. The first implementation in Hungary of the MEGA-plate (Microbial Evolution and Growth Arena) developed by Harvard University will allow in vitro evolution and coselection studies on *E. coli*, one of the most important bacteria for the spread of AMR. A 60x30 cm culture dish has been constructed with nine equally divided compartments, providing 1x, 10x, 100x and 1000x concentrations of the test agent, increasing on a decimal basis. An efficient disinfection protocol was developed using 7.5% hydrogen peroxide and UV light and tested with cefotaxime. We determined the minimum inhibitory concentration (MIC) of the test agents. For cefotaxime, we used  $\frac{1}{4}$  of the MIC of 2  $\mu\text{g/ml}$  as a starting point to provide an evolutionary advantage, so that the bacteria grew to the 1000x concentration in 13 days. In the MIC of the new samples, we found that not only the MIC of cefotaxime (0.125, 0.25, 4, 32  $\mu\text{g/ml}$ ) increased, but also the 10x concentration of cefotaxime for oxytetracycline (8  $\mu\text{g/ml}$ ), potentiated sulphonamide (8  $\mu\text{g/ml}$ ), amoxicillin (32  $\mu\text{g/ml}$ ) and florfenicol (128  $\mu\text{g/ml}$ ); with neomycin (64  $\mu\text{g/ml}$ ), ceftriaxone (16  $\mu\text{g/ml}$ ), ceftiofur (8  $\mu\text{g/ml}$ ) and cefquinom (4  $\mu\text{g/ml}$ ), 100x concentrations of cefotaxime caused an increase. The 1000x concentration of cefotaxime caused a further increase, and an effect was already observed with enrofloxacin (0.125  $\mu\text{g/ml}$ ), colistin (32  $\mu\text{g/ml}$ ). No change in the antimicrobial resistance gene pool was observed by new generation sequencing, but the effect of 100x and 1000x concentrations of cefotaxime resulted in the expression of drug-degrading enzymes due to chromosomal point mutations in the *ampC* gene, which increased the MIC of beta-lactam drugs. In addition, the activation of several efflux pumps is hypothesized, but further transcriptomic studies are required. However, no resistance gene responsible for ESBL production was identified.

The method allows us to perform evolutionary and coselection studies that can induce AMR and to monitor the impact of drugs on phenotypic susceptibility and the bacterial genome using conventional and molecular biology methods, contributing to a better understanding of one of the most pressing problems of our time, the development of AMR.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Ruckert A, Fafard P, Hindmarch S, Morris A, Packer C, Patrick D, Weese S, Wilson K, Wong A, Labonté R (2020) Governing antimicrobial resistance: a narrative review of global governance mechanisms. *J Public Health Policy* 41:515–528. <https://doi.org/10.1057/s41271-020-00248-9>
2. O'Neill J (2016) Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations
3. Antão E-M, Wagner-Ahlf C (2018) Antibiotikaresistenz. *Bundesgesundheitsbl* 61:499–506. <https://doi.org/10.1007/s00103-018-2726-y>
4. Pollock J, Low AS, McHugh RE, Muwonge A, Stevens MP, Corbishley A, Gally DL (2020) Alternatives to antibiotics in a One Health context and the role genomics can play in reducing antimicrobial use. *Clin Microbiol Infect* 26:1617–1621. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.02.028>
5. Chowdhury S, Ghosh S, Aleem MA, Parveen S, Islam MA, Rashid MM, Akhtar Z, Chowdhury F (2021) Antibiotic Usage and Resistance in Food Animal Production: What Have We Learned from Bangladesh? *Antibiotics (Basel)* 10:1032. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091032>
6. Palma E, Tilocca B, Roncada P (2020) Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine: An Overview. *International Journal of Molecular Sciences* 21:1914. <https://doi.org/10.3390/ijms21061914>
7. Dr. Gálfi P, Dr. Csikó G, Dr. Jerzsele Á Állatorvosi Gyógyszertan III. (Második javított kiadás). <http://www.a3shop.hu/allatorvosi-konyvek/magyar-nyelvu-konyvek--allatorvos-tudomany-11813/allatorvosi-gyogyszertan-iii-masodik-javitott-kiadas-/611267/>. Accessed 28 Aug 2022
8. McEwen SA, Collignon PJ (2018) Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr* 6:. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>
9. Hemmer RJ, Vaudaux P, Waldvogel FA (1979) Methicillin potentiates the effect of gentamicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 15:34–41. <https://doi.org/10.1128/aac.15.1.34>
10. Bush K, Bradford PA (2016)  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6:. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
11. Ruiz J Etymologia: TEM - Volume 24, Number 4—April 2018 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. <https://doi.org/10.3201/eid2404.et2404>
12. Mahmood AAJ, Al-Iraqi MA, Abachi FT (2021) Design, synthesis and anti- $\beta$ -lactamase activity for new monobactam compounds. *Materials Today: Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.218>
13. Mehta SC, Furey IM, Pemberton OA, Boragine DM, Chen Y, Palzkill T (2021) KPC-2  $\beta$ -lactamase enables carbapenem antibiotic resistance through fast deacylation of the covalent intermediate. *Journal of Biological Chemistry* 296:100155. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015050>
14. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2020) The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA J* 18:e06007. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6007>
15. Ansari S, Nepal HP, Gautam R, Shrestha S, Neopane P, Gurung G, Chapagain ML (2015) Community acquired multi-drug resistant clinical isolates of *Escherichia coli* in a tertiary care center of Nepal. *Antimicrob Resist Infect Control* 4:15. <https://doi.org/10.1186/s13756-015-0059-2>
16. Balázs B, Nagy JB, Tóth Z, Nagy F, Károlyi S, Turcsányi I, Bistyák A, Kálmán A, Sárközi R, Kardos G (2021) Occurrence of *Escherichia coli* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases in food-producing animals. *Acta Veterinaria Hungarica* 69:211–215. <https://doi.org/10.1556/004.2021.00036>
17. Maveyraud L, Mourey L, Kotra LP, Pedelacq J-D, Guillet V, Mobashery S, Samama J-P (1998) Structural Basis for Clinical Longevity of Carbapenem Antibiotics in the Face of Challenge by the Common Class A  $\beta$ -Lactamases from the Antibiotic-Resistant Bacteria. *J Am Chem Soc* 120:9748–9752. <https://doi.org/10.1021/ja9818001>
18. Cormier A, Zhang PLC, Chalmers G, Weese JS, Deckert A, Mulvey M, McAllister T, Boerlin P (2019) Diversity of CTX-M-positive *Escherichia coli* recovered from animals in Canada. *Vet Microbiol* 231:71–75. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.02.031>
19. Hiroi M, Yamazaki F, Harada T, Takahashi N, Iida N, Noda Y, Yagi M, Nishio T, Kanda T, Kawamori F, Sugiyama K, Masuda T, Hara-Kudo Y, Ohashi N (2012) Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *J Vet Med Sci* 74:189–195. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0372>
20. Tsang KK, Maguire F, Zubyk HL, Chou S, Edalatmand A, Wright GD, Beiko RG, McArthur AG (2021) Identifying novel  $\beta$ -lactamase substrate activity through in silico prediction of antimicrobial resistance. *Microb Genom* 7:. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000500>
21. Cameron A, Mangat R, Mostafa HH, Taffner S, Wang J, Dumyati G, Stanton RA, Daniels JB, Campbell D, Lutgring JD, Pecora ND (2021) Detection of CTX-M-27  $\beta$ -Lactamase Genes on Two Distinct Plasmid Types in ST38 *Escherichia coli* from Three U.S. States. *Antimicrob Agents Chemother* 65:e0082521. <https://doi.org/10.1128/AAC.00825-21>

22. Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Sirot J (2003) Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52:29–35. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg256>
23. Zhao Q-Y, Li W, Cai R-M, Lu Y-W, Zhang Y, Cai P, Webber MA, Jiang H-X (2021) Mobilization of Tn1721-like structure harboring blaCTX-M-27 between P1-like bacteriophage in Salmonella and plasmids in Escherichia coli in China. *Veterinary Microbiology* 253:108944. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108944>
24. Bortolaia V, Larsen J, Damborg P, Guardabassi L (2011) Potential pathogenicity and host range of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli isolates from healthy poultry. *Appl Environ Microbiol* 77:5830–5833. <https://doi.org/10.1128/AEM.02890-10>
25. Borges CA, Cardozo MV, Beraldo LG, Oliveira ES, Maluta RP, Barboza KB, Werther K, Ávila FA (2017) Wild birds and urban pigeons as reservoirs for diarrheagenic Escherichia coli with zoonotic potential. *J Microbiol* 55:344–348. <https://doi.org/10.1007/s12275-017-6523-3>
26. Ewers C, Bethe A, Stamm I, Grobbel M, Kopp PA, Guerra B, Stubbe M, Doi Y, Zong Z, Kola A, Schaufler K, Semmler T, Fruth A, Wieler LH, Guenther S (2014) CTX-M-15-D-ST648 Escherichia coli from companion animals and horses: another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence? *J Antimicrob Chemother* 69:1224–1230. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt516>
27. Lazarus B, Paterson DL, Mollinger JL, Rogers BA (2015) Do Human Extraintestinal Escherichia coli Infections Resistant to Expanded-Spectrum Cephalosporins Originate From Food-Producing Animals? A Systematic Review. *Clinical Infectious Diseases* 60:439–452. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu785>
28. Adesina T, Nwinyi O, De N, Akinnola O, Omonigbehin E (2019) First Detection of Carbapenem-Resistant Escherichia fergusonii Strains Harboring Beta-Lactamase Genes from Clinical Samples. *Pathogens* 8:164. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040164>
29. Cortés P, Blanc V, Mora A, Dahbi G, Blanco JE, Blanco M, López C, Andreu A, Navarro F, Alonso MP, Bou G, Blanco J, Llagostera M (2010) Isolation and Characterization of Potentially Pathogenic Antimicrobial-Resistant Escherichia coli Strains from Chicken and Pig Farms in Spain. *Appl Environ Microbiol* 76:2799–2805. <https://doi.org/10.1128/AEM.02421-09>
30. Lyhs U, Ikonen I, Pohjanvirta T, Raninen K, Perko-Mäkelä P, Pelkonen S (2012) Extraintestinal pathogenic Escherichia coli in poultry meat products on the Finnish retail market. *Acta Vet Scand* 54:64. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-54-64>
31. Haghghatpanah M, Mojtahedi A (2019) <p>Characterization of antibiotic resistance and virulence factors of <em>Escherichia coli</em> strains isolated from Iranian inpatients with urinary tract infections</p>. *IDR* 12:2747–2754. <https://doi.org/10.2147/IDR.S219696>
32. Kim S, Woo JH, Jun SH, Moon DC, Lim S-K, Lee JC (2020) Synergy between Florfenicol and Aminoglycosides against Multidrug-Resistant Escherichia coli Isolates from Livestock. *Antibiotics (Basel)* 9:. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040185>
33. Kawecki TJ, Lenski RE, Ebert D, Hollis B, Olivieri I, Whitlock MC (2012) Experimental evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 27:547–560. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.06.001>
34. Perron GG, Zasloff M, Bell G (2006) Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273:251–256. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3301>
35. Blount ZD, Borland CZ, Lenski RE (2008) Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of Escherichia coli. *PNAS* 105:7899–7906. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803151105>
36. Plotkin SA, Plotkin SL (2011) The development of vaccines: how the past led to the future. *Nat Rev Microbiol* 9:889–893. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2668>
37. Ebert D (1998) Experimental Evolution of Parasites. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.282.5393.1432>
38. Lenski RE, Rose MR, Simpson SC, Tadler SC (1991) Long-Term Experimental Evolution in Escherichia coli. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations. *The American Naturalist* 138:1315–1341. <https://doi.org/10.1086/285289>
39. Gerrish PJ, Lenski RE (1998) The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica* 102:127. <https://doi.org/10.1023/A:1017067816551>
40. Conrad TM, Lewis NE, Palsson BØ (2011) Microbial laboratory evolution in the era of genome-scale science. *Mol Syst Biol* 7:509. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.42>
41. Brown SW, Oliver SG (1982) Isolation of ethanol-tolerant mutants of yeast by continuous selection. *European J Appl Microbiol Biotechnol* 16:119–122. <https://doi.org/10.1007/BF00500738>
42. Lane PG, Hutter A, Oliver SG, Butler PR (1999) Selection of Microbial Mutants Tolerant To Extreme Environmental Stress Using Continuous Culture–Control Design. *Biotechnology Progress* 15:1115–1124. <https://doi.org/10.1021/bp990084j>

43. Butler PR, Brown M, Oliver SG (1996) Improvement of antibiotic titers from *Streptomyces* bacteria by interactive continuous selection. *Biotechnology and Bioengineering* 49:185–196. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960120\)49:2<185::AID-BIT7>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960120)49:2<185::AID-BIT7>3.0.CO;2-M)
44. Lee HH, Molla MN, Cantor CR, Collins JJ (2010) Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* 467:82–85. <https://doi.org/10.1038/nature09354>
45. Bryson V, Szybalski W (1952) Microbial Selection. *Science* 116:45–51. <https://doi.org/10.1126/science.116.3003.45>
46. Toprak E, Veres A, Michel J-B, Chait R, Hartl DL, Kishony R (2011) Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug stress. *Nat Genet* 44:101–105. <https://doi.org/10.1038/ng.1034>
47. Sharma SK, Mohan A (2006) Multidrug-resistant tuberculosis: a menace that threatens to destabilize tuberculosis control. *Chest* 130:261–272. <https://doi.org/10.1378/chest.130.1.261>
48. Olofsson SK, Geli P, Andersson DI, Cars O (2005) Pharmacodynamic model to describe the concentration-dependent selection of cefotaxime-resistant *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:5081–5091. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.12.5081-5091.2005>
49. Kohanski MA, DePristo MA, Collins JJ (2010) Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell* 37:311–320. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.003>
50. Alekshun MN, Levy SB (2007) Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 128:1037–1050. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.004>
51. Zhang Q, Lambert G, Liao D, Kim H, Robin K, Tung C, Pourmand N, Austin RH (2011) Acceleration of emergence of bacterial antibiotic resistance in connected microenvironments. *Science* 333:1764–1767. <https://doi.org/10.1126/science.1208747>
52. Van den Bergh B, Swings T, Fauvart M, Michiels J (2018) Experimental Design, Population Dynamics, and Diversity in Microbial Experimental Evolution. *Microbiol Mol Biol Rev* 82:e00008-18. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00008-18>
53. Jeong H, Lee SJ, Kim P (2016) Procedure for Adaptive Laboratory Evolution of Microorganisms Using a Chemostat. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/54446>
54. Lenski RE (2017) Experimental evolution and the dynamics of adaptation and genome evolution in microbial populations. *ISME J* 11:2181–2194. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.69>
55. Baym M, Lieberman TD, Kelsic ED, Chait R, Gross R, Yelin I, Kishony R (2016) Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science* 353:1147–1151. <https://doi.org/10.1126/science.aag0822>
56. Huttner A, Bielicki J, Clements MN, Frimodt-Møller N, Muller AE, Paccaud J-P, Mouton JW (2020) Oral amoxicillin and amoxicillin–clavulanic acid: properties, indications and usage. *Clinical Microbiology and Infection* 26:871–879. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.11.028>
57. Jiménez-Belenguer A, Doménech E, Villagrà A, Fenollar A, Ferrús MA (2016) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated in newly-hatched chickens and effect of amoxicillin treatment during their growth. *Avian Pathology* 45:501–507. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1168515>
58. Papakonstantinou G, Bogner JR, Hofmeister F, Hehlmann R (1993) Cefotaxime desensitization. *Clin Investig* 71:165–167. <https://doi.org/10.1007/BF00180000>
59. Fu KP, Aswapokee P, Ho I, Matthijssen C, Neu HC (1979) Pharmacokinetics of cefotaxime. *Antimicrob Agents Chemother* 16:592–597. <https://doi.org/10.1128/AAC.16.5.592>
60. Pilmis B, Jiang O, Mizrahi A, Nguyen Van J-C, Lourtet-Hascoët J, Voisin O, Le Lorc'h E, Hubert S, Ménage E, Azria P, Borie M-F, Mahé A, Mourad J-J, Trabattoni E, Ganansia O, Zahar J-R, Le Monnier A (2021) No significant difference between ceftriaxone and cefotaxime in the emergence of antibiotic resistance in the gut microbiota of hospitalized patients: A pilot study. *Int J Infect Dis* 104:617–623. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.01.025>
61. Vinueza-Burgos C, Ortega-Paredes D, Narváez C, De Zutter L, Zurita J (2019) Characterization of cefotaxime resistant *Escherichia coli* isolated from broiler farms in Ecuador. *PLoS One* 14:e0207567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207567>
62. Casella T, Haenni M, Madela NK, Andrade LK de, Pradela LK, Andrade LN de, Darini AL da C, Madec J-Y, Nogueira MCL (2018) Extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolated from chickens and chicken meat in Brazil is associated with rare and complex resistance plasmids and pandemic ST lineages. *J Antimicrob Chemother* 73:3293–3297. <https://doi.org/10.1093/jac/dky335>
63. Loho T, Dharmayanti A (2015) Colistin: an antibiotic and its role in multiresistant Gram-negative infections. *Acta Med Indones* 47:157–168
64. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H (2015) Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin* 31:707–721. <https://doi.org/10.1185/03007995.2015.1018989>
65. El-Sayed Ahmed MAE-G, Zhong L-L, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian G-B (2020) Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). *Emerg Microbes Infect* 9:868–885. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1754133>

66. Apostolakos I, Piccirillo A (2018) A review on the current situation and challenges of colistin resistance in poultry production. *Avian Pathol* 47:546–558. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1524573>
67. Sasseville D (2010) Neomycin. *Dermatitis*® 21:3–7. <https://doi.org/10.2310/6620.2009.09073>
68. Han T, Zhang Q, Liu N, Wang J, Li Y, Huang X, Liu J, Wang J, Qu Z, Qi K (2020) Changes in antibiotic resistance of *Escherichia coli* during the broiler feeding cycle. *Poultry Science* 99:6983–6989. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.06.068>
69. Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ (2017) Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Frontiers in Veterinary Science* 4:
70. Bueno MS, Miñambres GG, Bongioanni A, Chattah AK, Aiassa V, Longhi MR, Garner C (2020) Exploring solid forms of oxytetracycline hydrochloride. *Int J Pharm* 585:119496. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119496>
71. Grossman TH (2016) Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6:a025387. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025387>
72. de Assis DCS, da Silva GR, Lanza IP, Ribeiro ACDSR, Lana ÂMQ, Lara LJC, de Figueiredo TC, Cançado S de V (2016) Evaluation of the Presence and Levels of Enrofloxacin, Ciprofloxacin, Sulfaquinoxaline and Oxytetracycline in Broiler Chickens after Drug Administration. *PLoS One* 11:e0166402. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166402>
73. Hassan MM, El Zowalaty ME, Lundkvist Å, Järhult JD, Khan Nayem MR, Tanzin AZ, Badsha MR, Khan SA, Ashour HM (2021) Residual antimicrobial agents in food originating from animals. *Trends Food Sci Technol* 111:141–150. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.075>
74. Pokrant E, Yévenes K, Trincado L, Terraza G, Galarce N, Maddaleno A, Martín BS, Lapierre L, Cornejo J (2021) Evaluation of Antibiotic Dissemination into the Environment and Untreated Animals, by Analysis of Oxytetracycline in Poultry Droppings and Litter. *Animals (Basel)* 11:853. <https://doi.org/10.3390/ani11030853>
75. Schwarz S, Kehrenberg C, Doublet B, Cloeckert A (2004) Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev* 28:519–542. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.04.001>
76. Shen J, Wu X, Hu D, Jiang H (2002) Pharmacokinetics of florfenicol in healthy and *Escherichia coli*-infected broiler chickens. *Research in Veterinary Science* 73:137–140. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(02\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00033-4)
77. Shen J, Hu D, Wu X, Coats JR (2003) Bioavailability and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens. *J Vet Pharmacol Ther* 26:337–341. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2003.00495.x>
78. Pei L-L, Yang W-Z, Fu J-Y, Liu M-X, Zhang T-T, Li D-B, Huang R-Y, Zhang L, Peng G-N, Shu G, Yuan Z-X, Lin J-C, Zhang W, Zhong Z-J, Zhao L, Fu H-L (2020) Synthesis, Characterization, and Pharmacodynamics Study of Enrofloxacin Mesylate. *Drug Des Devel Ther* 14:715–730. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S239307>
79. Slana M, Žigon D, Sollner-Dolenc M (2017) Enrofloxacin degradation in broiler chicken manure under field conditions and its residuals effects to the environment. *Environ Sci Pollut Res Int* 24:13722–13731. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8722-1>
80. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole | *Clinical Infectious Diseases* | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/cid/article/32/11/1608/464214>. Accessed 29 Jan 2022
81. Michałek K, Lechowicz M, Pastuszczyk M, Wojas-Pelc A (2015) The use of trimethoprim and sulfamethoxazole (TMP-SMX) in dermatology. *Folia Med Cracov* 55:35–41
82. Queralt J, Castells I (1985) Pharmacokinetics of sulfamethoxazole and trimethoprim association in hens. *Poult Sci* 64:2362–2367. <https://doi.org/10.3382/ps.0642362>
83. Lederer FL, Günther TJ, Raff J, Pollmann K (2011) *E. coli* filament formation induced by heterologous S-layer expression. *Bioeng Bugs* 2:178–181. <https://doi.org/10.4161/bbug.2.3.15418>
84. David E. S, Boulianne M, M. Logue C, R. McDougald L, Nair V, L. Suarez D (2020) Diseases of Poultry, 14. kiadás
85. Umair M, Mohsin M, Ali Q, Qamar MU, Raza S, Ali A, Guenther S, Schierack P (2019) Prevalence and Genetic Relatedness of Extended Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Among Humans, Cattle, and Poultry in Pakistan. *Microb Drug Resist* 25:1374–1381. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0450>
86. Mellata M (2013) Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog Dis* 10:916–932. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1533>
87. Liu CM, Stegger M, Aziz M, Johnson TJ, Waits K, Nordstrom L, Gauld L, Weaver B, Rolland D, Statham S, Horwinski J, Sariya S, Davis GS, Sokurenko E, Keim P, Johnson JR, Price LB (2018) *Escherichia coli* ST131-H22 as a Foodborne Uropathogen. *mBio* 9:e00470-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.00470-18>
88. Yang S-C, Lin C-H, Aljuffali IA, Fang J-Y (2017) Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch Microbiol* 199:811–825. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1393-y>



89. Mo SS, Sunde M, Ilag HK, Langsrud S, Heir E (2017) Transfer Potential of Plasmids Conferring Extended-Spectrum-Cephalosporin Resistance in *Escherichia coli* from Poultry. *Appl Environ Microbiol* 83:e00654-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00654-17>
90. Papoušková A, Čížek A (2020) A complex approach to a complex problem: the use of whole-genome sequencing in monitoring avian-pathogenic *Escherichia coli* – a review. *Acta Vet Brno* 89:273–282. <https://doi.org/10.2754/avb202089030273>
91. Massella E, Reid CJ, Cummins ML, Anantanawat K, Zingali T, Serraino A, Piva S, Giacometti F, Djordjevic SP (2020) Snapshot Study of Whole Genome Sequences of *Escherichia coli* from Healthy Companion Animals, Livestock, Wildlife, Humans and Food in Italy. *Antibiotics* 9:782. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110782>
92. Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J (2018) Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clinical Microbiology and Infection* 24:355–360. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.001>
93. Behjati S, Tarpey PS (2013) What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 98:236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
94. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M (2012) Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J Biomed Biotechnol* 2012:251364. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
95. Morganti S, Tarantino P, Ferraro E, D'Amico P, Viale G, Trapani D, Duso BA, Curigliano G (2019) Complexity of genome sequencing and reporting: Next generation sequencing (NGS) technologies and implementation of precision medicine in real life. *Crit Rev Oncol Hematol* 133:171–182. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.11.008>
96. Salgotra RK, Bhat JA (2022) Efficient High-throughput Techniques for the Analysis of Disease- Resistant Plant Varieties and Detection of Food Adulteration. *Curr Protein Pept Sci* 23:20–32. <https://doi.org/10.2174/1389203723666211223111238>
97. Sattar SA, Taylor YE, Paquette M, Rubino J (1996) In-hospital evaluation of 7.5% hydrogen peroxide as a disinfectant for flexible endoscopes. *Can J Infect Control* 11:51–54
98. Rutala WA, Weber DJ (1999) Disinfection of endoscopes: review of new chemical sterilants used for high-level disinfection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20:69–76. <https://doi.org/10.1086/501544>
99. *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers - 25922 | ATCC. <https://www.atcc.org/products/25922>. Accessed 8 Sep 2022
100. Melvin P (2018) CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11. th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
101. MIC EUCAST. <https://mic.eucast.org/search/> Accessed 8 Sep 2022
102. Sahin-Tóth J, Kovács E, Tóthpál A, Juhász J, Forró B, Bányai K, Havril K, Horváth A, Ghidán Á, Dobay O (2021) Whole genome sequencing of coagulase positive staphylococci from a dog-and-owner screening survey. *PLoS One* 16:e0245351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245351>
103. Muzzey D, Evans EA, Lieber C (2015) Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep* 3:158–165. <https://doi.org/10.1007/s40142-015-0076-8>
104. Mihály Z, Györfly B (2011) Következő generációs szekvenálási technológiák kifejlődése és alkalmazásai = Next generation sequencing technologies (NGST) development and applications. *Orvosi Hetilap* 152:55–62
105. Andrews S (2012) FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Accessed 25 Apr 2022
106. Krueger F (2022) Trim Galore
107. Dinghua MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph | *Bioinformatics* | Oxford Academic. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/31/10/1674/177884>. Accessed 25 Apr 2022
108. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G (2013) QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
109. Hyatt D, Chen G-L, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11:119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>
110. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen A-LV, Cheng AA, Liu S, Min SY, Miroshnichenko A, Tran H-K, Werfalli RE, Nasir JA, Oloni M, Speicher DJ, Florescu A, Singh B, Faltyn M, Hernandez-Koutoucheva A, Sharma AN, Bordeleau E, Pawlowski AC, Zubyk HL, Dooley D, Griffiths E, Maguire F, Winsor GL, Beiko RG, Brinkman FSL, Hsiao WWL, Domselaar GV, McArthur AG (2020) CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 48:D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
111. Johansson MHK, Bortolaia V, Tansirichaiya S, Aarestrup FM, Roberts AP, Petersen TN (2021) Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *J Antimicrob Chemother* 76:101–109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>

112. Krawczyk PS, Lipinski L, Dziembowski A (2018) PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. *Nucleic Acids Res* 46:e35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1321>
113. Roux S, Enault F, Hurwitz BL, Sullivan MB (2015) VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data. *PeerJ* 3:e985. <https://doi.org/10.7717/peerj.985>
114. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A, Allesoe RL, Rebelo AR, Florensa AF, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender JK, Stingl K, Nguyen M, Coppens J, Xavier BB, Malhotra-Kumar S, Westh H, Pinholt M, Anjum MF, Duggett NA, Kempf I, Nykäsenoja S, Olkkola S, Wiczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S, Ragimbeau C, Lund O, Aarestrup FM (2020) ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* 75:3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
115. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
116. Zankari E, Allesøe R, Joensen KG, Cavaco LM, Lund O, Aarestrup FM (2017) PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother* 72:2764–2768. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx217>
117. Roer L, Tchesnokova V, Allesøe R, Muradova M, Chattopadhyay S, Ahrenfeldt J, Thomsen MCF, Lund O, Hansen F, Hammerum AM, Sokurenko E, Hasman H (2017) Development of a Web Tool for Escherichia coli Subtyping Based on fimH Alleles. *J Clin Microbiol* 55:2538–2543. <https://doi.org/10.1128/JCM.00737-17>
118. Roer L, Johannesen TB, Hansen F, Stegger M, Tchesnokova V, Sokurenko E, Garibay N, Allesøe R, Thomsen MCF, Lund O, Hasman H, Hammerum AM (2018) CHTyper, a Web Tool for Subtyping of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Based on the fumC and fimH Alleles. *Journal of Clinical Microbiology* 56:e00063-18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00063-18>
119. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, Aarestrup FM (2014) Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic Escherichia coli. *J Clin Microbiol* 52:1501–1510. <https://doi.org/10.1128/JCM.03617-13>
120. Clausen PTL, Aarestrup FM, Lund O (2018) Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics* 19:307. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2336-6>
121. Fang J-Q, Ou Q, Pan J, Fang J, Zhang D-Y, Qiu M-Q, Li Y-Q, Wang X-H, Yang X-Y, Chi Z, Gao W, Guo J-P, Miethke T, Pan J-P (2021) TcpC inhibits toll-like receptor signaling pathway by serving as an E3 ubiquitin ligase that promotes degradation of myeloid differentiation factor 88. *PLoS Pathog* 17:e1009481. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009481>
122. Shaaly A, Kalamorz F, Gebhard S, Cook GM (2013) Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase confers low-level resistance to bacitracin in Enterococcus faecalis. *J Antimicrob Chemother* 68:1583–1593. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt048>
123. Elizabeth R, Baishya S, Kalita B, Wangkheimayum J, Choudhury MD, Chanda DD, Bhattacharjee A (2022) Colistin exposure enhances expression of eptB in colistin-resistant Escherichia coli co-harboring mcr-1. *Sci Rep* 12:1348. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05435-0>
124. Gunn JS, Lim KB, Krueger J, Kim K, Guo L, Hackett M, Miller SI (1998) PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol* 27:1171–1182. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00757.x>
125. Delgado MA, Vincent PA, Fariás RN, Salomón RA (2005) YojI of Escherichia coli functions as a microcin J25 efflux pump. *J Bacteriol* 187:3465–3470. <https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3465-3470.2005>
126. Jacoby GA (2009) AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22:161–182, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
127. Bonomo RA (2017)  $\beta$ -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7:a025239. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025239>
128. Nakano R, Okamoto R, Nakano Y, Kaneko K, Okitsu N, Hosaka Y, Inoue M (2004) CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC beta-lactamase with an ampR gene originating from Citrobacter freundii. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1151–1158. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1151-1158.2004>
129. Guérin F, Isnard C, Cattoir V, Giard JC (2015) Complex Regulation Pathways of AmpC-Mediated  $\beta$ -Lactam Resistance in Enterobacter cloacae Complex. *Antimicrob Agents Chemother* 59:7753–7761. <https://doi.org/10.1128/AAC.01729-15>
130. Händel N, Schuurmans JM, Brul S, ter Kuile BH (2013) Compensation of the metabolic costs of antibiotic resistance by physiological adaptation in Escherichia coli. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3752–3762. <https://doi.org/10.1128/AAC.02096-12>

## **10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönettel tartozom dr. Jerzsele Ákosnak, aki lehetővé tette a kutatás megvalósulását. Továbbá témavezetőmnek, dr. Kerek Ádámnak, aki minden felmerülő kérdésben segített. Dr. Bányai Krisztiánnak és dr. Kaszab Eszternek köszönöm a DNS-szekvenálásban és bioinformatikai elemzésben nyújtott segítségét. Nem utolsó sorban pedig a laborban segédkező dolgozók és évfolyamtársaim segítségét.

*Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-21-2-I-ÁTE-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.*

## Témavezetői nyilatkozat

Alulírott **Dr. Kerek Ádám**, mint témavezető nyilatkozom, hogy **Török Bence** állatorvostan-hallgató „*Microbial Evolution and Growth Arena (MEGA-plate)*, gyorsított evolúciós és koszelekciós vizsgálatok *Escherichia coli* törzssel, kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) termelésre” c. dolgozata részt vehet az Állatorvostudományi Egyetem 2022. évi Tudományos Diákköri Konferenciáján.

Budapest, 2022. október hó 10. nap.



Dr. Kerek Ádám  
témavezető



## Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: **Török Bence**.....Neptun-kódja: **JMG0K2**.....A témavezető neve és beosztása: **Dr. Kerek Ádám, tanszéki állatorvos, PhD-hallgató**.....Tanszék: **Gyógyszertani és Méregtani Tanszék**.....A diplomadolgozat címe: **Microbial Evolution and Growth Arena (MEGA-plate), gyorsított evolúciós és koszelektációs vizsgálatok Escherichia coli törzssel, kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) termelésre**.....

## Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2022	03	03	Bakteriumtörzs kiválasztása, időpontok	
2.	2022	03	24	Változtatások a kutatási területen	
3.	2022	04	22	Szükséges eszközök beszerzése, próba	
4.	2022	04	29	Első próba eredmény kiértékelése	
5.	2022	05	11	Változtatások a kivitelezésben az összes antibiotikumokra vonatkozóan	

Érdemjegy az első félév végén: **Jóles (5)**.....

## Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2022	08	30	Munkaterv a félévre, következő konzultációk	
2.	2022	09	07	Sorozat követéskor antibiotikum stabilitása, beférkőzés ellenőrzése	
3.	2022	09	28	Táblázatok, grafikonok előkészítése a TDK munkában	
4.	2022	10	11	Indoklás, Anyag és Műszer, Eddigi eredmények leírása, értékelése	
5.	2022	10	27	TDK - előadás, dia, felépítés, "házi előadás"	

Érdemjegy a második félév végén: **Jóles (5)**.....

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



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

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.

Hallgató aláírása: *[Handwritten signature]*

*[Handwritten signature]*  
.....  
témavezető aláírása

Tanszéki előadó aláírása: *[Handwritten signature]* Átvétel dátuma: *2023. 05. 23.*

## NYILATKOZAT

Alulírott Török Bence nyilatkozom, hogy diplomamunkám, melynek címe ***Microbial Evolution and Growth Arena (MEGA-plate), gyorsított evolúciós és koszelektációs vizsgálatok Escherichia coli törzssel, kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) termelésre*** tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik azonos című, a 2022. évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2023. 10. 23.



Török Bence