

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

**Baromfiból izolált *Escherichia coli* törzsek rezisztencia
ko-szelekciója a humán egészségügyben kritikus
fontosságú antibiotikumokkal szemben**



PhD értekezés

Dr. Kerek Ádám

Budapest

2024

Témavezetők és témabizottsági tagok

.....

Dr. Jerzsele Ákos

Egyetemi docens

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, Állatorvostudományi Egyetem

témavezető

.....

Dr. Bányai Krisztián

Tudományos főmunkatárs

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, Állatorvostudományi Egyetem

témavezető

.....

Dr. Kardos Gábor

Tudományos főmunkatárs, igazgató

Metagenomikai Intézet, Debreceni Egyetem

témabizottsági tag

.....

Dr. Tóth Ákos

Főtanácsos

Nemzeti Népegészségügyi Központ

témabizottsági tag

Készült 8 példányban. Ez a(z) sz. példány.

.....

Dr. Kerek Ádám

Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
1. ÖSSZEFOGLALÁS.....	6
2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	8
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
3.1. Az antimikrobiális rezisztencia mechanizmusai.....	9
3.2. Multirezisztencia gének.....	12
3.3. A β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulása	13
3.3.1. β -laktamázok.....	13
3.3.2. Kiterjedt-spektrumú β -laktamázok (ESBL).....	17
3.3.3. Egyéb rezisztencia mechanizmusok.....	19
3.4. A fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia kialakulása.....	19
3.5. A polimixinekkel szembeni rezisztencia kialakulása	22
3.6. Az AMEG B kategóriás hatóanyagok közegészségügyi jelentősége	25
3.7. Evolúciós és koszelekciós vizsgálati módszerek.....	27
3.8. Az antimikrobiális rezisztencia evolúciós mozgatórugói	29
4. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	32
4.1. MEGA-plate vizsgálati módszer	32
4.2. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok	36
4.3. Molekuláris genetikai vizsgálatok	37
4.4. <i>Escherichia coli</i> törzsek országos érzékenységi felmérése	41
4.5. ESBL termelő <i>Escherichia coli</i> törzsek országos felmérése	41
5. EREDMÉNYEK	43
5.1. Antimikrobiális génkészlet.....	43
5.2. MEGA-plate vizsgálatok eredményei	45
5.2.1. Amoxicillin fenotípusos eredmények	45
5.2.2. Amoxicillin genotípusos eredmények.....	46

5.2.3.	Cefotaxim fenotípusos eredmények.....	50
5.2.4.	Cefotaxim genotípusos eredmények.....	50
5.2.5.	Florfenikol fenotípusos eredmények	54
5.2.6.	Florfenikol genotípusos eredmények	54
5.2.7.	Enrofloxacin fenotípusos eredmények	58
5.2.8.	Enrofloxacin genotípusos eredmények	59
5.2.9.	Kolisztin fenotípusos eredmények	62
5.2.10.	Kolisztin genotípusos eredmények	63
5.2.11.	Potenciált szulfonamid fenotípusos eredmények	65
5.2.12.	Potenciált szulfonamid genotípusos eredmények	66
5.3.	Az <i>Escherichia coli</i> törzsek országos antibiotikum érzékenysége	70
5.4.	Az <i>Escherichia coli</i> törzsek ESBL termelésért felelős génkészlete	75
6.	MEGBESZÉLÉS.....	79
7.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	91
8.	IRODALOMJEGYZÉK.....	92
9.	A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSEI	112
9.1.	Lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban.....	112
9.2.	Lektorált, impakt faktorral nem bíró tudományos folyóiratban	113
9.3.	Konferencia prezentációk	113
9.4.	A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények	114
9.5.	TDK és diplomamunka témavezetés	116
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	119

Rövidítések jegyzéke

AMEG	<i>Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group</i> (Antimikrobiális Ad Hoc Szakértői Csoport)
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ARG	<i>Antimicrobial resistance gene</i> (Antimikrobiális rezisztencia gén)
ATP	Adenozin--trifoszfát
CA-MHB	Kation kiegyenlített Müller-Hinton leves
CARD	<i>The Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i> (Telepformáló egység)
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Európai Gyógyszerügynökség)
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamases</i> (Kiterjedt spektrumú β -laktamáz)
EUCAST	<i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ExPEC	Extraintesztinális fertőzést okozó <i>E. coli</i>
GBP	<i>General Bacterial Porin</i>
HGT	Horizontális géntranszfer
ANI	<i>Average Nucleotide Identity</i>
IRT	<i>Inhibitor-resistant TEM</i>
MATE	<i>Multidrug and toxic compound extrusion</i>
MDR	Multidrug resistant (Multirezisztens)
MEGA	<i>Microbial Evolution and Growth Arena</i>
MFS	Major facilitator szupercsalád
MGE	Mobilis genetikai elem
MHB	Müller-Hinton leves

MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (Minimális gátló koncentráció)
MRSA	Meticillin-rezisztens <i>Staphylococcus aureus</i>
OXA	Oxacillináz
PBP	<i>Penicillin binding-protein</i> (Penicillinkötő fehérje)
PDR	<i>Pandrug Resistant</i> (Pánrezisztens)
RND	<i>Resistance-nodulation-division</i>
SNP	Egy pontos nukleotid polimorfizmus
SMR	<i>Small multidrug resistance</i>
SHV	<i>Sulfhydryl variable</i>
TSB	Tripton-szója leves
XDR	<i>Extensively drug resistant</i> (Kiterjedt gyógyszerrezisztens)

1. Összefoglalás

Az antimikrobiális rezisztencia a 21. század egyik kiemelkedő jelentőségű globális problémája lett. Az állat- és a közegészségügy területén közös gondolkodásra, az Egy Egészség elv alkalmazására van szükség. Az antibiotikumok felelős használata közös érdekünk, a rezisztencia kialakulásának és az antibiotikumok használatának hatásait megalapozott kutatási eredményekre kell építeni. A különböző hatóanyagok stressz indukálta szelekciós nyomást gyakorolhatnak a baktériumokra, ami különböző mutációk kialakulásához vezethet. Célul tűztük ki, hogy az egyes hatóanyagok közötti keresztrezisztencia kapcsolatát vizsgáljuk evolúciós és koszelekciós *in vitro* módszerekkel. Ezen kívül felmértük a hazai nagylétszámú házityúk és pulyka állományokból izolált *Escherichia coli* törzsek állat- és közegészségügyi jelentőséggel bíró hatóanyagokkal szembeni érzékenységét, valamint vizsgáltuk β -laktamáz és kiterjedt spektrumú β -laktamáz (ESBL) termelését és azok közegészségügyi jelentőségét.

A *Microbial Evolution and Growth Arena* (MEGA) plate egy olyan *in vitro* kísérleti evolúciós és szelekciós vizsgálatokra alkalmas rendszer, amelyben a hatóanyagok növekvő koncentrációjának kitett mikroorganizmusok hosszútávú vizsgálatára van lehetőség. A rendszer lehetővé teszi, hogy az evolúciós és koszelekciós folyamatok a baktérium többszöri átoltása nélkül egy zárt rendszerben vizsgálhatóak legyenek. A rezisztens mutáns törzsek sztochasztikusan keletkeznek, ami kiegyensúlyozottabb populációdinamikát tesz lehetővé. A kialakult rezisztens vonalakból történt mintavételt követően azok fenotípusos és genotípusos változásai is nyomon követhetőek.

A fenotípusos rezisztencia kifejeződését a hatóanyag önmagára és azok más hatóanyagokra gyakorolt hatásának kontextusában minimális gátló koncentráció (MIC) érték meghatározással végeztük hatféle hatóanyagra. Amoxicillin jelenlétében történő passzálás esetén a β -laktám hatóanyagok MIC-értékének növekedése mellett a 100 \times és 1000 \times hatóanyag koncentráció hatására jelentős MIC-érték növekedés volt megfigyelhető enrofloxacin, neomicin és potenciált szulfonamid hatóanyagokra is, azonban az oxitetracliklin és a florfenikol esetén ez nem következett be. A cefotaxim jelenlétében történő passzálás már 10 \times koncentrációban a legtöbb, 100 \times koncentrációban pedig az összes vizsgált hatóanyag MIC-értékét megnövelte. Florfenikol esetén csak a kolisztin és a neomicin hatóanyagokat nem befolyásolta a hatóanyag indukálta stressz. Enrofloxacin esetén azonban csak az 1000 \times koncentrációnak volt megfigyelhető hatása az összes vizsgált hatóanyag MIC-értékére. A kolisztin ugyanakkor nem befolyásolta más hatóanyagok MIC-értékét, a potenciált szulfonamid (trimetoprim-szulfametoxazol 1:19 arányban) már 10 \times koncentrációban az összes hatóanyag MIC-értékét megnövelte. A fenotípusos ESBL vizsgálati eredmények minden esetben negatívak lettek.

A genomikai vizsgálatok során mindegyik mintában ugyanazt a 44-féle antimikrobiális rezisztencia gént azonosítottuk. Az antimikrobiális rezisztencia kialakításáért felelős rezisztencia génekben bekövetkezett mutációk közül ki kell emelni amoxicillin esetén az *ampC* gén pontmutációját, ami enzimatikus úton a β -laktám hatóanyagok lebontásáért felel. Cefotaxim esetén jóval komplexebb mutációk következtek be az *ampC* gén promóterében. Enrofloxacin esetén a *parC*, a *parA* és a *gyrA* génekben bekövetkező mutációk okozhatták a hatóanyag MIC-érték növekedését. Kolisztin esetén az *ftsI* gén és *ompC* gén mutációját figyeltük meg, ami megnövekedett kolisztin MIC-értékekhez vezetett. Potenciált szulfonamid esetén a *folP* és a *folA* gének mutációjával magyarázható a fenotípusos rezisztencia megjelenése. A más hatóanyagok MIC-értékeinek változását három efflux pumparendszerben bekövetkező pontmutációk okozhatták. Ezek az *acrAB-toIC*, az *mdtABC-toIC* és az *emrAB-toIC* pumparendszerek. Nem csak közvetlenül a génekben, hanem az azok működését szabályozó regulátor génekben (*acrR*, *emrR*, *marR*, *mdtM*, *rpbA*) is sikerült pontmutációkat azonosítanunk. A mutációs ráta tekintetében a cefalosporinok és a potenciált szulfonamidok esetében fennáll a lehetősége, hogy olyan hatóanyagokról van szó, amelyek ún. hipermutátorként funkcionálnak, ugyanis a többi hatóanyaghoz képest ezeknél jelentősen több és többféle mutáció következett be, különösen a 100x és 1000x koncentrációk hatására.

Az országos mintagyűjtés során 411, háziyúkból izolált *E. coli* érzékenységi profilját határoztuk meg állat- és közegészségügyi jelentőséggel bíró hatóanyagokra. A kritikusan fontos hatóanyagok közül ceftriaxonra 24%-os, enrofloxacinra 53%-os és kolisztinre 27%-os rezisztenciát mutattunk ki. Ugyanezt a vizsgálatot 470 pulykából izolált törzsön elvégezve ceftriaxonra 24%-os, enrofloxacinra 63%-os és kolisztinre 27%-os rezisztenciát tapasztaltunk. A 881 törzs fenotípusos előszűrését követően, a multirezisztensnek bizonyult 420 törzsnek vizsgáltuk a β -laktamáz és ESBL termelését. Az összes törzs 36%-a bizonyult β -laktamáz termelőnek, míg a törzsek 6%-a ESBL termelőnek, továbbá a 420 törzs 26,7%-a feltételezhetően kiterjedt gyógyszerrezisztens törzs, a törzsek 2,9%-a pedig pánrezisztens volt.

A fenotípusos vizsgálati eredmények alapján előszűrt 253 *E. coli* törzs genomikai vizsgálatát követően a törzsek 8,3%-a esetén azonosítottuk *ampC* gén jelenlétét, 75,1% esetében pedig ESBL termelésért felelős gén jelenlétét figyeltük meg. Továbbá a szekvenált törzsek 81%-ában fordult elő *EC*-típusú β -laktamáz termelésért felelős gén.

Vizsgálati eredményeink alátámasztják az evolúciós és koszelekciós vizsgálatok létjogosultságát, hiszen ezek segítségével a rezisztencia kialakulásának mélyrehatóbb, összefüggéseiben történő vizsgálatait is el tudjuk végezni. Továbbá a fenotípusos és genotípusos vizsgálat eredményei indokolják a rendszeresen végzett felmérések szükségét.

2. Bevezetés és célkitűzés

Az antimikrobiális rezisztencia a 21. század egyik legjelentősebb globális problémájává vált, amely mind az állategészségügy, mind a közegészségügy területén komoly kihívásokat jelent. Az Egy Egészség elvének alkalmazása elengedhetetlen annak érdekében, hogy hatékonyan kezeljük ezt a kérdést. Az antibiotikumok felelős használata közös érdekünk, és a rezisztencia kialakulásának megelőzésére irányuló kutatásokat megalapozott tudományos eredményekre kell helyezni.

A különböző hatóanyagok indukálta stressz szelekciós nyomást fejt ki, ami mutációk kialakulásához vezethet a baktériumokban, ez pedig az antimikrobiális rezisztencia további terjedéséhez vezet. Kutatásunk célja, hogy megvizsgáljuk az egyes hatóanyagok közötti keresztrezisztencia lehetőségét, evolúciós és koszelekciós *in vitro* módszerekkel. Emellett felmértük a hazai nagylétszámú háziállatok és pulyka állományokból izolált kommenzalista *E. coli* törzsek érzékenységét az állat- és közegészségügyi szempontból jelentős hatóanyagokkal szemben, és vizsgáltuk azok β -laktamáz és ESBL termelését, valamint ezek közegészségügyi jelentőségét.

A MEGA-plate egy olyan *in vitro* kísérleti evolúciós és koszelekciós rendszer, amely lehetővé teszi a mikroorganizmusok hosszú távú vizsgálatát növekvő hatóanyag koncentrációk mellett. Ez a rendszer lehetőséget biztosít arra, hogy az evolúciós és koszelekciós folyamatokat egy zárt környezetben, a baktériumok többszöri átoltása nélkül vizsgáljuk. A rezisztens mutáns törzsek kialakulása kiegyensúlyozottabb populációdinamikát eredményez, és a fenotípusos és genotípusos változások is nyomon követhetőek.

Kutatásunk során a fenotípusos rezisztencia kifejeződését hat különböző hatóanyagra minimális gátló koncentráció (MIC) érték meghatározásával vizsgáltuk. Emellett genomikai vizsgálatokat is végeztünk, amelyek során az antimikrobiális rezisztenciáért felelős génekben bekövetkezett mutációkat azonosítottuk. Az országos szinten gyűjtött baromfi eredetű *E. coli* törzsek érzékenységi profilját is meghatároztuk, különös tekintettel a kritikusan fontos hatóanyagokra, mint például a ceftriaxon, az enrofloxacin és a kolisztin.

Eredményeink alátámasztják az evolúciós és koszelekciós vizsgálatok fontosságát, mivel ezek segítségével mélyebb betekintést nyerhetünk a rezisztencia kialakulásának folyamataiba és összefüggéseibe. A fenotípusos és genotípusos vizsgálatok eredményei pedig kiemelik a rendszeres felmérések és monitoring vizsgálatok jelentőségét.

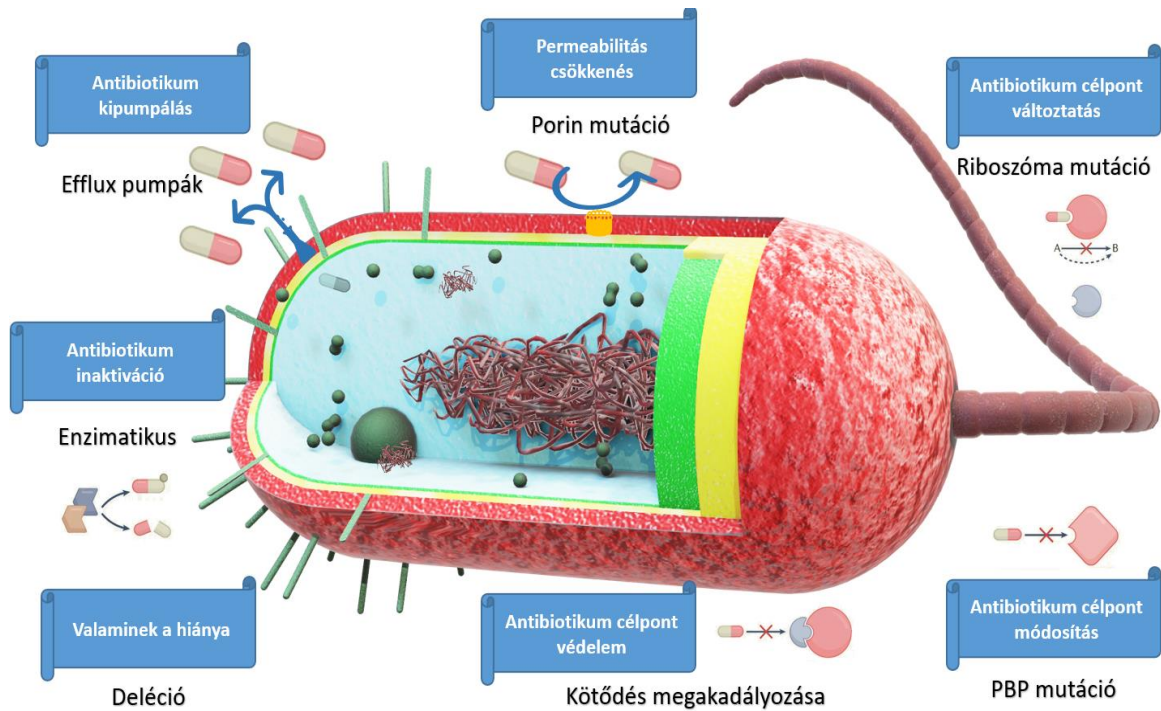
3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az antimikrobiális rezisztencia mechanizmusai

A környezetben bekövetkező mutációk gyakori előfordulását általában evolúciós vagy populációdinamikával összefüggő tényezők határozzák meg, ami antropogén hatások következtében fokozódhat [1]. Az AMR evolúciójának teljes megértéséhez a rezisztencia kialakulását a mikrobiális közösségek kontextusában szükséges tanulmányozni, hiszen azok összetétele és a kölcsönhatások befolyásolják a rezisztencia horizontális géntranszferét (HGT), valamint a fajok reakcióját és fejlődését az antibiotikum expozícióra [2, 3]. Természetes rezisztencia esetén megkülönböztetjük a belső rezisztenciát, ami mindig kifejeződik az adott fajban; valamint az indukált rezisztenciát, amely rezisztenciáért felelős gének természetes módon jelen vannak a baktériumban, azonban csak a mikroorganizmus antibiotikumnak való kitettsége esetén fejeződnek ki [4]. Az antibiotikumok használata elősegítheti a rezisztencia kialakulásáért felelős adaptív mutációk kialakulását, valamint a rezisztencia gének megszerzését [5]. A belső rezisztencia kialakulása mögött leggyakrabban a baktériumok külső membránjának permeabilitás csökkenése és az efflux pumpák természetes aktivitása áll, a multidrug-efflux pumpák ezek közül az indukált rezisztencia leggyakoribb mechanizmusai [6]. Az *Escherichia coli* (*E. coli*) baktérium törzsei például ilyen belső (*intrinsic*) rezisztenciával rendelkeznek a makrolid antibiotikum hatóanyagokkal szemben [7]. A szerzett rezisztencia kialakulhat a baktériumok közötti transzformáció, transzpozíció és konjugáció segítségével történő genetikai anyag megszerzése által, amit HGT-nek nevezünk; ez leggyakrabban plazmidok közvetítésével, ritkábban bakteriofágokon keresztül történik meg. Azonban bizonyos stresszorok (vegyületek, UV-sugárzás stb.) hatására gyakran genetikai mutációk (szubsztitúciók, deléciók stb.) következnek be. A baktériumok átlagos mutációs rátája 10^6 - 10^9 sejtosztódásra nézve 1, azonban többségük nem hasznos mutáció a sejtek életképességét tekintve [8], fenntartásuk gyakran jelentős energiaköltséggel járhat a baktérium anyagcseréjére nézve [9]. A rezisztencia általános evolúciós háttérében álló, pl. az ún. SOS box rendszer a későbbiek során részletes taglálásra kerül.

Az antimikrobiális rezisztencia mechanizmusokat (1. ábra) a *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) jelenlegi felosztása szerint tíz fő kategóriába sorolhatjuk, amelyek közül az egyik legfontosabb a hatóanyag enzimatis úton történő inaktiválása (*antibiotic inactivation*), amelynek során a kulcsszerepet játszó reaktív központ inaktiválása vagy a szerkezetben történő változás következik be, vagy a kovalens kötések módosítása által megakadályozza az antibiotikum, valamint a célpont összekapcsolódását [10]. A baktérium sejtfalának permeabilitás csökkenése (*reduced permeability to antibiotic*) során általában a porinszatórnák számának csökkenése révén alakul ki a rezisztencia; ezek

a porinccatornák felelnek a gyógyszermolekulák periplazmatikus részbe juttatásáért, de enzim és egyéb fehérje közvetlenül és közvetve is csökkentheti a sejtfal átjárhatóságát a gyógyszermolekula számára [11]. Az efflux pumpák segítségével történő sejtből való hatóanyag eltávolítás (*antibiotic efflux*) igen gyakori mechanizmusa a rezisztencia kialakításának [12], a hatóanyagok célpontjának módosítása (*antibiotic target alteration*) során a hatóanyag a DNS pontmutációi következtében alacsonyabb affinitással kötődik, a represszorok deaktivációja révén növekedhet az effluxpumpák kifejeződése, amelyek összességében jobb hatékonysággal képesek kipumpálni a sejtből a hatóanyagokat [13]. A hatóanyaggal szembeni célpontvédelem (*antibiotic target protection*) megvalósulhat a gyógyszer kötőhelyről történő eltávolításával, ami a kötőhely konformáció változtatásának a következménye, ennek következtében a gyógyszer szimplán disszociál a célponttól, vagy a kötődés létrejön ugyan, de helyreáll a sejt funkciója [14]. A hatóanyag célpontjának cseréje (*antibiotic target replacement*) vagy helyettesítése, olyan fehérjékkal történik, amelyeknek ugyanaz a funkciója, de eltérő a szerkezeti struktúrája; mint például a penicillin binding-protein (PBP), a meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsek esetén (PBP2) bekövetkező laterális géntranszfer eredményeként a sejtmembrán peptidoglikán-szintézise nem szenved zavart [15]. Egy gén deléciójának következtében is kialakulhat rezisztencia, ami általában a porinccatornák hiányához vezet (*resistance by absence*) [16], a hatóanyaggal való érintkezés indukálta sejt morfológiai változások okozta rezisztencia (*modification to cell morphology*) [17], bizonyos tápanyagok gazdaszervezettől történő felvétele (*resistance by host-dependent nutrient acquisition*) [18] és a célpontfehérjék túltermelése (*antibiotic target overexpression*) a ritkább rezisztencia mechanizmusok közé tartoznak [19].



1. ábra Az antimikrobiális rezisztencia fontosabb mechanizmusai *Escherichia coli* esetében

Az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) Antimikrobiális Ad Hoc Szakértői Csoportja (AMEG) 2019-ben, figyelembe véve az állatokban használt antibiotikumoknak a közegészségügyben megjelenő rezisztenciára gyakorolt hatását, azokat négy nagy csoportba sorolta be (1. táblázat). Az állategészségügyi felhasználásuk tekintetében az „AMEG A” kategóriába azok kerültek, amelyek használatát kerülni kell (*Avoid*), a közegészségügy számára tartalékolt életet mentő hatóanyagok tartoznak ide (pl. vankomicin, aztreonam, linezolid). Az „AMEG B” kategóriába kerültek a felhasználásukban korlátozandó (*Restrict*) hatóanyagok (pl. ceftiofur, enrofloxacin, kolisztin), az „AMEG C” kategóriába a második vonalbeli, megfontoltan használandó (*Caution*) hatóanyagok (pl. amikacin, florfenikol, tilozin), az „AMEG D” kategóriába pedig első vonalbeli szerként körültekintően használandó (*Prudence*) hatóanyagok (pl. amoxicillin, metronidazol, fuzidinsav) kerültek besorolásra [20]. A továbbiakban a közegészségügy szempontjából kritikus fontos, „AMEG B” kategóriába sorolt hatóanyag csoportokkal szembeni legfontosabb rezisztencia gének áttekintése következik.

1. táblázat Az Európai Gyógyszerügynökség (EMA) Antimikrobiális Szakértői Csoportja által kialakított AMEG kategóriákba sorolt fontosabb hatóanyagcsoportok és hatóanyagok. Kiemelt állapot és közegészségügyi jelentőséggel az AMEG B kategória.

A	Amdinopenicillinek	Karbapenemek	Glikopeptidek	Foszfomicin	AVOID
	Monobaktámok	Oxazolidonok	Gliciklinek	Mupirocin	
B	3-4. generációs cefalosporinok	Polimixinek	Fluorokinolonok		RESTRICT
C	Aminoglikozidok	Aminopenicillinek béta-laktamáz inhibitorokkal	Fenikolok	Makrolidok	CAUTION
	1-2. generációs cefalosporinok	Linkóزامidok	Pleuromutilinek	Rifamicinek	
D	Aminopenicillinek, béta-laktamáz inhibitorok nélkül	Spektinomycin	Szulfonamidok	Diaminopirimidinek	PRUDENCE
	Nitroimidazolok	Nitrofuránok	Fuzidinsav	Bacitracin	

3.2. Multirezisztencia gének

A leggyakoribb β -laktám, fluorokinolonok és peptid hatóanyagokkal szemben együttes rezisztencia kialakulásáért felelős ún. multirezisztens efflux pumpákat az *acr*, az *emr*, az *mdt* és a *mex* géncsaládok határozzák meg. Az *acrAB-toIC* efflux pumpa komplex egy igen széles körben elterjedt multirezisztenciáért felelős pumparendszer. Olyan háromkomponensű *resistance-nodulation-division* (RND) típusú transzmembrán fehérjekomplex, ami a citoplazmamembránon nem halad át, az *acrB* gén a belső sejtmembránon, a *toIC* gén a külső sejtmembránon és az *acrA* gén a periplazmában található fehérjerészét határozza meg a pumparendszernek [12, 21, 22]. A pumparendszer szabályozásában részt vevő regulátor gének közül az *acrR* gén a pumpa komponenseinek kifejeződését befolyásolja, a *marA* gén, a *robA* gén, a *soxS* gén és a *sdiA* gén pozitív transzkripciós faktorként fokozzák a pumpát meghatározó gének kifejeződését [23–26]. A *marR* egy olyan represszor gén, ami a *marA* gén kifejeződésének a szabályozásában vesz részt [26]. Ezen regulátor gének együttes hatása szabályozza az *acrAB-toIC* rendszer génjeinek kifejeződését, és ezáltal befolyásolja a multirezisztens efflux pumpa aktivitását. Az *ecrEF-toIC* hasonló homológ rendszerként működő pumparendszer [27].

Az *emrAB-toIC* egy fő facilitátor szupercsalád (MFS) típusú multirezisztens efflux pumparendszer, amely esetben az *emrB* egy membrán-transzporter, az *emrA* egy periplazmatikus fehérje, amely összeköti az *emrB*-t a *toIC* külső membrán csatornával, a *toIC* pedig egy külső membrán csatorna, amely lehetővé teszi az antibiotikumok sejtől való kipumpálását. Működését az *emrR*, a *marR* represszor gének és a *soxS*, *sdiA* indukátor gének szabályozzák [28]. Ehhez hasonló homológ rendszerként működik *E. coli* fajban az *emrKY-toIC* pumparendszer [29].

Az *mdtABC-toIC* egy RND-típusú multirezisztens efflux pumparendszer, amely esetében az *mdtA* membránfúziós fehérjeként összekapcsolja a belső és külső membránt, így létrehozva egy csatornát, amelyen keresztül az antibiotikumok áthaladhatnak, az *mdtB* és *mdtC* gének felelnek egy gyógyszertranszporter expressziójáért, ami a citoplazmából az antibiotikumokat az *mdtA* csatornába mozgatja, a *toIC* pedig külső membrán csatornaként lehetővé teszi az antibiotikumok számára, hogy elhagyják a baktérium sejtet [30].

A *mexAB-oprM* és *mexCD-oprJ* génkomplexek eredetileg *Pseudomonas aeruginosa* fajban megtalálható, azonban *E. coli* fajba átvihető multirezisztens efflux pumparendszerek [31]. A *mexA* egy membránfúziós fehérje, amely összekapcsolja a baktérium belső és külső membránját, így létrehozva egy csatornát, amelyen keresztül az antibiotikumok áthaladhatnak, a *mexB* egy belső membrán transzporter, amely a citoplazmából a *mexA* által kifejezett csatornába mozgatja az antibiotikumokat, az *oprM* pedig egy külső membrán csatorna, amely lehetővé teszi az antibiotikumok számára, hogy elhagyják a baktérium sejtet [31, 32]. Az előbbiekhöz hasonlóan a *mexC* membránfúziós fehérje, a *mexD* belső membrán transzporter és az *oprJ* külső membrán csatornaként funkcionál [31].

3.3. A β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia kialakulása

A β -laktám antibiotikumok esetén a legnagyobb gyakorlati jelentősége az enzimatis inaktivációnak, tehát a β -laktamáz enzimtermelésnek van [33]. Ezen enzimek közül az „AMEG B” kategóriába tartozó 3-4. generációs cefalosporinokkal szembeni inaktiváció következtében kialakuló rezisztencia kiemelt állat- és közegészségügyi jelentőséggel bír [20]. A β -laktám antibiotikumok esetén a kötőhely enzimatis úton történő inaktíválódása kovalens kötések módosítás révén alakul ki. Az antibiotikumok kötődése a sejtfal peptidoglikán szintézisének zavarát okozza, ami a sejtfal instabilitásához, majd a baktériumok széteséséhez vezet [10, 34].

3.3.1. β -laktamázok

A β -laktám antibiotikumokat bontó enzimeket kémiaiag három fő csoportba sorolhatjuk: beszélhetünk észterázokról, amelyek a cefalosporin hatóanyagok dihidrotiazin

gyűrűjének acetil-csoportját hidrolizálják; beszélhetünk acilázokról, amelyek a penicillin és cefalosporin hatóanyagok amid kötését módosítják; valamint klasszikus β -laktamázokról, amelyek irreverzibilisen képesek hidrolizálni a β -laktám gyűrű amid kötéseit [35, 36]. A hatóanyagok enzimek által történő lebontása vagy módosulása során a kulcsfontosságú reaktív központok inaktivációja vagy a szerkezetükben történő változás következik be. A kovalens kötések módosulhatnak O-foszforiláció, O-riboziláció, O-glikoziláció, O-nukleotidiláció, O- és N-acetiláció révén, ezáltal megakadályozva az antibiotikum célpontozó kapcsolódását [10]. Abraham már 1940-ben egy olyan enzimet írt le, amely képes lebontani a penicillint, a hatóanyag csoport után az enzimet penicillináznak nevezte [37]. Az első plazmid mediált β -laktamáz enzimet 1965-ben írták le, amelyet TEM-nek neveztek el arról a görög betegről (Temoniera), akiből először izolálták az azt hordozó baktériumot [36, 38]. Az antimikrobiális rezisztencia egyes mechanizmusainak megléte jóval régebbi, mint azt korábban gondolták. A β -laktamáz gének ősei például évmilliók óta megtalálhatók a plazmidokon, alaszakai permafroszt talajból izolált β -laktamáz géneket összehasonlítva napjainkból származó mintákkal, azok megváltozott szubsztráttartományú új β -laktamázok jelenlétét igazolják, ami szintén alátámasztja a folyamatos evolúciós és koszelektív hatást [39, 40]. A kiterjedt spektrumú β -laktamáz (ESBL) termelésért felelős gének a környezetben előforduló ún. Kluyvera törzsekből származnak, amelyek 1990-es évektől való kórházi megjelenésük és igen hatékony HGT-jük komoly aggodalomra ad okot a kiterjedt spektrumú cefalosporin hatóanyagok hidrolizációja miatt [41].

A β -laktamázok első átfogó csoportosítását 1989-ben Bush készítette el, ennek során a szubsztrát és inhibitor alapú csoportosítást molekuláris szerkezeti alapon próbálta meg kialakítani [42–44]. A ma is használatos csoportosítás alapja a Bush-Jacoby-Medeiros-féle funkcionális osztályozás és az Ambler-féle szerkezeti csoportosítás egyesítésével jött létre [45]. Az Ambler-féle osztályozás szerint négy szerkezeti osztályba (A, B, C, D) sorolják a β -laktamázokat [45] az alapján, hogy az aktív centrumban milyen, a hidrolízist katalizáló molekula található [36]. A penicillin és cefalosporin hatóanyagok esetén a hidrolitikus β -laktamáz inaktiváció terjedése világszerte egyre szélesebb körben megfigyelhető. Ez egyrészt egy kovalens köztiterméken keresztül acil-enzim intermediert képezve indukálja a PBP inaktiválás első lépését (A, C, D osztály), másrészt cink-ion segítségével egy vízmolekulát felhasználva a β -laktám kötés bontásához vezet (B osztály). A jelenlegi átfogó, funkcionális és molekuláris tulajdonságokat figyelembe vevő rendszer (Bush-Jacoby-Medeiros-féle osztályozás) négy csoportot különít el [36]. A továbbiakban ezen struktúra mentén, az Ambler-féle csoportosítást és az egyes célpont hatóanyag-csoportokat figyelembe véve tekintjük át a legfontosabb ismert rezisztenciáért felelős géneket, amit a **2. táblázat** foglal össze.

2. táblázat A β -laktamáz enzimek termeléséért felelős leggyakoribb gének korábbi molekuláris (MO) és szubsztrát alapú klasszifikációjának Bush-Jacoby szerinti felosztása

Bush-Jacoby csoport	MO	Elsődleges szubsztrát	IG	Legfontosabb gének
1	C	cefalosporinok	-	<i>ampC</i> , <i>P99</i> , <i>ACT-1</i> , <i>CMY-2</i> , <i>FOX-1</i> , <i>MIR-1</i>
1e				<i>GC1</i> , <i>CMY-37</i> , <i>EC</i>
2a	A	penicillinek	+	<i>PC1</i>
2b	A	penicillinek, cefalosporinok	+	<i>TEM-1</i> , <i>TEM-2</i> , <i>SHV-1</i>
2be	A	penicillinek, cefalosporinok, monobaktámok	+	<i>TEM-3-181</i> , <i>SHV-2-134</i> , <i>CTX-M-15</i> , <i>PER-1</i> , <i>VEB-1</i>
2br	A	penicillinek	-	<i>TEM-30-36</i> , <i>SHV-10</i> , <i>SHV-26</i> , <i>SGV-49</i>
2ber	A	cefalosporinok, monobaktámok	-	<i>TEM-50</i>
2c	A	penicillinek, karbenicillin	+	<i>PSE-1</i> , <i>CARB-3</i>
2ce	A	karbenicillin, cefapim	+	<i>RTG-4</i>
2d	D	penicillinek, kloxacillin	\pm	<i>OXA-1</i> , <i>OXA-10</i>
2de	D	cefalosporinok	\pm	<i>OXA-11</i> , <i>OXA-15</i>
2df	D	karbapenemek	\pm	<i>OXA-23</i> , <i>OXA-48</i>
2e	A	cefalosporinok	+	<i>cepA</i>
2f	A	karbapenemek	\pm	<i>KPC-2</i> , <i>IMI-1</i> , <i>SME-1</i>
3a	B	karbapenemek	-	<i>IMP-1</i> , <i>VIM-1</i> , <i>ccrA</i> , <i>IND-1</i>
3b	B		-	<i>cphA</i> , <i>sfh-1</i>
4	NM*	penicillinek	-	<i>chr</i> , <i>ND</i> , <i>ind</i> , <i>SAR-2</i>

MO – molekuláris osztály, IG – inhibitorok gátlása (+ gátol, \pm változó, - nem gátol), * nincs meghatározva

Az 1. csoportba az Ambler-féle „C” osztályba tartozó β -laktamázok sorolhatóak, amelyek kromoszómálisan hordozott cefalosporinázok és működésük nem gátolható klavulánsavval [45]. A leggyakrabban a csoportot képviselő kromoszómálisan és plazmidon található *ampC* gén [46] után *ampC*-típusú β -laktamázoknak nevezték el a csoportot [10]. *E. coli*-ban ezeknek klinikai szempontból kromoszómálisan van jelentőségük [47], elsőként 2004-ben Japánban írták le [48] a plazmidon található változatot [49]. *E. coli*-ban az *ampC1* és az *ampH* gének találhatóak meg [50]. Az *ampC* gén, bár nem számít ESBL génnek, azonban a β -laktamáz fokozott termelése miatt igen nagy a jelentősége és aggodalomra ad okot, hogy leírták a plazmidon történő hordozását is [51–54]. Ide tartoznak még a *MOX* gének, a *DHA* gének, a *FOX* gének, amelyek viszont ESBL termelésért felelősek [55–58].

A 2. csoportba az Ambler-féle „A” és „D” osztályba tartozó β -laktamázok sorolhatóak. Az „A” osztályba tartozó β -laktamázok világszerte széles körben elterjedtek, ezeket genetikailag a *TEM* vagy az *SHV* gének határozzák meg. A *TEM* gének expressziója a penicillinek és az első generációs cefalosporinok hidrolíziséért felel. A *TEM-1* gén *E. coli*

baktériumban az esetek 90%-ban felel az ampicillin rezisztenciáért [59]. Az *SHV* gének közül több esetben is leírták az *E. coli* baktériumban való előfordulásukat [60, 61]. A plazmidon található *CTX-M* gének nevüket onnan kapták, hogy expressziójuk elsősorban a cefotaxim hatóanyag hidrolízisét okozza, a legelső azonosított típusa a *CTX-M-1*, amit *E. coli*-ból izoláltak [62]. A cefalosporinokat inaktíváló enzimeket az „A” osztályba tartozó *TEM*, *SHV* [63, 64], *CTX-M* [62–64], *GES-5*, *KPC-2* [65, 66], *VEB-1* [67], *TLA-1* [68] és *PER-1* [69] gének határozzák meg, amelyek hidrolízis által inaktíválják a hatóanyagokat. Az első „A” osztályú karbapenemáz enzimet meghatározó gént (*GES-5*) *E. coli*-ban 2004-ben, Görögországban írták le [65], majd rá egy évre Izraelben a *KPC-2* gént plazmidon azonosították [66, 70]. A monobaktámokat inaktíváló gének közül az „A” osztályba tartoznak az egyéb *TEM* gének [71], a *GES-5*, *KPC-2* gének [65, 66, 69], a *VEB-1* gén [67], a *TLA-1* gén [68], a *PER-1* gén [69]. Az ESBL termelés tekintetében az „A” osztályba tartozó *TEM* gének a *TEM-3* altípustól kezdve határozzák meg az ESBL termelést [70–72]. A *sulfhydryl variable (SHV)* altípusok expressziójának számos esetében megfigyeltek ESBL termelést [59, 70], továbbá a *CTX-M* gének [70, 72–75], a *GES* és *KPC* gének esetén is [69]. A „D” osztályba az oxacillináz (*OXA*) gének tartoznak [10]. A gyakorlatban a *TEM* és az *SHV* gének együttes jelenléte és kifejeződése esetén beszélhetünk ESBL termelésről, amely például már a cefotaximot és a ceftazidimet is egyaránt inaktíválhatja [76]. A cefalosporinokat inaktíváló „D” osztályba tartozó gének közül az *OXA* [63, 77], az *LCR-1* [78] és az *LRA-13* [39] gének jelentősége emelhető ki. ESBL termelés szempontjából a „D” osztályból az *OXA-11*, *OXA-15*, *OXA-18* és *OXA-45* gének emelhetők ki [79–82]. Ezen kívül ESBL termelésért felelős géneként írták le a *VEB-1* gént, amelyet először egy vietnámi betegből izoláltak [67], a *TLA-1* gént, amit *E. coli*-ban egy mexikói beteg esetében izoláltak elsőként [68].

A 3. csoport az Ambler-féle „B” osztályba tartozó metallo- β -laktamázokat tartalmazza, amelyek a penicillineket, cefalosporinokat és a karbapenemeket is hidrolizálják. Nevüket onnan kapták, hogy az aktív centrumukban kétértékű kationt, jellemzően Zn^{2+} tartalmaznak és működésük kelátképző vegyületekkel, mint az etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) vagy a dipikolinsav, gátolható [83, 84]. A csoportból a cefalosporinokat inaktíváló gének közül a *BclI*, *CcrA* [85, 86], a *IMP-1*, *VIM-1* [67, 87], a *VIM-2* [69, 86], az *L1*, *FEZ-1*, *gob-1* [88] és az *NDM* gének jelentősége emelhető ki [63, 89–92]. A karbapenemázok közül *E. coli*-ban az *IMP-1*-et először Japánban írták le [87], Ausztráliában az *IMP-4*-et [93], a *VIM-1*-et pedig Görögországban írták le, amelyek mind plazmidon található gének [70, 94]. Meg kell említeni a *FEZ-1*, *gob-1*, *CAU-1*, *cphA* és *sfh-1* géneket, amelyek szintén karbapenem rezisztenciáért felelnek [88]. A monobaktámokat inaktíváló *BclI*, *CcrA* [85, 86, 95, 96] és a *VIM-2* [69, 86] gének jelentősége emelhető ki.

A 4. csoportba olyan penicillinázok tartoznak, amelyek nem gátolhatóak klavulánsavval, ilyenek a *Chr*, *ND*, *Ind*, *SAR-2*-típusú gének által termelt enzimek [45].

A β -laktamáz inhibitorokkal szemben a *TEM*-típusú gének között megjelentek a rezisztenciáért felelős gének is. Az alábbi *TEM*-típusok expressziója esetén írták ezt le, jelölésük inhibitor-resistant (IRT) előtaggal történik: *TEM-30-41*, *TEM-44-45*, *TEM-50-51*, *TEM-59*, *TEM-68*, *TEM-73-74*, *TEM-76-79*, *TEM-81-84* [59]. *E. coli* esetén ezeknek a *TEM*-variánsoknak az előfordulása igen gyakori [97]. Az *SHV* gének közül a *SHV-10* esetén bizonyították, hogy inhibitor rezisztenciáért felelős gén [98], a *CTX-M* újabb variánsai esetén szintén megerősítették ezt [99, 100], valamint a *GES* és *KPC*, a *PER-1* és a *VIM-2* gének esetén szintén megfigyelték [69].

3.3.2. Kiterjedt-spektrumú β -laktamázok (ESBL)

Az ESBL-ek olyan világszerte endémikussá vált Ambler A kategóriába tartozó szerin β -laktamázok, amelyek képesek hidrolizálni a szélesített spektrumú β -laktám antibiotikumokat, a β -laktámáz inhibitorokat, a cefalosporinokat és a monobaktámokat, azonban a karbapenemeket és a cefamicineket nem [101]. Az elmúlt években az ESBL enzimek evolúciója felgyorsult, a *TEM*, *CMY* és *SHV* típusú laktamáz gének mellett a 2000-es évek elején egy új, ellenállóbb variáns is kialakult, a *CTX-M* gén, mely már a legtöbb cefalosporin hatóanyaggal szemben képes rezisztenciát kialakítani. A *CTX-M* típusú gének főleg *E. coli*-ban rendkívüli jelentőségűek, hiszen kimutatták, hogy transzmisszibilis DNS-szakaszokon található, ami lehetővé teszi a horizontális génátadást [102]. A baromfiiparban felhasznált antibiotikumoknak kiemelt szerepe van a rezisztencia terjedésében, hiszen az egyik legdinamikusabban fejlődő, egységnyi idő alatt a legnagyobb mennyiségű állati eredetű fehérjét előállító iparág. Különösen aggasztó, hogy egy kutatás során a vizsgált brojlercsirkék 60%-ban sikerült kimutatni β -laktamáz termelésért felelős gént. Sertésekből és húsmarhákból is kimutatták a *SHV-12*, *CTX-M-2*, *CTX-M-14*, *CTX-M-15* és *CTX-M-44* géneket mind *E. coli* és *Klebsiella pneumoniae* esetén, melyek zoonotikus szerepe kiemelt jelentőségű [103]. A *CTX-M-27* abból a szempontból különösen nagy jelentőséggel bír, hogy nagyon hatékonyan képes lebontani a legtöbb cefalosporint és karbapenemet [104], a világon mára széleskörben elterjedt, és felfedezték már plazmidon hordozott változatát is [105, 106]. A hordozó mikrobák súlyos humán megbetegedést (húgyúti fertőzés, bakterémia) okozhatnak, különösen fontos az ember állatoktól való fertőződésének veszélye. Kimutatták házikedvencekből, kacsából, sertésből és legnagyobb gyakorisággal csirkéből, így kiemelten fontos közegészségügyi jelentősége az élelmiszeripar oldaláról van [107]. A magas prevalenciával rendelkező ESBL géneket, azok eredetét, és spektrumát a **3. táblázat** foglalja össze.

3. táblázat Magas prevalenciájú kiterjedt-spektrumú β -laktamáz termelő gének eredete

Gén	Első leírás	Faj	Spektrum	Forrás
<i>SHV</i>	Németország, 1983	Enterobacteriaceae	P, C, K	[108]
<i>TEM</i>	Görögország, 1965	Enterobacteriaceae	P, C, K, M	[109]
<i>CTX-M-1</i>	Németország, 1989	<i>E. coli</i>	C	[110]
<i>CTX-M-2</i>	Argentína, 1992	<i>E. coli</i>	C	[111]
<i>CTX-M-8</i>	Brazília, 1996	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	C	[112]
<i>CTX-M-9</i>	Spanyolország, 1994	<i>E. coli</i>	C	[113]
<i>CTX-M-25</i>	Kanada, 2000	<i>E. coli</i>	C	[114]
<i>OXA</i>	Törökország, 1991	<i>P. aeruginosa</i>	P, C	[77]
<i>PER</i>	Franciaország, 1991	<i>P. aeruginosa</i>	P, C, K, M	[115]
<i>VEB</i>	Franciaország, 1996	<i>E. coli</i>	C, M	[67]

E. coli – *Escherichia coli*; *P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*; P – penicillinek; C – cefalosporinok; K – karbapenemek; M - monobaktámok

Több eltérő telepről származó egészséges brojlercsirkéből egyéb ESBL géneket hordozó *E. coli* törzseket azonosítottak, ezek plazmidokon való hordozásuk veszélye a HGT-ben rejlik, hiszen átadhatók különböző fajok között is, mint pl. a *Salmonella enterica* és az *E. coli* [116]. A vadmadarak és galambok szerepe kiemelkedő lehet a multirezisztens (MDR) törzsek terjesztésében, a vizsgált galambok egynegyede hordozott MDR törzseket, vadmadarak vizsgálata során pedig több, mint 50%-ban találtak ESBL termelő *E. coli* törzseket [117]. Lovakban és társállatokban (kutyák és macskák) szintén azonosítottak ESBL termelő törzseket, amelyek hozzájárulnak a zoonózisos megbetegedések kialakulásához [118], bár ezek gyakorisága elmarad a madarak és gazdasági haszonállatokban azonosított esetekhez képest; hasonló a helyzet egyes, extraintesztinális fertőzést okozó *E. coli* (ExPEC) törzsek esetén is [119]. A humán patogén *Escherichia fergusonii* nagyon hasonlít az ExPEC törzsekre, amely szintén képes *CTX-M*, *SHV* és *TEM* gének hordozására és expressziójára, ami karbapenem és cefalosporin rezisztencia kialakulását eredményezheti [120]. Baromfiból és sertésből származó *E. coli* törzsek vizsgálata során kimutattak *CTX-M-1*, *CTX-M-9* és *CMY-2* géneket is, amelyek közül utóbbi kettő főleg baromfi, előbbi pedig főleg a sertés mintákban fordul elő nagyobb gyakorisággal. A baromfi eredetű minták jó része ExPEC-re jellemző géneket is hordoz [121]. Egy másik, finn kutatásban nyers baromfihúsból izoláltak *E. coli* törzseket, melyek 23%-a ExPEC törzs volt, ezek bizonyítottan képesek az emberben is emésztőcsatornán kívüli megbetegedést okozni, ám a vizsgálatban szereplő törzsek egyike sem volt rezisztens cefalosporinokra és ciprofloxacinra sem, csupán egy törzs esetén mutattak ki nalidixsav rezisztenciát [122].

3.3.3. Egyéb rezisztencia mechanizmusok

Az efflux pumpákat öt osztályba soroljuk, ezek az MFS, az *adenosine-triphosphate (ATP) -binding cassette (ABC)* család, az RND család, a small multidrug resistance (SMR) család és a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) család [123]. Az ABC család esetén az adenzin-trifoszfát (ATP) hidrolízise, az összes többi esetén egy proton- és egy nátriumkiáramlás biztosítja a mozgatóerőt [124], a Gram-negatív baktériumokban jellemzően az RND család fordul elő [125]. Az egyik leggyakoribb, korábban említett RND-típusú efflux pumparendszer részét képező *acrA*, *acrB* és *tolC* gének többek között a penicillinek rezisztenciájáért is felelősek [126]. Az *acrAB-tolC* gének együttesen egy olyan multidrug efflux pumpa fehérjekomplexet határoznak meg, amely széles szubsztrát-specifitással rendelkezik, mind a kationos, a semleges és az anionos szubsztrátokat is képes kipumpálni a sejtől, amelynek szerepe kiemelt az *E. coli* esetében [127–132].

A *General Bacterial Porin*-ok (GBP) közé olyan rezisztencia gének tartoznak, amelyek csökkentik a β -laktámokkal szembeni érzékenységet, olyan módon, hogy a porinfehérje mutációja, annak hiánya vagy az expressziójának elmaradása következik be. A *ompF* gén egy porin fehérjét határoz meg, aminek az expresszióját az antibiotikum jelenléte, mint stresszfaktor a MarA regulátor fehérje túltermelése révén csökkenti, ez egyben az *acrAB* efflux pumparendszer aktiválódását eredményezi [26, 133–136], a *soxS* gén hasonló elven működő regulátor géneként fordul elő *E. coli* törzsekben [24, 137, 138], és a *ramA* gén esetén is megfigyelték ugyanezeket a szabályozó folyamatokat [139]. Az OmpC porin fehérje [140] és az OmpA porin fehérje és a hasonló elven működő OmpF porin fehérje jelentőségét is leírták [141].

A PBP-k olyan transzpeptidáz fehérjék, melyek nélkülözhetetlenek a sejtfal szintéziséhez. A penicillinek ezekhez való kötődésükkel gátolják a sejtfal szintézisét, azonban számos mechanizmus vezethet ezen fehérjék megváltozása révén a rezisztencia kialakulásához. Az egyik ilyen klasszikus korábban említett példa az MRSA törzsekben laterális géntranszferrel kialakult eltérő szerkezetű PBP2, ami a béta-laktám antibiotikumok jelenlétében is képes a sejtfalalkotó peptidoglikán szintézisére [142–147], ezen mutáció kialakulásáért felelős *mrdA* gént [148, 149], valamint a PBP3 típusú mutációért felelős *ftsI* gént is megfigyelték *E. coli* törzsekben [150–152].

3.4. A fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia kialakulása

A fluorokinolonok hatásmechanizmusának alapja a baktériumok DNS-szintézisének és -replikációjának gátlása, a II-es típusú DNS-giráz és IV-es típusú DNS-tropoizomeráz működésének zavara által. A DNS-giráz enzim szerepe az ún. torziós feszültségek enyhítése, szupertekercsek DNS-szálakba vezetésével, amit a DNS megkettőződés

lezajlását követően a tropoizomeráz enzim felold. A fluorokinolonok ezen enzimek gátlása révén hatnak, tehát a hasítási ligáció aktív helyen komplexszel reverzibilis, nem kovalens kötődés révén gátolják a DNS-szál visszaépülését, ezzel leállítva a DNS-replikáció folyamatát. A DNS-szálak törései és az ezáltal kiváltott SOS-válasz együttesen eredményezi a fluorokinolonok baktericid hatásmódját [153, 154].

A fluorokinolonok mind az állati és emberi szervezetben való részbeni metabolizációja eredményeként a hatóanyagok jelentős hányada változatlan formában ürül a bélsárral, ami bejutva a szárazföldi és vízi ökoszisztémába elősegíti a rezisztencia kialakulását a különböző patogén baktérium populációkban, mivel a HGT növeli a patogén baktériumok génfelvételének kockázatát [155].

A fluorokinolonok 1987-es bevezetésekor még azt jósolták, hogy a velük szembeni rezisztencia kialakulása nem valószínű, mivel ahhoz legalább két mutáció együttes megjelenése szükséges. Ez az állítás igen hamar megdőlt, a giráz gének mutációi ma már igen széles körben előfordulnak, sőt az is bizonyítást nyert, hogy az aminoglikozid N-acetiltransferázok egyike képes egy szekunder aminot módosítani a fluorokinolon molekulákon, ami csökkent aktivitáshoz vezet [156–158]. A kinolonrezisztencia a nalidixsav klinikai felhasználásának bevezetése óta probléma, a ciprofloxacinnal széleskörű közegészségügyi felhasználása Pekingben már 1997-1999 között a kórházakban izolált *E. coli* törzsek körülbelül 60%-a esetén eredményezett rezisztenciát, de Kanadában 2015-2019 között szintén a rezisztencia folyamatos növekedéséről számoltak be [154, 159, 160]. A rezisztencia terjedéséhez olyan antropogén hatások is hozzájárulnak, mint a felbecsülhetetlen mennyiségben környezetbe kerülő xenobiotikumok. Ezt támasztja alá például a ciprofloxacinnal napi 50 kg mennyiségben történő folyóvizekbe jutása a közép-indiai Hyderabadban, ami csak egy kiragadott példa a világ más részein előforduló, nem jelentett szennyezések közül [161].

A fluorokinolonok hatásának ellensúlyozása érdekében a baktériumok különféle rezisztencia mechanizmusait alakították ki, ami elsősorban a kromoszómális mutációk, a citoplazmatikus koncentráció csökkentésével kapcsolatos mutációk és a sejteket megvédeni képes plazmid gének segítségével valósul meg [162]. A fluorokinolon antibiotikumok esetén *E. coli*-ban előforduló fontosabb rezisztencia géneket a **4. táblázat** foglalja össze.

4. táblázat Antimikrobiális rezisztenciát meghatározó gének fluorokinolonokkal szemben *E. coli*-ban

M	Gén	Funkció
1	<i>AAC(6')-Ib-cr</i>	Acilezés által módosítja a fluorokinolon és aminoglikozid hatóanyagok szerkezetét.
2	<i>gyrA</i>	A DNS kettős spirál csavarodási feszültségét szabályozó DNS-giráz alfa-, illetve béta-alegységéhez való fluorokinolon kötődés megakadályozása.
	<i>gyrB</i>	
	<i>parC</i>	A topoizomeráz IV DNS kettős csavarból származó feszültségoldásának megakadályozása, ezáltal a transzkripció és transláció gátlása.
	<i>parE</i>	
3	<i>qnrA</i>	Olyan fehérjét expresszál, ami a DNS-giráz és/vagy a topoizomeráz IV enzimekhez kötődve megakadályozza a fluorokinolonok kötődését.
	<i>qnrB</i>	
	<i>qnrS</i>	
4	<i>mdfA</i>	MFS-típusú multirezisztens effluxpumpát meghatározó gén.
	<i>norA</i>	MFS-típusú multirezisztens effluxpumpákat meghatározó, egymás strukturális homológ génjei.
	<i>norB</i>	
	<i>norC</i>	

M-Mechanizmus; 1-Enzimatis inaktiváció; 2-Célpont módosítás; 3-Célpont védelem; 4-Effluxpumpa

A fluorokinolon rezisztencia elsősorban a célzimeket meghatározó gének kromozómális elváltozásai és a efflux pumpák fokozott expressziója miatt alakul ki, amihez hozzájárul a plazmid közvetítette rezisztenciagének jelenléte [163]. Az *AAC(6')-Ib-cr* plazmidon leírt gén által meghatározott acetiltransferáz enzim termelése például a norfloxacin és a ciprofloxacin enzimatis bontását eredményezi [164–167]. Az *mdfA* gén által meghatározott efflux pumpa fluorokinolon rezisztenciát alakíthat ki *E. coli*-ban [168]. A *norA*, *norB* és *norC*, mint MFD-típusú efflux pumpák expresszióját szabályozó gének 4-8x MIC-érték növekedést eredményeznek [169].

A célpont módosítás során kialakuló rezisztenciáért a DNS kettős hélix széttekeréséért felelős DNS-giráz enzimet meghatározó *gyrA* gén pontmutációja felelős elsődlegesen, ami megakadályozza a fluorokinolonok kötődését a DNS-giráz alfa-alegységéhez, ezáltal hozzájárulva a rezisztencia kialakulásához [170–181]. A *parC* gén egy pontmutáció következtében megakadályozza az antibiotikum kötődését a topoizomeráz IV *parC* alegységéhez, ezzel kialakítva rezisztenciát. A *gyrB* és a *parE* gének pontmutációi sokkal ritkábban következnek be [162, 170, 182, 183].

A csökkent permeabilitás szintén meghatározó mechanizmus, hiszen a fluorokinolonoknak át kell jutni a Gram-negatív baktériumok külső sejtmembránján, hogy a célpontokhoz kötődhessenek. Ez ún. porin fehérje csatornákon keresztül lehetséges, azonban ezek szabályozásában szerepet játszó gének expressziója, mint az *ompA*, *ompC* és *ompF* szintén rezisztencia kialakulásához vezethetnek például *E. coli*-ban [162, 184].

A plazmid mediált *qnrA*, *qnrB* és *qnrS* gének olyan pentapeptid fehérjéket határoznak meg, amelyek ismétlődnek és ezáltal a DNS-t utánozva célpontvédelem útján megakadályozzák a fluorokinolon hatóanyagok DNS-károsító hatását [156, 185–187].

3.5. A polimixinekkel szembeni rezisztencia kialakulása

A polimixineket 1947-ben Koyoma fedezte fel Japánban, mint a *Paenibacillus polymyxa* subsp. *Colistinus* Gram-pozitív talajbaktérium másodlagos metabolitja [188]. A nem riboszómális, gyűrűs oligopeptidok szerkezetileg különálló osztálya, ami öt kémiaiilag különböző vegyületet foglal magában (A, B, C, D, E), jelenleg közülük a polimixin B és a kolisztin (polimixin E) érhető el [189]. Hatásmechanizmusa a Gram-negatív baktériumok külső membránjában található lipopoliszacharidokhoz és foszfolipidekhez való kötődés, amely kompetitív módon kiszorítja a membránlipidek foszfátcsoportjából a kétértékű kationokat (Mg^{2+} , Ca^{2+}), ami a külső sejtmembrán detergensszerű feloldásához vezet, így eredményezve sejthalált [190]. A sejtlyziszhez hozzájárul, hogy a külső membránon való áthaladást követően anionos foszfolipid vezikulákhoz kötődik a hatóanyag, ez a belső és külső membrán fúziójához vezet, ezzel foszfolipid vesztést kialakítva, ozmotikus egyensúlyzavarhoz vezetve [191]. A külső membrán fő funkciója a hatóanyaggal szembeni permeabilitási gát, ami a sejtfelszíni lipopoliszacharidok jelenlétével függ össze, amely gátolja a hidrofób, valamint a nagyméretű antibiotikumok külső membránon való bejutását. A lipopoliszacharid három domén része az O-antigén, a mag poliszacharid és konzervált lipid A, amely hidrofób horgonyként funkcionál. Ez utóbbi komponenssel való közvetlen kölcsönhatáson keresztül fejtik ki hatásukat a polimixinek [192–194]. A lipid A telített szénhidrogén láncait van der Waals kölcsönhatások kötik össze a külső membránban, a foszfoészterekhez való kapcsolódást pedig kétértékű magnézium (Mg^{2+}) és kalcium (Ca^{2+}) ionok hidalják át, ezzel stabilizálva a lipopoliszacharid molekulát [192]. Elsőként az 1950-es években a kolisztint alkalmazták intravénás készítményként multirezisztens Gram-negatív baktériumok okozta emésztőszervi- és húgyúti fertőzések kezelésére, továbbá szemészeti és fülészeti készítményekben, 1959-ben az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala engedélyezte Gram-negatív baktériumok okozta fertőzések kezelésében [195]. Állatgyógyászati felhasználása szintén több évtizedes múltra nyúlik vissza [196]. Közegészségügyi szempontból azonban a nemkívánatos nefrotoxikus és neurotoxikus hatásuk miatt és az új hatóanyagcsoportok felfedezése miatt az 1970-es években háttérbe szorult, jelentősége az olyan betegségek kezelésében maradt fent, mint a *Pseudomonas* fajok és az *Acinetobacter baumannii* okozta cisztás tüdőfibrózis és a multirezisztens vagy kiterjedt gyógyszerrezisztens (XDR) fertőzésekben, mint utolsó vonalbeli hatóanyag [197]. Az 1990-es évek közepétől az MDR és XDR fertőzések kezelésében szerepük újra felértékelődött, mint utolsó választási lehetőség [191]. Sokáig úgy gondolták, hogy vele szemben a rezisztencia csak kromozómális pontmutációk révén

alakulhat ki [198], azonban a közelmúltban állatokból, emberekből, élelmiszerekből és környezetből származó baktériumok esetén is kimutatták a plazmidon keresztüli *mcr* gének közvetítette kolisztinnel szembeni rezisztenciát [199]. Ez komoly aggodalomra adott okot a potenciálisan PDR törzsek kialakulása révén, különösen a közegészségügyet veszélyeztető, ezáltal kezelhetetlen fertőző betegségek kialakulása által [197].

A polimixinekkel szembeni rezisztencia egyik fő mechanizmusa a lipid A bioszintézis útvonalának inaktiválása, ami a külső membrán lipopoliszacharid rétegének változását eredményezi. A másik fő rezisztencia mechanizmust pedig a *pmrAB* kétkomponensű rendszer közvetíti [200]. A hatóanyagcsoporttal szemben kialakuló rezisztencia hatásmechanizmusa alapján ritka volt, azonban világszinten aggodalomra adott okot az elsőként mobilis genetikai elemként (MGE) azonosított kolisztin rezisztencia gén Kínában [201]. Eddig összesen tíz mobilis kolisztin rezisztencia (*mcr*) gént (5. táblázat) azonosítottak [202].

5. táblázat Eddig azonosított mobilis kolisztin rezisztencia gének és azok eredete

Gén	Baktérium faj	Minta (leírás)	Faj	Forrás
<i>mcr-1</i>	<i>Escherichia coli</i>	2011, Kína (2015)	Su, Ga	[201]
<i>mcr-2</i>	<i>Escherichia coli</i>	2016, Belgium (2016)	Bo, Su	[203]
<i>mcr-3</i>	<i>Escherichia coli</i>	2017, Kína (2017)	Su	[204]
<i>mcr-4</i>	<i>Salmonella</i> spp.	2013, Olaszország (2017)	Su	[205]
<i>mcr-5</i>	<i>Salmonella</i> Paratyphi	2011, Németország (2017)	Ga	[206]
<i>mcr-6</i>	<i>Moraxella pluranimalium</i>	2014, Nagy-Britannia (2017)	Su	[207]
<i>mcr-7</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2017, Kína (2018)	Ga	[208]
<i>mcr-8</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2018, Kína (2018)	Su, Ho	[209]
<i>mcr-9</i>	<i>Salmonella</i> Typhimurium	2010, USA (2019)	Ho	[198]
<i>mcr-10</i>	<i>Enterobacter roggenkampii</i>	2020, Kína (2020)	Ho	[210]

Bo – szarvasmarha; Su – sertés; Ga – baromfi; Ho – ember

Az *mcr-1* gén néhány év alatti globális elterjedése arra utal, hogy a kolisztin használata az állatgyógyászatban felgyorsította a rezisztencia terjedésének a folyamatát az állatok és emberek között, elsődleges forrásának ma a sertéságazatot tekintik [211]. Az *mcr* gének olyan foszfoetanol-amin-transzferáz enzimet határoznak meg, ami foszfoetanol-amin részek hozzákötődését eredményezi a lipopoliszacharid molekula lipid A részéhez, ezzel növelve annak kationos töltését, így csökkentve a kolisztin lipopoliszacharidhoz való kötődését [212]. *E. coli* esetén ez a kolisztin MIC-értékének 4-8x növekedéséhez vezet [213].

Az enzimikus inaktivációért felelős *bacA* és *pgpB* gének undekaprenil-foszfátáz enzimet expresszálnak, amely a glikán bioszintézise során a lipidek beépítéséért felel a baktériumok burkába, a peptid antibiotikumok ennek a termelődéséért felelős fehérjét célozzák, ezek a gének bacitracin rezisztencia kialakulásáért felelnek [214, 215]. *E. coli*-ban leírtak egy olyan pontmutációt, aminek következtében olyan *waaL* gén jött létre, aminek expressziója a sejtfelszínhez peptidoglikánokat rögzít, ezek megkötik a vankomicint, ezáltal hozzájárulva a rezisztencia kialakulásához [216–218].

E. coli fajban a permeabilitás csökkentés során a *eptA* gén expressziója módosítja a lipíd réteget, 4-amino-4-deoxi-L-arabinóz és foszfoetanolamin hozzáadásával, ezáltal csökkentve a sejtmembrán töltésének pozitív irányba való eltolódását, ami a polimyxinek kötődését csökkenti, így vezetve rezisztencia kialakulásához [219, 220]. A korábban leírt *mcr* gének szintén a lipíd réteget változtatják meg egy foszfoetanolamin hozzáadásával, ami a kolisztin sejtmembránhoz való kötődését gátolja a negatív töltések számának csökkentése révén [201, 203, 204, 221]. A GBP olyan porin csatornákat foglal magában, melyek a peptid antibiotikumokkal szemben csökkent érzékenységet mutatnak, ez bekövetkezhet a porin fehérje mutációja, vagy a porin fehérje hiánya, de magának a génexpresszióknak az elmaradása miatt is. Az *ompT* és *ompP* külső membrán proteázok *E. coli*-ban, olyan regulátorok, amik képesek csökkenteni a kationos peptid antibiotikumok hatékonyságát a porin csatornák mutációja révén [222, 223].

A polimixinekkel szembeni efflux pumpák tekintetében baktérium fajoként más és más gének szerepéről számoltak be. Ezek az úgynevezett érzékeny antimikrobiális peptid (sap) fehérjét meghatározó *brlR*, *acrAB-tolC* rendszer, vagy a *kpnEF*, az *mtrCDE*, a *vexAB* operonok, a *rosAB*, a *norM* gének. A sap fehérjék pedig a *sapABCDF* operonok által meghatározott ötféle fehérjéből épülnek fel [224, 225]. A *yojI* gén egy efflux pumpát határoz meg, ami képes *E. coli*-ban a peptid antibiotikumok kipumpálására a sejtből [226].

A kolisztinnel szemben ún. intrinsic rezisztenciával rendelkeznek az anaerob Gram-negatív coccusok, bizonyos *Aeromonas* fajok, a *Burkholderia cepacia*, a *Brucella* spp., a *Campylobacter* spp., a *Chromobacterium* spp., az *Edwardsiella* spp., a *Legionella* spp., a *Morganella morganii*, a *Neisseria* spp., a *Proteus* spp., a *Providencia* spp., a *Serratia marcescens* és a *Vibrio cholera* [191]. A humán gyógyászatban két formában érhető el, a kolisztin-szulfát per os és lokális használatra, a kolisztin-metánszulfonátot pedig prodrugként parenterális és porlasztásos készítményekben használják kevésbé toxikus tulajdonsága miatt. Az állatgyógyászatban a kolisztin-szulfát formát használják *E. coli* és *Salmonella* spp. okozta bélfertőzések, valamint *Pseudomonas aeruginosa* okozta otitis kezelésében [227]. A polimixin B azonban hatékonyan bizonyult *Staphylococcus aureus* [228], *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus agalactiae* [229] és *Listeria monocytogenes* ellen is [230]. A fontosabb rezisztencia géneket a **6. táblázat** foglalja össze.

6. táblázat Fontosabb rezisztencia gének peptid antibiotikum hatóanyagokkal szemben

M	Gén	Funkció
1	<i>bacA</i>	Az undecaprenyl pirofoszfát újrahasznosítás a sejtfal bioszintézisében.
	<i>pgpB</i> *	Lipid foszfatáz fehérjét határoz meg, ami részt vesz a foszfatidil-glicerin defoszfatázálásában, amely a baktériumok sejtmembránjának egyik fő alkotóeleme.
	<i>waaL</i>	Sejtfelszíni peptidoglikánok rögzítése.
2	<i>eptA</i> *	Két specifikus cukor, a 4-amino-4-deoxi-L-arabinozid és a foszfoszeteanolamint kapcsolja hozzá a lipid A-hoz, ami megváltoztatja annak szerkezetét és töltését, ez kevésbé negatív töltésű sejtmembránt eredményez, ami csökkent polimixin kötődést eredményez.
	<i>mcr-1-10</i> *	Plazmidon hordozott gének, expressziójuk a foszfoszeteanolamint a lipid A-hoz kapcsolja, ami megváltoztatja a molekula szerkezetét, és csökkenti a sejtmembrán negatív töltését. Ennek eredményeként a kolisztin kevésbé képes kötődni a lipid A-hoz.
	<i>ompT</i>	Expresszióját gátolja a <i>toxR</i> szabályozó gén, ezzel a porinacsatornák száma csökken.
	<i>ompP</i>	
3	<i>kpnEF</i> *	SMR-típusú effluxpumpa-rendszer.
	<i>norM</i>	MATE-típusú effluxpumpa.
	<i>mtrCDE</i>	Az <i>acrAB-toiC</i> rendszerrel homológ RND-típusú efflux pumparendszer.
	<i>rosAB</i>	MFS-típusú effluxpumpa-rendszer.
	<i>yojI</i>	ABC-típusú effluxpumpa.

M-Mechanizmus; 1-Enzimatis inaktiváció; 2-Permeabilitás csökkenés; 3-Effluxpumpa

* kifejezetten polimixinekkel szemben

3.6. Az AMEG B kategóriás hatóanyagok közegészségügyi jelentősége

Az EMA által az AMEG B kategóriába sorolt hatóanyagok az Egészségügyi Világszervezet (WHO) kritikusan fontos (CIA) csoportjába tartozó hatóanyagok. Ezeket az antimikrobiális szereket (3-4. generációs cefalosporinok, fluorokinolonok és polimixinek) csak kellő óvatossággal szabad használni, a közegészségügyi kockázatok minimalizálása érdekében. Tehát olyan esetben, ha nincs olyan C vagy D kategóriába tartozó antibiotikum, amelyek klinikailag hatásosak lennének, továbbá használatukat lehetőség szerint érzékenységi vizsgálatnak kell megelőznie [231]. 2022. január 28-án lépett hatályba az Európai Unió 2019/6 rendelete, aminek a célja, hogy olyan magas, minőségi, biztonsági és hatékonysági szabványokat állítson fel az állatgyógyászati készítmények használatára,

hogy az megfeleljen a köz- és állategészségügy, valamint a környezetvédelemmel kapcsolatos közös aggályoknak [232].

A cefalosporinok 3-4. generációjának élelmiszertermelő állatokban történő alkalmazásának kiemelt közegészségügyi jelentősége van a rezisztencia kialakulásában. Az American Medical Association (AMA), a Keep Antibiotic Working (KAW), az Infectious Diseases Society of America (IDSA) és az Union of Concerned Scientists (UCS) is bizonyítékokat szolgáltatott arra, hogy a cefkvinom felhasználása rezisztencia kialakulását eredményezi az élelmiszertermelő állatokban, ezen kórokozók pedig növelik a rezisztencia emberre való átvitelének kockázatát, ami komoly közegészségügyi kockázattal jár [233]. Az ESBL termelésért felelős gének komoly közegészségügyi kockázattal bírnak, hiszen a plazmidon hordozott gének viszonylag könnyen átvihetők az enterális baktériumokba. Az ilyen rezisztens baktériumokat a humán gyógyászatban karbapenemekkel lehet kezelni, azonban az ezzel szemben rezisztens baktériumokról nem csak Ázsiában, hanem már Európában is beszámoltak. A cefalosporin-használattal összefüggő ESBL-termelő törzsek felmérése az EU tagállamaiban is megtörtént, a legmagasabb arányt a csirkékben mutatták ki [234, 235].

A fluorokinolonok széleskörű humán- és állategészségügyi felhasználása a fertőző betegségekben a velük szembeni rezisztencia megnövekedéséhez vezetett, ami a nemzetközi hatóságokat cselekvési tervek kidolgozására sarkalta. Jelenleg a leggyakrabban felírt antimikrobiális szerek közé tartoznak [236]. Változatlan formában való ürülésük jelentős ökotoxikológiai kockázatot jelent, különösen a műtrágyaként használt zagyiszapon keresztül, de a halgazdaságban történő alkalmazásuk is jelentős ökológiai lábnyommal bír. A gyógyszergyártók szigorú szabályozása és ellenőrzése minimális kockázatot jelent, a betegek tulajdonában maradt fel nem használt gyógyszereket viszont nem lehet nyomon követni. Az állati eredetű élelmiszerekben található maradványok szintén veszélyeztethetik a fogyasztók egészségét, a hatóanyagokkal szembeni rezisztencia megjelenése révén [237–239].

A kolisztin a humán gyógyászatban az egyik legvégső antibiotikum választás a multirezisztens Gram-negatív Enterobacteriaceae család okozta fertőzések kezelésében. Hatékonyságának megőrzése különös jelentőséggel bír a súlyos emberi fertőzések kezelése során felértékelődött szerepe miatt, mivel kimutatták a vele szemben átvihető rezisztenciát biztosító *mcr* gének, valamint a rezisztens baktériumok terjedését a táplálékláncon keresztül. Az állategészségügyi felhasználásának visszaszorítására tett törekvéseket jól mutatja, hogy az EMA adatai alapján értékesítése 2011-2021 között 79,5%-os csökkenést mutatott az EU25 tagországa esetében [231].

Összességében a kritikusan fontos hatóanyagok közül a 3-4. generációs cefalosporinok eladása 2017-2021 között 19,9%-os, a fluorokinolonoké 8,5%-os, a polimixineké pedig 39,0%-os csökkenést mutatott élelmiszertermelő állatok esetében [231].

3.7. Evolúciós és koszelekciós vizsgálati módszerek

A kísérleti evolúció során olyan kutatási módszereket alkalmazunk, amely lehetőséget teremt az evolúciós folyamatok valós idejű tanulmányozására. A módszer alapja a populációk versenyzéssel történő alkalmazkodása a megváltozott környezeti feltételekhez. A legtöbb adaptáció kompromisszumok eredménye, azaz olyan tulajdonságok megváltozása, amelyek az adott környezetben megnövelik a mikroorganizmusok fitnessét [240]. Ezzel a módszerrel bizonyították például, hogy a baktériumok az antimikrobiális peptidekkel szemben képesek rezisztencia kialakítására [241]. Ennek szemléltetésére szolgál az a kutatás, ami *E. coli* citrát-hasznosításáért felelős mutáció kiváltását tűzte ki célul. Ehhez 31 000 generáció váltásra volt szükség, és a 12 alkalommal megismételt vizsgálat során csak egy alkalommal következett be ugyanez a változás [242]. Több évtizedig a kísérleti evolúció volt a vírusok és baktériumok okozta betegségek elleni élő attenuált vakcinák fejlesztésének módszere, aminek során a kórokozókat sorozatosan passzálták más gazdaállatban vagy táptalajon, amíg azok patogenitásának csökkenése be nem következett [243, 244]. A koevolúciós vizsgálat jelentése, hogy egy megfigyelt populáció génjei és azok által meghatározott tulajdonságok hatással vannak a faj bizonyos egyedeire, amely hatások az utódnemzedékekben is megfigyelhetőek lesznek majd. A mikroorganizmusokkal végzett vizsgálatok gyakran egy klónból indulnak ki [245, 246].

Az úgynevezett laboratóriumi evolúciós vizsgálatok (*ALE, Adaptive Laboratory Evolution*) megbízható, ellenőrzött körülmények között zajló evolúciós vizsgálatokat tesznek lehetővé, melyek molekuláris vizsgálatokkal jól kiegészíthetők [247]. Elsőként Brown és Oliver 1982-ben dolgozott ki egy rendszert, mely során etanollal szemben toleráns gombafajok előállítását sikerült kísérletes úton megvalósítaniuk, folyamatos szelekciós nyomás segítségével [248]. A módszer alapja egy olyan folyamatos környezeti stressz alkalmazása a mikrobákra nézve, ami szelekciós nyomásként hat a populációjukra. Ami lehet szélsőséges hőmérséklet, pH, vagy egy toxikus anyag. Ennek során a stresszfaktor fokozatos növelése következtében eléri a stressztűrő mutánsokra irányuló szelekciós nyomást. Kiemelt szempont a reprodukciós képesség megtartása, hogy a mutációk a vizsgált populációban elterjedhessenek és az utódokban rögzülhessenek [249]. Butler 1996-ban *Streptomyces* élesztőgombákon kapcsolódott be Brown és Oliver segítségével a korábbi kísérletekbe [250]. Ekkor még az etanolt a tápközegbe szakaszosan, szabályozható pumpa segítségével juttatták be [249]. A baktériumok laboratóriumi evolúciós vizsgálatait kezdetben meghatározott gyógyszerkoncentrációkkal

történtek, amihez olyan koncentrációt kellett kiválasztani, hogy az ún. mutációs szelekciós ablak (MSW, *Mutant Selection Window*) lehetőséget adjon egy-egy rezisztens mutáns szelekciójára. Ezt követően egyre nagyobb koncentrációkra volt szükség ahhoz, hogy a szelekciós nyomást fenntartsák. Ehhez olyan kísérleti rendszerre volt szükség, ami folyamatosan biztosította a növekvő hatóanyag koncentrációt és így egyben az evolúciós adaptációt [251, 252]. Toprak és mtsai. 2011-ben kifejlesztettek egy olyan eszközt, amit mobidosztátnak neveztek, ezzel folyamatosan növekvő antibiotikumkoncentráció szabályozással tudták fenntartani a mikrobák növekvő szelekciós nyomását. A módszerrel az *E. coli* klóramfenikol, doxiciklin és trimetoprim hatóanyagokkal szembeni rezisztencia-evolúcióját vizsgálták [253]. A rövidtávú evolúciós laboratóriumi vizsgálatok fejlődését a genomszekvenálás egyre szélesebb körben való elterjedése tette lehetővé. A mikroorganizmusok esetén ezeket a vizsgálatokat a rövid generációs idő, a kísérletek megismételhetősége és a nagy populációs méret teszik lehetővé. Ezen vizsgálatok során sikerült feltárni az egyes mutációk közötti összefüggéseket, különös tekintettel az adaptációs mechanizmusokra [247].

A mikroorganizmusok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának kialakulásához kifejezetten hozzájárulnak az egyes fertőzések során kialakult baktériumpopulációk méretei, például egy tuberkulózisos elváltozásban 10^7 - 10^8 telepformáló egység (CFU) baktérium is előfordulhat [254]. A szelekciót elősegíti a nem megfelelően kiválasztott gyógyszer-dózis [255], a stressz [256], a kialakult rezisztencia-mechanizmusok pedig MGE-k révén plazmidok, transzpozonok és integronok segítségével tovább adható [257]. Egy kísérletben mikrofluidikus eszközt használva, ciprofloxacinnal egyenletesen növelt koncentrációját tartalmazó speciális edény esetén az erre ráoltott baktériumok rezisztenciája mindössze tíz óra alatt kialakult, ehhez három génben történő változásra és egy nukleotid szubsztitúció volt szükséges [258].

Az antibiotikumok felfedezése és sikeres terápiás alkalmazásuk forradalmasította az orvostudományt, számtalan életet megmentve, fordulópontot jelentve az emberiség történelmében [259]. Általánosan elfogadott tény, hogy az antibiotikumok használatának közvetlen következménye a rezisztencia kialakulása és terjedése, amit darwini úton mutációs események idéznek elő, evolúciós előnyhöz juttatva a baktériumokat [260]. A rezisztens mutáns törzsek sztochasztikusan keletkeznek, azaz a rezisztens mutációk véletlenszerűen jelennek meg a populációban, majd a kezelés szelektív nyomása alatt terjednek [261]. A rezisztens törzseknek azonban hátrányuk származhat a gyógyszer nyomásának ki nem tett, ún. vad típusú (*wild type*) törzsek, ez a „fitness költség” jelensége. A különböző rezisztencia-mechanizmusok kölcsönhatásba léphetnek egymással, és nem additív fitnesshatásokat válthatnak ki, ez az episztázis jelensége. Ez azt jelenti, hogy az

egyes rezisztencia mechanizmusok kombinációja más eredményt hozhat létre, mint azok önálló megléte [262]. Ezek ún. *rugged fitness landscapes* kialakulásához vezetnek, amelyek olyan evolúciós térképek, ahol egyes genetikai változások a populációban nehezebben vagy könnyebben elérhetők, és így azok befolyásolhatják az idő múlásával, hogy a törzs milyen útvonalat követ az adaptáció és a változás szempontjából [263–265]. Ezen evolúciós kompromisszumok azonosítása a gyógyszerrezisztenciával szembeni küzdelem alapját képezik [266–268].

Az *in vitro* evolúciós vizsgálatok során a kollaterális érzékenységet mutató hatóanyagok azonosíthatók, azaz egy rezisztenssé váló baktérium egy másik hatóanyaggal szemben is rezisztenssé, de akár érzékenyebbé is válhat. Ezek során a vizsgált populációt növekvő hatóanyag koncentrációnak teszik ki, ezzel rezisztenciát kialakítva [266, 269, 270]. A differenciált kollaterális válasz hatása a mai napig nem teljesen érthető, a kollaterális érzékenység sosem univerzális, és valójában ritka. Azaz nem minden mutáció vagy genetikai és fenotípusos változás eredményez az időben kollaterális érzékenységet [271]. A *Microbial Evolution and Growth Arena* (MEGA)-plate a Harvard Egyetem által kidolgozott evolúciós és koszelekciós vizsgálatra alkalmas rendszer [272], amely módszert sikeresen adaptáltuk magyarországi laboratóriumi környezetben [273].

Az *in vitro* evolúciós és koszelekciós vizsgálatok jól modellezik a folyamatokat, azonban mindig megfelelő önkritikával kell értékelni ezen vizsgálatok eredményeit, hiszen az élő, azaz az *in vivo* környezet sosem váltható ki teljes mértékben velük. Régóta feltételezik, hogy a rezisztencia gének megszerzése és fenntartása rendkívül energiaköltséges folyamat a baktériumok részéről, ami laboratóriumi körülmények között bizonyítást is nyert. Ezt úgy értékelték, hogy a multirezisztens törzsek szelekció hiányában instabilak és rövid életűek, azonban az *in vivo* körülmények azt mutatják, hogy a multirezisztens törzsek fejlődnek, sikeresen túlélnek és fennmaradnak [274]. Tehát szükség van a rezisztencia *in situ* kialakulásának részletes rendszerbiológiai elemzésére is.

3.8. Az antimikrobiális rezisztencia evolúciós mozgatórugói

A konjugációval történő géntranszmissziót széles körben tanulmányozták laboratóriumi körülmények között, az eredmények pedig arra utalnak, hogy a természetben a konjugáció átviteli gyakorisága több nagyságrenddel nagyobb, mint laboratóriumi körülmények között [275]. Az emberi és állati bélcsatornában pedig ez a folyamat *ad libitum* történik [276]. Az evolúciótörténet során bekövetkező HGT-k során két független eseménysorozatot lehet figyelembe venni, amelyek között az evolúciós szelekciós nyomás erősségében van különbség. A több milliárd év alatt bekövetkező evolúciós változások nem hasonlíthatók össze az elmúlt száz évben bekövetkező antibiotikum rezisztencia

kialakulásával, valamint terjedésével. Hiszen az antibiotikumok használatával ez a szelekciós nyomás sokkal intenzívebb, a szelekció a túlélésre irányul és nem a lassan fejlődő populációk fittségét biztosító folyamatokra. A laboratóriumi módszerekkel számos genetikai folyamat jól megfigyelhető, amely közrejátszik a rezisztens populációk evolúciójában, azonban a módszerek legfontosabb korlátjai a szelekció és a heterológ génexpresszió. A legfontosabb kérdés, hogy bár azt látjuk, hogy a terápia során a magas antibiotikum koncentráció súlyos szelekciós nyomást és rezisztencia növekedést eredményez, azonban az az útvonal, ami a környezeti rezisztencia géntől a klinikai rezisztencia génig vezet, nem teljesen ismert. Ennek a folyamatnak a közbülső lépéseinek ismerete fontos lenne [8]. Laboratóriumi körülmények között bizonyították, hogy az antibiotikumok szubdózisban való alkalmazása fokozza a géntranszfert és a rekombinációt, különösen az ún. SOS rendszer aktiválódása révén [277–279]. Ezek az SOS mechanizmusok szerepet játszanak az ún. integronok génbefogadásának és expressziójának folyamatában. A DNS károsodása során a *recA* fehérje aktiválódik, ami indukálja a *lexA* represszor gén lebontódását, ez pedig lehetővé teszi az SOS gének expresszióját (pl. *uvrA*, *uvrB*, *uvrY*, *umuA*, *umuB*, *umuC*, *umuD*, *recJ*, *recN*, *recQ*, *ruvA*, *ruvB*, *ruvC*, *dinB*), amelyek beindítják a javító és védekező mechanizmusokat. Az integronok jellemzően a genom géngyűjtő elemei, amelyek önmagukban nem MGE-k, de könnyen azzá válhatnak, ami a rezisztencia gének terjedéséhez vezet. Az integronok és génkazetták ezzel hozzájárulnak a genom evolúciójához és a baktérium populációk fluiditásához [278, 280, 281]. Több mint 100 génkazettát azonosítottak, amelyek lefedik a legtöbb antibiotikum csoportot [282]. Ezek a folyamatok mozgatórugói lehetnek az evolúciós és koszelekciós vizsgálatoknak, azonban az eredményeket minden esetben megfelelő komplexitásukban kell értékelnünk.

A mutáció a genetikai variáció egyik fő mechanizmusa, amely közvetlenül az egyes gének DNS szekvenciáinak megváltozásához vezet. Ez új allélok létrejöttéhez, majd azok populációs öröklődéséhez vezet [283]. A külső környezet szelekciós nyomásként ebben fontos szerepet tölt be (pl. antibiotikum hatóanyag jelenléte, hőmérséklet, pH) és a legtöbb mutáció egy adott környezethez való alkalmazkodásként jön létre [284]. Az adaptációs mutáció tipikus példája az antibiotikumot tartalmazó környezetnek való kitettség. Zhang és mtsai. *Lactobacillus paracasei* törzset amoxicillin és gentamicin hatóanyagok tettek ki, amely során az új mutációk kialakulása a hatóanyaggal szembeni alkalmazkodóképesség eléréséig voltak megfigyelhetők, azt követően a mutációs változások megálltak [285]. Az adaptív laboratóriumi evolúciós vizsgálatok ezen folyamatok hosszútávú nyomon követését teszik lehetővé. A korábban leírt vizsgálat során megállapították, hogy egy alkalikus sokkfehérje (*asp 23*) expressziója okozta az antibiotikum rezisztencia kialakulását [286].

Egy másik tanulmányban *L. plantarum* esetén azonosítottak egy olyan egy pontos nukleotid polimorfizmust (SNP), egy inszerciót és két szerkezeti változáshoz vezető mutációt, ami jelentős mértékben megnövelte a gentamicin hatóanyaggal szembeni rezisztencia mértékét [287]. A génáramlás fajok közötti specifikus gének vagy genotípusok kicserélődésének folyamatára utal génrekombináció, MGE-k, plazmidok, transzpozonok vagy genom szigetek révén. Az egyik közismert formája a HGT, ami a mikrobiális adaptáció alapvető evolúció ereje, azonban a génáramlások pontos azonosítása nehéz feladat. A *Massachusetts Institute of Technology* kutatói 2019-ben kifejlesztettek egy új módszert, a PopCOGenT-t, ami a közelmúltban bekövetkezett génáramlási események becslésére alkalmas, azonban jelenleg a módszer korlátja, hogy csak a szorosan kapcsolódó genomok között működik megbízhatóan [288–290]. A rekombináció révén létrejönnek a szelekciós nyomás hatására az új genetikai kombinációkat, felgyorsítva az adaptációs folyamatokat. A nem homológ rekombinációt egyes irodalmi források HGT-nek is nevezik [291]. Az evolúció dinamikájának legfontosabb folyamatait az **7. táblázat** foglalja össze.

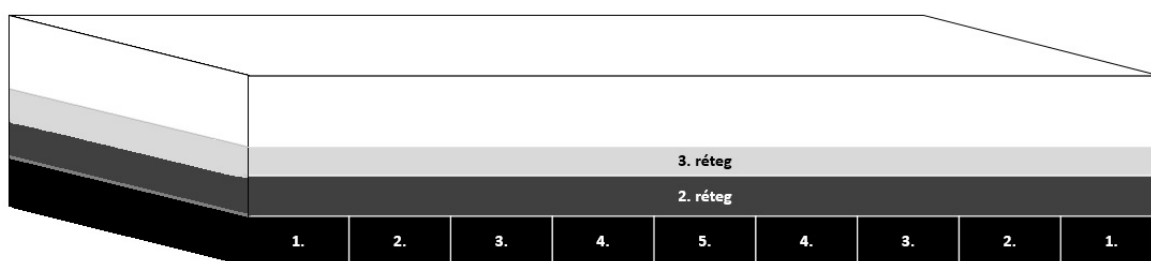
7. táblázat Az evolúciós folyamatokat mozgató dinamika [292]

Folyamat	Evolúciós mozgatók		Definíció
Mutáció	Nem szinonim	-	Nem okoz aminosav változást.
	Szinonim	-	Aminosav változást okoz.
Génáramlás	-	-	Gének vagy genotípusok földrajzilag elkülönült fajok közötti cseréjének folyamata.
Rekombináció	Homológ	-	DNS-szálak hasításából és ligálásából származó DNS-fragmensek cseréjének és rekombinációjának folyamata új DNS-molekulákat képezve.
	Nem homológ	Genomi szigetek	A teljes genomhoz képest aberráns bázisösszetételű részek, a tRNS-génekhez inszertálódnak, és közvetlen ismétlődések szegélyezik őket.
		Plazmidok	Független a kromoszómán kívüli genetikai tényezőktől, önmagában is replikálható. Beépülhet a kromoszómába, és független is lehet attól.
Természetes kiválasztódás	Genom lebomlása	Génvesztés	A géndeléción folyamata a HGT-n keresztül.
		Pseudo-genizáció	Az a folyamat, amelynek során a funkcionális gének pszeudogénné válnak nagyszámú káros mutáció felhalmozásával.

4. Anyag és módszer

4.1. MEGA-plate vizsgálati módszer

A MEGA-plate eredeti változata 120×60 cm-es polikarbonát lemezből készült, amelynek a használatához egy külön helyiséget rendeztek be, a megfelelő környezeti feltételek biztosítása mellett [272]. A laboratóriumi lehetőségek egy kisebb méretű edény kiépítését tették lehetővé, így egy 60×30 cm-es polikarbonát lemez elkészítése volt a célkitűzés, amit átlátszó anyagból, saját tervezés szerint gyártattunk le. Ez az edény 5 mm-es polikarbonát lemezből készült (Innoterm Kft., Budapest, Magyarország). Az összeragasztása tetrahidrofurán vízmentesen záródó ragasztóval történt. Az edény alját kilenc egyenlő sávra osztottuk, amely sávok lehetővé teszik a növekvő antibiotikum koncentrációt tartalmazó táptalajok alsó rétegben történő öntését (**2. ábra**).



2. ábra A MEGA-plate polikarbonát lemez felosztása rétegenként

Az edény méretéből eredően ki kellett dolgoznunk egy hatékony fertőtlenítési módszert, a kontamináció elkerülése miatt. A Harvard Egyetem ebből a célból 10%-os NaOCl-t (háztartási hipó) alkalmazott, amivel az edényt egy éjszakára töltötték fel [272]. Környezetvédelmi megfontolásból, valamint hogy ne maradjon maradékanyag a polikarbonát lemezen, ami befolyásolná a baktériumok növekedését, a szakirodalom alapján 7,5%-os hidrogén-peroxid oldatot alkalmaztunk fertőtlenítés céljából, amit tömény (30%) stabilizált hidrogén-peroxidból (VWR. International Kft., Debrecen, Magyarország) készítettünk el. Az edény perem részét és a fedőlemez belső felületét NaOCl-al töröltük át. A steril fülke alatt történő 15 perces inkubációs idő után, vákuumszivattyú segítségével sterilen leszívtuk a hidrogén-peroxidot, majd 30 percre UV-fényt kapcsolunk.

A fertőtlenítés hatékonyságának validálását úgy végeztük, hogy a fertőtlenítés előtt steril vattapálcával mintát vettünk az edény aljáról, az oldalfaláról, a ragasztás mentén és a fedőlemez belső felületéről. A mintákat tripton-szója agarra oltottuk ki. A fertőtlenítést követően megismételtük a mintavételt, majd az edényt feltöltöttük három liter tripton-szója levest (TSB) tartalmazó táplevessel. A kioltott mintákat és a lefedett edényt 37 °C-os inkubátorba helyeztük. 24 órás inkubációt követően a fertőtlenítés előtt vett minták kis számban tartalmaztak baktérium telepeket, az azt követően vett mintákból azonban nem

nőtt ki CFU és a táplevesben sem tapasztaltunk zavarosodást. A táplevessel feltöltött edényt további két héten keresztül inkubáltuk 37 °C-on, azonban ezt követően sem tapasztaltunk benne elváltozást. Összességében tehát elmondható, hogy a fertőtlenítési protokollunk hatékonynak bizonyult és két hét inkubációt követően sem történt befertőződés, ami fontos validálási pont az átlagosan 10-14 naposra tervezett evolúciós és koszelektációs vizsgálatok szempontjából.

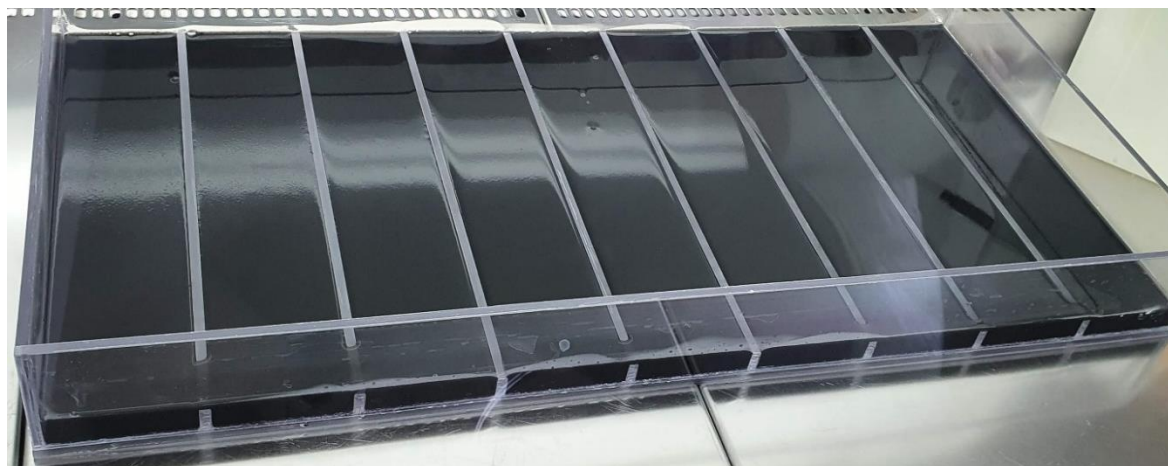
Táptalajként 2%-os BD Bacto Agart (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország) használtunk, tápanyag forrásként egy darab LB-Lennox (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország) kapszulát adtunk literenként a táptalajhoz. Saját tapasztalatunk azt mutatta, hogy a baktériumok nagyon lassan nőttek, és egy bizonyos idő után nem szaporodtak tovább az edényben. Ezért a legfelső rétegbe plusz egy kapszulát raktunk. A gombás befertőződés elkerülése érdekében cikloheximidet (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) használtunk, 64 µg/ml koncentrációban.

A táptalaj öntése három fázisban történt. Először az elválasztott kilenc rekeszbe öntöttük a 2%-os szilárd táptalajt, amely egy-egy 252 ml térfogatú rekeszbe került. A kilenc elválasztott rekesz a növekvő antibiotikum koncentrációt tartalmazó táptalajok elválasztására szolgált. Az egyes rekeszek táptalaját külön-külön Duran üvegben készítettük el. Bemértük a szükséges agart, az ioncserélt vizet és üvegenként egy ml akrilfestéket. Ezt követően 40 percen keresztül 121 °C-on autoklávoztuk, majd amint 50 °C-ra hűlt vissza az agar, hozzáadtuk a cikloheximidet. A cikloheximid elkészítéséhez 226,8 mg cikloheximidből és 14 ml ioncserélt vízből készítettünk törzsoldatot, majd azt cellulóz szűrőn steril fülke alatt átszűrtük. Így az alsó réteg esetén mindegyik rekesz táptalajához 1 ml cikloheximid törzsoldatot mértünk, ezzel elérve a 64 µg/ml koncentrációt. A második réteg 760 ml egybefüggő agar réteg lett, amely felülrétegezte a különböző antibiotikum koncentrációt tartalmazó rekeszeket, ezáltal biztosítva az alsó és legfelső harmadik réteg határfelületei közötti homogenitást. Ebbe a rétegbe 3 ml cikloheximid törzsoldat és 3 ml festék került. Végül ennek megszilárdulását követően a harmadik réteghez egy 0,28%-os félfolyékony agarréteget készítettünk, amibe 2 ml cikloheximid került, azonban ehhez tintát már nem adtunk (**8. táblázat**). Ez a félfolyékony réteg biztosította a baktériumok táptalajban történő diffúz terjedését a növekvő antibiotikum koncentrációval szemben. A legfelső réteg megszilárdulását követően a MEGA-plate lemez elkészült, a tetejét ráhelyezve, az illeszkedését pedig leragasztva megelőzhető a befertőződés.

8. táblázat Az egyes rétegekben kialakított cikloheximid koncentrációk

Cikloheximid, 226,8 mg/14 ml												
Réteg	1.										2.	3.
Mennyiség (ml)	1	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	16,2	48,6	32,4
Agar összesen (ml)	252	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	64

Következő lépésként ellenőriztük, hogy a baktériumot a legfelső rétegre ráoltva egyenletesen benőtte a tenyésztőedényt. Ehhez először egy hatóanyag mentes agart készítettünk, majd mindkét rövid oldalának szélére 24 órán át inkubált 100-100 µl *E. coli* baktérium leves szuszpenziót oltottunk egyenletesen szétosztva. A tapasztalatunk az volt, hogy ha a legfelső réteg készítésénél plusz egy kapszulával egészítettük ki azt, akkor a baktérium egyenletesen mindkét szélről a tenyésztőedény közepe felé haladva 3 nap alatt benőtte azt. Ahhoz, hogy a baktériumok növekedését szabad szemmel is jól nyomon tudjuk követni, kontrasztosításra volt szükség. Ehhez fekete akrilfestéket használtunk, melyből 252 ml táptalajonként 1 ml-t adtunk, kivéve a legfelső réteget (**3. ábra**). Ezt követően a rendszer adott baktérium, adott hatóanyaggal szembeni növekvő koncentráció-grádienssel szemben kialakított evolúciós és koszelekciós rezisztencia vizsgálatára alkalmas.



3. ábra MEGA-plate kontrasztos réteges öntést követően

Elsőként a vizsgált mikroba adott antibiotikumra vonatkozó MIC értékét kell meghatározni. Amennyiben ez például 1 µg/ml, akkor a következőképpen alakul a hatóanyagot tartalmazó rétegek elkészítése. A két szélső sávba nem kerül antibiotikum. Ezt követően ki kell számolni, hogy a MIC értéknek a tízes alapú növelése során a 2. rekeszbe 1 µg/ml, a 3. rekeszbe 10 µg/ml, a 4. rekeszbe 100 µg/ml és végül az 5. rekeszbe 1000 µg/ml hatóanyag szükséges. Egy rekesz 252 ml, tehát pl. a 2. sávba 252 µg hatóanyagra

van szükséges és így tovább. Ehhez még korrekcióként mindig számolni kell az adott hatóanyag tisztaságával. A középső sáv esetén például kolisztin hatóanyag esetén ez 315 mg, amit 25 ml ioncserélt vízben oldunk fel, majd steril fülke alatt cellulóz szűrővel szűrünk át. A két szélső sávba hatóanyag nem kerül, így azok 250 ml vízben feloldott agarból készülnek (1 ml tintával és 1 ml cikloheximiddel számolva), a többi hatóanyagot tartalmazó rekesz 27 ml-el kevesebb vízzel készül (1 ml tintával és 1 ml cikloheximiddel számolva/rekesz), hiszen az autoklávozást követően 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 törzsoldat bemérésére. Ez összeadva minden rekesz esetén 252 ml végtérfogatot kapunk. Az 5. rekesz törzsoldatából kettőt készítettünk, az egyik az 1000× koncentrációnak felel meg, ha azt az 5. rekesz táptalajához öntjük. A másiktól a többi réteghez ebből hígítva készítünk törzsoldatot, méghozzá azon az elven, hogy a 4. rekeszhez ebből a törzsoldatból kimérünk 2,5 ml-t, amit 22,5 ml TSB-hez adunk, így megkapjuk a 4. rekesz 25 ml törzsoldatát (100× koncentráció). A 3. rekeszhez kimérünk 0,25 ml-t, amit 24,75 ml TSB-hez adunk, így megkapjuk a 3. rekesz 25 ml törzsoldatát (10× koncentráció). A 2. rekeszhez kimérünk 0,025 ml-t, amit 24,975 ml TSB-hez adunk, így megkapjuk a 2. rekesz 25 ml törzsoldatát (1× koncentráció), ezzel elkészítve a 0×, 1×, 10×, 100× és 1000× hatóanyag koncentrációkat (**9. táblázat**).

9. táblázat A MEGA-plate egyes rétegeinek összeállítása 1 µg/ml MIC-érték példával

MEGA-plate (1 µg/ml MIC)											
Réteg	1.									2.	3
Akril festék (ml)	5	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. rekesz törzsoldata (ml)	-	0,025	0,25	2,5	25	2,5	0,25	0,025	-	-	-
Koncentráció (µg/ml)	-	1	10	100	1000	100	10	1	-	-	-

Az egyes rétegek öntését, majd a baktérium ráoltását követően a MEGA-plate lemez tetejét az illesztés mentén leragasztottuk, legalább egy 10 cm-es szakasz kivételével, hogy a felesleges víz el tudjon párologni és ne okozzon kondenzvíz lecsapódást az edényben. A lemezt 37 °C-os termosztátba helyeztük és naponta steril fülke alatt a tetejét eltávolítva nyomon követtük a baktérium diffúzióját, és minden esetben az egyes sávok közepéből három párhuzamos mintát vettünk további vizsgálatok elvégzéséhez.

4.2. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok

A vizsgált hatóanyagokból (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) a törzsoldatok elkészítéséhez a *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) ajánlását követtük [293], ezt a **10. táblázat** foglalja össze.

10. táblázat A vizsgálatokhoz használt antibiotikum hatóanyagok törzsoldatának készítése és tárolása

Hatóanyag	Oldószer	Megjegyzés	Tárolás
Amoxicillin	foszfátpuffer	pH 7,2, 0,01 mol/L	-80 °C
Amoxicillin-klavulánsav*	foszfátpuffer	pH 7,2, 0,01 mol/L	
Cefotaxim	UPW	-	
Ceftriaxon	UPW	-	
Spektinomycin	UPW	-	
Oxitetraciklin	UPW	-	
Doxiciklin	UPW	-	
Neomicin	UPW	-	
Kolisztin	UPW	-	
Potenciált szulfonamid**	forró UPW	+2,5 mol/L NaOH ¹ +0,05 mol/L HCl ²	
Enrofloxacin	UPW	+1 mol/L NaOH	
Florfenikol	UPW	+95% etanol	

UPW – ultratisztított víz; *2:1 arány; ** trimetoprim¹ és szulfametoxazol² 1:19 arányban

A vizsgálatokhoz a törzsoldatokat korrigáltuk az egyes hatóanyagok gyártó által meghatározott tisztaságára. Az egyes baktériumtörzsek érzékenység vizsgálatát MIC érték meghatározással végeztük a CLSI módszertanának segítségével [293], a breakpointokat pedig a CLSI és a *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) irányelvei alapján határoztuk meg. A törzsoldatok a MEGA-plate minták vizsgálatának kivételével egységesen 1024 µg/ml koncentrációban készültek.

A -80 °C-on tárolt baktériumtörzseket a vizsgálatot megelőző napon 3 ml Müller-Hinton levesbe (MHB) oltottuk, majd 18-24 órán át inkubáltuk 37 °C-on. A vizsgálatokat 96 lyukú mikrotiter lemezek (VWR International, LLC., Debrecen, Magyarország) segítségével végeztük. A munkalemezek első oszlopának kivételével a lyukakat 90 µl MHB-vel (1. lépés) töltöttük fel. Ezt követően elkészítettük a hatóanyag törzsoldatok feles hígítását MHB-vel, így minden esetben 512 µg/ml koncentrációval kezdtük a kettős alapú hígítási sort, amit egy második lemezen tovább folytatva “teljes range” vizsgálatot végeztünk (512-

0,0009 µg/ml). A feles hígításból 180 µl-t mértünk a munkalemezek első oszlopába (2. lépés), majd 2-es alapú hígítási sort készítettünk belőle (3. lépés). A második munkalemez 10. oszlopa után a felesleges oldatot pipettahegygel eldobtuk, így minden oszlopban 90 µl oldat maradt. Minden baktériumtörzs vizsgálatához egy-egy sort használtunk a munkalemezen.

Egy segédlemezen 25-szörös hígításban 0,5 McFarland értékre beállítva előkészítettük a baktériumok ráoltásához szükséges baktériumszuspenziót (4. lépés). Ezt követően a baktériumtörzseket az elkészített munkalemezre oltottuk, a kettes alapú hígítási sort tartalmazó lemezek 11. oszlopától kezdve visszafelé haladva minden lyukba 10 µl baktériumszuspenziót pipetázva a segédlemezről (5. lépés). A 11. oszlop pozitív kontrollként szolgált (csak baktériumszuspenziót és levest tartalmazott), a 12. oszlop negatív kontrollként (csak levest tartalmazott) funkcionált.

A munkalemezeket ezt követően 18-24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk, majd az értékelés SWIN automata MIC-leolvasó (CheBio fejlesztő Kft., Budapest, Magyarország) és VIZION rendszer (CheBio fejlesztő Kft., Budapest, Magyarország) segítségével történt. Referencia törzsként az *E. coli* ATCC 25922 (LGC Ltd., Teddington, Anglia) törzsét használtuk.

4.3. Molekuláris genetikai vizsgálatok

A molekuláris genetikai vizsgálatok segítségével az egyes hatóanyagok bakteriális genomra gyakorolt hatását vizsgáltuk, továbbá az ESBL termelésért felelős gének feltérképezéséhez is alkalmaztuk a módszert. A baktérium-szuspenzióból történő DNS kivonás a Zymo Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, Murphy Ave., Irvine, CA, USA) segítségével történt, a gyártó utasítása szerint. A bakteriális örökítőanyag kiszabadításához szükséges gyöngyös rázatáshoz Qiagen TissueLyzer LT (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) készüléket használtunk, 50 Hz-en, 5 percig. A kivont nukleinsav tárolása -20°C-on történt felhasználásig. A DNS-ből származó páros végű readeket Illumina NextSeq 500 szekvenálással határoztuk meg. Az Illumina által alkalmazott eljárás egy "páros végű" technika, ahol a szálakat oligonukleotidokkal rögzítik egy hídamplifikáció során, majd a másik szál behelyeződik és hidakat képez. A fordított szál ezután eltávolításra kerül, és a fluoreszkálóan kapcsolt nukleotidok szekvenálás közben leolvasásra kerülnek [294, 295].

A ko-evolúciós vizsgálatok során az újgenerációs szekvenálás során a DNS könyvtárak készítése az Illumina® Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, USA) használatával történt. A DNS fragmensek egyedi jelöléséhez a Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina, San Diego, USA) indexeket használtuk. Első lépésben a nukleinsav mintákat 2,5 µl végtérfogatban 0,2 ng/µl koncentrációra hígítottuk, majd a tagmentáló reakcióhoz összekevertük 5 µl Tagment DNA pufferrel, valamint 2,5 µl Amplicon Tagment Mix

reagenssel. A reakcióelegyet 55°C-on 6 percig inkubáltuk Eppendorf Mastercycler nexus GX2 (Eppendorf SE, Hamburg, Németország) készülékben, majd lehűtöttük 10°C-ra. Ezt követően azonnal hozzáadtunk 2,5 µl Neutralize Tagment puffert és 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A DNS könyvtár készítéséhez 7,5 µl Nextera PCR Master mixet összekevertünk 2,5-2,5 µl i5 és i7 index primerrel, és a tagmentált DNS mintához adtuk, majd PCR-rel amplifikáltuk. A PCR 95°C 30 mp kezdeti denaturáció után 12 ciklusból állt (95°C 10 mp, 55°C 30 mp, 72°C 30 mp), amit egy 72°C-on 5 percig tartó végső elongációs lépés követett, majd a mintákat lehűtöttük 10°C-ra. Az így keletkezett indexált DNS könyvtárat Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel (Geneaid Biotech, Hszinpej, Tajvan) tisztítottuk, az oszlopos tisztítási protokollt követve, majd Qubit® dsDNA HS Assay kittel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk. Az egyedi adapterekkel ellátott, DNS könyvtárakat a megfelelő koncentrációra történő hígítást követően összekevertük.

Az ESBL termelésért felelős gének azonosítására irányuló újgenerációs szekvenálás során a DNS könyvtárak készítése az Vazyme, TruePrep DNA Library Prep Kit V2 for Illumina (TD501-01) kit (Vazyme Biotech, Nanking, Kína) használatával történt. A DNS fragmensek egyedi jelöléséhez a Nextera XT Index Kit v2 Set A és Set B (Illumina, San Diego, USA) indexeket használtuk. Első lépésben a nukleinsav mintákból 50 ng mennyiséget kimértünk, majd a fragmentáló reakcióhoz összekevertük 5 µl TruePrep Tagment pufferral, valamint 2,5 µl TruePrep Tagment Enzim Mix reagenssel és 25 µl nukleáz mentes vízzel. A reakcióelegyet 55°C-on 10 percig inkubáltuk Eppendorf Mastercycler nexus GX2 (Eppendorf SE, Hamburg, Németország) készülékben, majd lehűtöttük 10°C-ra. A reakció során keletkezett fragmenseket azonnal tisztítottuk a Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel (Geneaid Biotech, Hszinpej, Tajvan), az oszlopos tisztítási protokollt követve. A DNS könyvtár készítéséhez 5 µl TruePrep Amplify puffert összekevertünk 2,5 µl PCR Primer Mix reagenssel, 0,5 µl TruePrep Amplify enzimmal, valamint 2,5-2,5 µl i5 és i7 index primerrel és az előző reakcióban kapott és tisztított 12 µl fragmentált DNS mintához adtuk, majd PCR-rel amplifikáltuk. Az amplifikáció során a következő hőprofil alkalmaztuk: a 72°C 3 perc, majd 98°C 30 mp kezdeti denaturáció után 10 ciklus (98°C 15 mp, 60°C 30 mp, 72°C 3 perc), amit egy 72°C-on 5 percig tartó végső elongációs lépés követett, majd a mintákat lehűtöttük 4°C-ra. Az így keletkezett indexált DNS könyvtárat Gel/PCR DNA Fragments Extraction kittel (Geneaid Biotech, Hszinpej, Tajvan) tisztítottuk, az oszlopos tisztítási protokollt követve, majd Qubit® dsDNA HS Assay kittel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk.

A könyvtár DNS-eket a megfelelő koncentrációra történő hígítást követően pooloztuk, majd az MGIEasy Universal Library Conversion Kit (App-A) (Wuhan MGI Tech, Wuhan, Kína) segítségével az Illumina könyvtárakat MGI kompatibilissá alakítottuk át. Az átalakító reakcióhoz a gyártói utasításoknak megfelelően a 25 ng könyvtár DNS-t nukleáz mentes vízzel egészítettük ki a 22 µl végtérfogat elérése érdekében, majd a 25 µl AC-PCR Amplification Master Mix és 3 µl AC-PCR Primer elegyéhez adtuk. A PCR a 98°C 3 perc kezdeti denaturáció után 10 cikusból állt (98°C 30 mp, 62°C 15 mp, 72°C 30 perc), amit egy 72°C-on 5 percig tartó végső elongációs lépés követett, majd a mintákat lehűtöttük 4°C-ra. Az így keletkezett termékeket a Quantabio sparQ PureMag Beads (Quantabio, Beverly, USA) mágneses gyöngyök segítségével tisztítottuk a gyártó utasításai szerint, majd Qubit® dsDNA HS Assay kittel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk. A következő lépésben a dupla szálú DNS könyvtárak denaturálása zajlott 48 µl térfogatban 95°C-on 3 percig, majd 2 perc jégre helyezést követően az így kapott egyszálú DNS könyvtárakat cirkularizáltuk. A reakcióhoz 11,6 µl App-A Splint puffer és 0,5 µl Ligation enzim keverékét adtuk, majd 37°C-on 30 percig inkubáltuk, majd a mintákat lehűtöttük 4°C-ra. A következő lépésben egy enzimátikus emésztést hajtottunk végre 1,4 µl Digestion pufferből és 2,6 µl Digestion enzimből álló reakcióelegy segítségével. A mintákat 37°C-on 30 percig inkubáltuk, majd 4°C-ra lehűtöttük, ezt követően azonnal hozzáadtunk 7,5 µl Digestion Stop puffert. Az így keletkezett termékeket ismét a Quantabio sparQ PureMag Beads (Quantabio, Beverly, USA) mágneses gyöngyök segítségével tisztítottuk a gyártó utasításai szerint, majd Qubit® ssDNA HS Assay kittel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) fluorometriás mennyiségi meghatározást végeztünk. A következő lépésben a cirkularizált könyvtárakból a High-throughput Sequencing Primer Kit (App-C) (Wuhan MGI Tech, Wuhan, Kína) segítségével „DNS nanolabdát” (DNB) készítettünk. A reakcióhoz 60fmol egyszálú könyvtár DNS-hez 40 µl Make DNB puffert és a 80 µl végtérfogat eléréséhez szükséges mennyiségű Low TE puffert adtunk, majd a mintákat 95°C, 65°C és 40°C -on 1-1 percig inkubáltuk, végül 4°C-ra lehűtöttük. Majd 80 µl Make DNB enzim mix I és 8 µl Make DNB enzim mix II (LC) hozzáadását követően 30°C-on 25 percig inkubáltuk és 4°C-ra lehűtöttük. Az ily módon elkészült „DNS nanolabdához” ún, „wide bore” pipettahegygel fel-le pipetázva azonnal hozzáadtunk 40 µl Stop DNB Reaction puffert, majd további felhasználásig 4°C-on tároltuk.

A poolozott „DNS nanolabda” könyvtárakat maximálisan 20 ng/µl végső koncentrációban DNBSEQ-G400RS Sequencing flowcell-re (Wuhan MGI Tech, Wuhan, Kína) töltöttük. A szekvenálást MGI DNBSEQ-G400 (Wuhan MGI Tech, Wuhan, Kína) készüléken végeztük. HotMPS High Throughput Sequencing Kit FCL PE150 (Wuhan MGI Tech, Wuhan, Kína) segítségével.

A nyers szekvenciaadatok minőségellenőrzését FastQC v0.11.9 [296] és Fastp v0.23.2-3 [297] és Blooco v1.0.7. [298] segítségével végeztük. szoftver segítségével végeztük, hogy az esetleges adapter szekvenciákat, kiegyenlített bázispár eloszlást, rossz minőségű régiókat ki tudjuk szűrni, javítani, továbbá a nem megfelelő szekvenciák szűrésére TrimGalore v0.6.6 [299] programot használtunk. A leolvasott szekvenciákat és a javított readok felhasználásával ezt követően *de novo* hosszabb szekvenciákká (contigok) állítottuk össze a MEGAHIT v1.2.9 [300] és SPAdes 4.0.0 [301] program segítségével. Ezt követően összevontuk a két összeszerelés során kapott eredményeket annak érdekében, hogy még jobb minőségű draft genom álljon rendelkezésünkre GAM-NGS v1.1b segítségével [302]. A contigok minőségellenőrzését a QUAST v5.2 szoftver [303] és Busco v5 szoftver [304]. segítségével végeztük. A genom jellemzőit a GenomeScope v2.2 [305] segítségével becsültük meg. A GenomeScope elemzés a genom általános jellemzésére szolgál. Ezek a jellemzők kulcsszerepet játszanak a genom vizsgálatában, segítve a bioinformatikai elemzések paramétereinek meghatározásában. A kmer lineáris grafikonok a lefedettséget, a genom méretét és a kmer méretét becsülik meg. Ezek a minőségi adatok megerősítik a szekvenálási minőség megfelelőségét és a contigok bioinformatikai elemzésre való alkalmasságát. Az így kapott contigokból a Prodigal v2.6.3 [306] segítségével meghatároztuk az összes lehetséges nyílt leolvasási keretet (ORF). Az ORF-ek között található ARG-k azonosítását a *Resistance Gene Identifier* (RGI) v5.1.0 és ABRicate szoftver [307] segítségével végeztük a CARD adatbázissal összevetve [308]. Csak azokat a géneket vettük figyelembe, melyek megfeleltek a CARD adatbázis által meghatározott STRICT küszöbértéknek és legalább 90%-os szekvenciaazonosságot és lefedettséget mutattak. A lefedettség (coverage) a szekvenálás során azt jelenti, hogy egy adott nukleotid vagy gén hány alkalommal volt szekvenálva egy genom vizsgálata során. Az azonosság (identity) a szekvenciák összehasonlításakor az egyező nukleotidok arányát jelenti.

Az azonosított rezisztenciagének MGE vizsgálatát MobileElementFinder (v1.0.3) [309] program segítségével végeztük. Csak azokat az ARG-eket tekintettük potenciálisan mobilisnak, amelyek az adatbázisban szereplő leghosszabb adott mikroorganizmusra jellemző transzpozon távolságán belül voltak. Ezen kívül a contigok plazmid eredetét a PlasFlow v1.1 szoftver segítségével vizsgáltuk, a gének fágon való hordozásának vizsgálatát pedig a VirSorter v2.2.2 [311] szoftver segítségével végeztük.

A MGE-k, plazmidok és fággenomok eredményeit 10 000 bázispárnyi találatra szűrtük. Fajazonosítás céljából a Checkm v1.2.2 szoftvert [312] és a Kraken v1.1.1 szoftvert [313] alkalmaztuk. A kromoszómális pontmutációk kereséséhez a ResFinder 4.1 verzióját [314–316] használtuk, míg a genom polymorfizmusainak nyomon követésére a Snippy v4.6.0-t

alkalmaztuk. Az Ectyper v1.0-t használtuk szerotípus meghatározására [317], míg a VirulenceFinder 2.0-at a virulenciafaktorok változásainak nyomon követésére [315, 318, 319]. A genomikai sokféleség elemzését a különböző filogenetikai vonalakból származó genomok adóazonosítása céljából az Average Nucleotide Identity (ANI) v2.0 szoftverrel végeztük [320]. A bioinformatikai referenciaelemzéshez az *E. coli* (SYNB8802 törzs) GCF_020995495.1 genomját használtuk, amely a legközelebbi teljes RefSeq genomfólium az *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) elérhető adatbázisban [321].

4.4. *Escherichia coli* törzsek országos érzékenységi felmérése

A mintagyűjtést 2022. februárjában kezdtük meg és 2023. júniusáig tartott. A minták legnagyobb része egészséges állatokból származott, a klinikai esetekből származó minták izolálását a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatósága végezte. A humán rezisztencia adatokat a Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központ bocsájtotta rendelkezésünkre.

A mintákat egyedi azonosító számuk alapján tartottuk nyilván, valamint feljegyeztük a velük kapcsolatos adatok közül, hogy milyen állatfajból (házityúk, pulyka), milyen szervből (kommenzalista mikrobák esetén légcső vagy kloáka; klinikai izolátumok esetén agykamra, bélsár, bőralatti kötőszövet, csontvelő, ízület, légzsák, máj, petevezető, szívburok, tüdő), valamint, hogy milyen településről, megyéből és régióból származtak a minták, a kommenzalista mikrobák esetén pedig a hasznosítási típusról, életkorról és az állomány nagyságáról is gyűjtöttünk információt. A kommenzalista törzsek gyűjtése során nagylétszámú állattartó telepenként 15 db légcső és 15 db kloáka tampon mintát gyűjtöttünk Amies-típusú (Biolab Zrt., Budapest, Magyarország), szén nélküli, normál alumínium pálcás mintavevő pálca segítségével.

Ezt követően *E. coli* törzsek izolálása céljából ChromoBio® Coliform (Biolab Zrt., Budapest, Magyarország) agaron szélesztettük a mintákat. Az izolált telepeket Tripton-szója agarra (Biolab Zrt., Budapest, Magyarország) oltottuk át és újabb 18-24 órás 41 °C-on történő inkubálást követően mind a kommenzalista baktériumtörzseket és a Petri-csészén kapott klinikai eredetű színtenyészeteket Microbank™ rendszerben (Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Kanada) fagyasztottuk le -80 °C-on felhasználásig.

4.5. ESBL termelő *Escherichia coli* törzsek országos felmérése

Az ESBL termelés vizsgálatához a CLSI ajánlását követtük [293]. A vizsgált baktérium törzsek MIC-értékét úgy kellett meghatározni cefotaxim és cefotaxim-klavulánsav hatóanyagokra nézve, hogy a klavulánsavas kombinációk esetén minden hígítást tartalmazó lyukban 4 µg/ml klavulánsav koncentráció legyen.

A lemezeket 37 °C-os termosztátban 18-24 órán keresztül inkubáltuk, majd vizuálisan elbíráltuk azokat. A CLSI leírása szerint ESBL termelőnek tekinthető egy törzs, ha a klavulánsavas kombinációban vizsgált antimikrobiális hatóanyag MIC-értékének legalább háromszoros csökkenése figyelhető meg a hatóanyag önmagában történő vizsgálat során kapott MIC-értékhez képest. Például, ha cefotaxim esetén a MIC-érték 8 µg/ml, a cefotaxim-klavulánsav kombinációban viszont csak 1 µg/ml (nyolcszoros csökkenés), akkor az adott törzs ESBL termelőnek tekinthető. A módszer korlátja lehet, hogy a klasszikus értelemben nem ESBL termelésért felelős génként számon tartott *ampC* és *ampH* gének kifejeződése okozhat olyan mennyiségű béta-laktamáz túltermelést, ami téves pozitivitást eredményezhet a tesztre.

5. Eredmények

5.1. Antimikrobiális génkészlet

A genom általános jellemzésére használt GenomeScope ellenőrzések alapján a kmerek gyakorisági hisztogramjai következetesen igazodtak az *E. coli* méretéhez, továbbá a Checkm (v1.1.6) és a Kraken szoftver (v1.1.1.1) minden mintában 100%-os egyezést mutatott az *E. coli* baktériumfajjal.

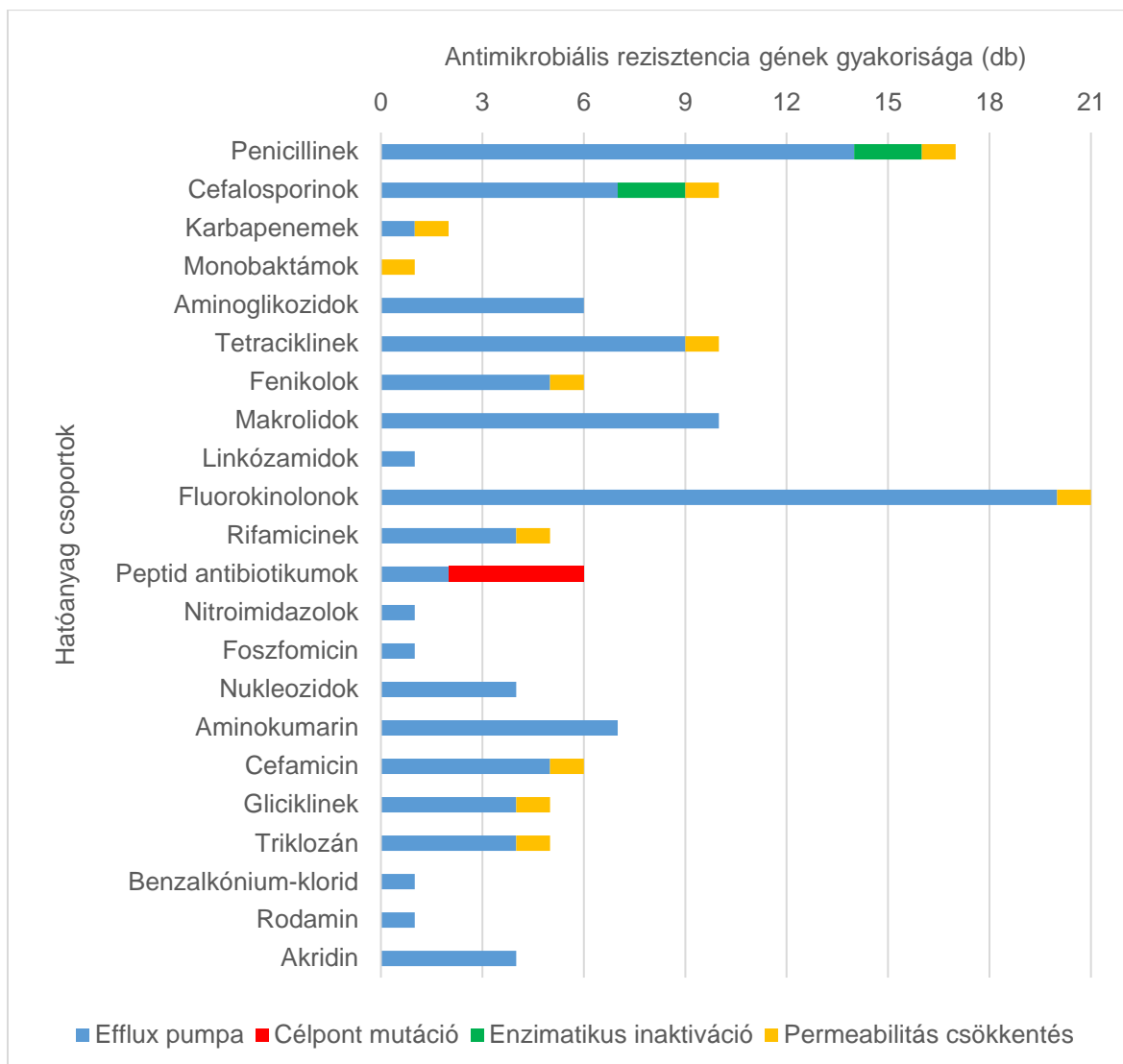
A CARD adatbázissal összevetve, annak legalább az ún. strict küszöbkritériumát elérő, azonosított ARG-k mindegyike 90% feletti lefedettséget és szekvencia azonosságot mutatott. Mindegyik minta esetén ugyanaz volt a génkészlet, összesen 44-féle ARG, amelyek kifejeződése összesen 22-féle antibiotikum, fertőtlenítőszer és festékanyagokkal szemben alakíthat ki rezisztenciát. A β -laktám hatóanyagokkal szembeni rezisztencia szempontjából kritikusan fontos az *ampC* és *ampH* gének hordozása, amelyek enzimatikus inaktiváció révén alakítanak ki rezisztenciát béta-laktám (penicillinek, cefalosporinok) antibiotikumokkal szemben (**11. táblázat**). Az *acrA*, az *acrB* és a *tolC* gének jelenléte egy multidrug efflux pumparendszer meglétére utal, ami igen gyakori *E. coli* törzsek esetén. Ehhez hasonló muldrug efflux pumparendszert alkotnak a *tolC* génnek az *emrA* és *emrB* gének, valamint az *mdtA*, az *mdtB* és *mdtC* gének. A későbbiekben tárgyalt, egyes ARG-ben bekövetkező mutációk vizsgálata során a gének nem mindegyike (pl. *gyaR*, *parC*) szerepel az itt bemutatott táblázatban. Ennek az az oka, hogy azok a gének nem érték el az általunk meghatározott lefedettségi és azonossági küszöbértéket.

A **4. ábrán** látható az azonosított 44-féle ARG csoportosítása az egyes hatóanyag csoportok és rezisztencia mechanizmusok alapján. A legtöbb ARG fluorokinolonokkal szemben (21 db) alakít ki rezisztenciát, amelyből 19 db gén efflux pumpát határoz meg. A második helyen a penicillinekkal szembeni rezisztenciáért felelős gének gyakorisága áll, amelyekkel szemben 17 db gén alakít ki rezisztenciát, ezek többsége efflux pumpa (14 db), azonban két esetben enzimatikus inaktivációért felelős gént is azonosítottam (*ampC* és *ampH*). Célpont mutáció mechanizmust meghatározó géneket (4 db) kizárólag peptid (polimixin) antibiotikumokkal szemben sikerült azonosítani.

11. táblázat Az új generációs szekvenálás során azonosított 44-féle antimikrobiális rezisztencia gén, ami az összes minta esetén azonos volt

Gén	L%	A%	Mechanizmus	Rezisztencia
<i>acrA</i>	100,00	99,16	efflux pumpa	cefalosporinok, fluorokinolonok, gliciklinek, penicillinek, fenikolok, rifamicinek, tetraciklinek, triklozán
<i>acrB</i>	100,00	98,64	efflux pumpa	
<i>acrD</i>	100,00	98,04	efflux pumpa	
<i>acrE</i>	100,00	98,79	efflux pumpa	
<i>acrF</i>	100,00	96,49	efflux pumpa	
<i>acrS</i>	100,00	98,34	efflux pumpa	cefalosporinok, cefamicin, fluorokinolonok, penicillinek
<i>ampC</i>	100,00	98,15	enzimatis inaktiváció	cefalosporinok, penicillinek
<i>ampH</i>	100,00	97,50	enzimatis inaktiváció	
<i>bacA</i>	99,76	98,17	célpont mutáció	peptid antibiotikumok
<i>baeR</i>	99,86	96,81	efflux pumpa	aminokumarinok, aminoglikozidok
<i>baeS</i>	100,00	90,53	efflux pumpa	
<i>cpxA</i>	100,00	98,47	efflux pumpa	
<i>CRP</i>	100,00	99,21	efflux pumpa	fluorokinolonok, makrolidok, penicillinek
<i>emrA</i>	100,00	98,21	efflux pumpa	fluorokinolonok
<i>emrB</i>	100,00	96,95	efflux pumpa	
<i>emrE</i>	100,00	92,19	efflux pumpa	makrolidok
<i>emrK</i>	100,00	97,73	efflux pumpa	tetraciklinek
<i>emrR</i>	100,00	98,68	efflux pumpa	fluorokinolonok
<i>emrY</i>	100,00	97,73	efflux pumpa	tetraciklinek
<i>eptA</i>	100,00	91,85	célpont mutáció	peptid antibiotikumok
<i>evgA</i>	100,00	99,02	efflux pumpa	fluorokinolonok, makrolidok, penicillinek, tetraciklinek
<i>evgS</i>	100,00	96,19	efflux pumpa	
<i>gadW</i>	100,00	99,86	efflux pumpa	fluorokinolonok, makrolidok, penicillinek
<i>gadX</i>	100,00	93,82	efflux pumpa	
<i>H-NS</i>	100,00	99,28	efflux pumpa	cefalosporinok, cefamicin, fluorokinolonok, makrolidok, penicillinek, tetraciklinek
<i>kdpE</i>	99,26	95,84	efflux pumpa	aminoglikozidok
<i>marA</i>	100,00	98,70	permeabilitás csökkentés	karbapenemek, cefalosporinok, cefamicin, fluorokinolonok, gliciklinek, monobaktámok, penicillinek, fenikolok, rifamicinek, tetraciklinek, triklozán
<i>mdfA</i>	100,00	96,59	efflux pumpa	benzalkónium-klorid, rodamin, tetraciklinek
<i>mdtA</i>	100,00	95,11	efflux pumpa	aminokumarinok
<i>mdtB</i>	100,00	96,29	efflux pumpa	
<i>mdtC</i>	100,00	94,15	efflux pumpa	
<i>mdtE</i>	100,00	98,62	efflux pumpa	
<i>mdtF</i>	100,00	97,33	efflux pumpa	fluorokinolonok, makrolidok, penicillinek
<i>mdtG</i>	100,00	98,21	efflux pumpa	foszfomicin
<i>mdtH</i>	100,00	98,26	efflux pumpa	fluorokinolonok
<i>mdtM</i>	100,00	95,05	efflux pumpa	akridin, fluorokinolonok, linkóزامidok, nukleozidok, fenikolok
<i>mdtN</i>	100,00	95,64	efflux pumpa	akridin, nukleozidok
<i>mdtO</i>	100,00	97,08	efflux pumpa	
<i>mdtP</i>	100,00	97,61	efflux pumpa	
<i>msbA</i>	100,00	98,06	efflux pumpa	nitroimidazolok
<i>pmrF</i>	100,00	97,63	célpont mutáció	peptid antibiotikumok
<i>tolC</i>	100,00	97,98	efflux pumpa	aminokumarinok, aminoglikozidok, karbapenemek, cefalosporinok, cefamicin, fluorokinolonok, gliciklinek, makrolidok, penicillinek, peptid antibiotikumok, fenikolok, rifamicinek, tetraciklinek, triklozán
<i>ugd</i>	100,00	96,92	célpont mutáció	peptid antibiotikumok
<i>yojI</i>	100,00	98,05	efflux pumpa	

L – lefedettség; A – azonosság



4. ábra Az egyes azonosított antimikrobiális rezisztencia gének csoportosítása hatóanyag csoportonként és rezisztencia mechanizmusok szerint

A szekvenálási adatok alapján lehetőség volt a vizsgált törzs szerotipizálására is, ennek megfelelően O6-os típus-specifikus poliszacharid (*wzx*, *wzy*), valamint H1 és H12 (*fliC*) fehérje természetű antigének kerültek azonosításra.

5.2. MEGA-plate vizsgálatok eredményei

5.2.1. Amoxicillin fenotípusos eredmények

Az amoxicillin hatóanyag esetében 5 napra volt szükség, hogy a vizsgált baktériumtörzs az $\frac{1}{4}$ MIC-értékének az 1000-szeresét (a MIC 250-szeresét) tartalmazó réteg határát is áttörje. A mintavételt követően elvégzett MIC-érték meghatározás eredményei alapján megfigyelhető, hogy a legtöbb hatóanyag esetében a MIC-értékek jelentős növekedése következett be. Kivételt képezett az oxitettraciklin és a florfenikol hatóanyag (12. táblázat).

12. táblázat Az amoxicillin hatóanyag növekvő koncentrációjának hatása önmaga és más hatóanyagok minimális gátló koncentrációjára (MIC). Félkövérrel kiemelve azok az értékek láthatóak, amelyek a kiindulási értékhez képest megnövekedett MIC ($\mu\text{g/ml}$) értéket mutattak. Piros kerettel kiemelve láthatók az AMEG B kategóriás hatóanyagok.

Minta	AMX	CFR	CFT	CTX	CFQ	ENR	KOL	OTC	PSA	FLO	NEO
		$\mu\text{g/ml}$									
0x AMX	4	0,25	0,06	0,03	0,06	0,003	0,5	2	8	16	16
1x AMX	4	0,25	0,25	0,125	0,125	0,003	0,5	2	8	16	16
10x AMX	8	0,25	0,25	0,25	0,125	0,007	0,5	2	8	16	16
100x AMX	256	16	4	8	2	0,06	128	2	256	16	64
1000x AMX	256	16	4	8	8	0,06	512	2	256	16	64

AMX—amoxicillin, CFR—ceftriaxon, CFT—ceftiofur, CTX—cefotaxim, CFQ—cefkvinom; ENR—enrofloxacin, KOL—kolisztin, OTC—oxitetraciklin, PSA—potenciált szulfonamid (szulfametoxazol, trimetoprim 19:1 arányban), FLO—florfenikol, NEO—neomicin

A **13. táblázatban** látható, hogy az ESBL termelésre irányuló, a CLSI protokoll szerint elvégzett teszt a korábban amoxicillin hatóanyaggal indukált törzsek esetében nem mutatott legalább háromszoros hígítás csökkenést a klavulánsav jelenlétében, tehát fenotípusosan ESBL termelést nem tudunk indukálni.

13. táblázat A kiterjedt spektrumú β -laktamáz (ESBL) termelés vizsgálata a *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) által ajánlott ceftazidim (CTZ), cefotaxim (CTX) és azok klavulánsavval (CLA) történő kombinációjával történt.

Minta	CTZ	CTZ + KLA	Különbség	CTX	CTX + KLA	Különbség
	$(\mu\text{g/ml})$			$(\mu\text{g/ml})$		
0x AMX	0,03	0,03	0x	0,03	0,03	0x
1x AMX	0,06	0,03	2x	0,125	0,06	2x
10x AMX	0,25	0,125	2x	0,25	0,125	2x
100x AMX	64	32	2x	8	2	4x
1000x AMX	64	32	2x	8	2	4x

AMX—amoxicillin, CTZ—ceftazidim, CTZ + KLA—ceftazidim-klavulánsav, CTX—cefotaxim, CTX + KLA—cefotaxim-klavulánsav

5.2.2. Amoxicillin genotípusos eredmények

Az amoxicillin minták szekvenálását követő minőségellenőrzés eredményeit ennek a

14. táblázat foglalja össze.

14. táblázat A contigok minőségi adatai a QUASt szoftver elemzése alapján

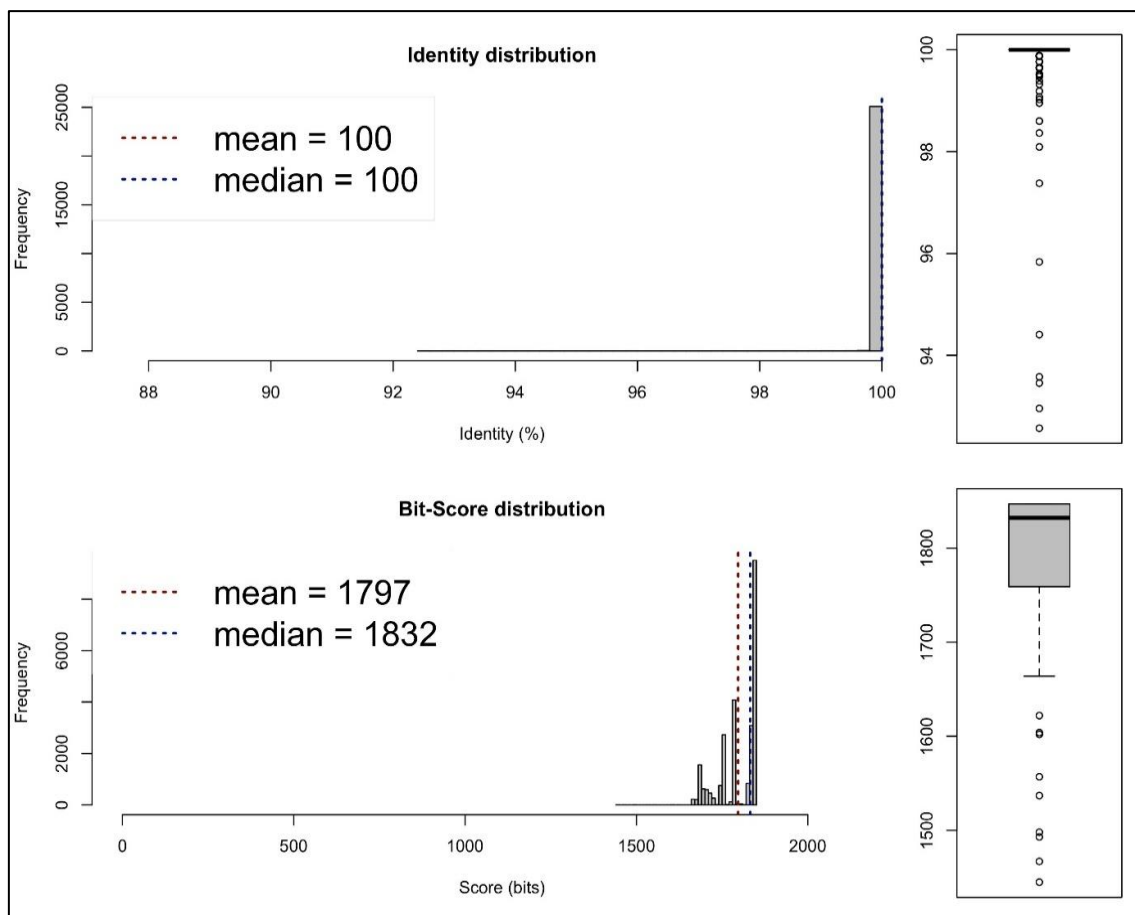
Minta	Readek	Contigok	Lefedettség	N50	N75	L50	L75
0x AMX	4956318	109	180,18	231989	121408	6	14
1x AMX	6628030	111	259,102	205034	121530	7	14
10x AMX	4791998	126	168,046	194885	107365	9	18
100x AMX	5440885	193	134,166	160547	84576	12	24
1000x AMX	4221108	102	161,305	202436	130873	8	16

AMX – amoxicillin

A lefedettség azon bázispárok százalékát mutatja meg, amelyeket sikerült meghatározni a vizsgált mintában az összes lehetséges bázispár vagy bázis tekintetében. Az N50 és N75 a szekvenciahalmaz medián és átlagos hosszához kapcsolódó azon érték, amely a legrövidebb leolvasás hosszát jelenti a leghosszabb szekvenciák azon csoportjában, amelyek együttesen a szekvenciahalmaz nukleotidjainak (legalább) 50%-át, illetve 75%-át képviselik. Az L50 és L75 azt mutatja meg, hogy ha a contigokat méret szerint rendezzük, akkor mennyi azon legrövidebb contigok száma, amelyek elérik a genom hosszának 50%-át és 75%-át. Az N50 mindig nagyobb vagy egyenlő az N75-nél, az L50 pedig mindig kisebb vagy egyenlő az L75-nél.

A 0x és 1000x amoxicillin genomok közötti genomi diverzitáselemzést az ANI v2.0 szoftver segítségével végeztük el (5. ábra). Az ANI-kalkulátor az átlagos nukleotid-azonosságot a két genomiális adatkészlet közötti legjobb egyirányú egyezések (egyirányú ANI) és a legjobb kölcsönös egyezések (kétirányú ANI) segítségével becsüli meg. Az ANI-értékek ugyanazon faj genomjai között jellemzően 95% feletti [322].

Az amoxicillin 10x, 100x és 1000x koncentrációval kezelt minták esetén az *emrB* gén átkerült fágra. Az *emrAB-tolC* multirezisztens efflux pumparendszer része, amely esetben az *emrB* egy membrán-transzporter [28]. A *bacA* gén mindegyik minta esetén fágon volt megtalálható és egyben mobilis volt. A *bacA* gén kifejeződése esetén a sejtfal bioszintézise során a baktérium újrahasznosítja az undekaprenil-pirofoszfátot, ami a bacitracinnal szembeni rezisztenciát biztosítja [323]. Plazmidon nem azonosítottunk gént.



5. ábra A 0x és 1000x amoxicillin minták genomjai közötti átlagos nukleotid azonosság (ANI) 95% feletti faji azonossággal. One-way ANI 1: 99,99% (SD: 0,23%), 25210 fragmentumból. One-way ANI 2: 99,99% (SD: 0,15%), 25203 fragmentumból. Two-way ANI: 100,0% (SD: 0,10%), 25145 fragmentumból.

Az amoxicillin mintákban összesen 8747 mutáció volt megfigyelhető, amelyek közül 4618-nak volt azonosított funkciója. Ezeket a mutációkat összehasonlítva a 0x alampintával, az 1x minta esetében 99,1%-os, a 10x minta esetében 98,2%-os, a 100x minta esetében 98,6%-os és az 1000x minta esetében 100,0%-os volt az átfedés. Az egyes mutációtípusok eloszlása a mintákban a **15. táblázatban** látható. Minden mutáció értelmezése a bioinformatikai elemzéshez referencia törzsként használt SYN8802 törzshöz viszonyítva történt.

15. táblázat Az egyes mintákban megfigyelt és azonosított mutációk száma az elemzéshez használt referenciatorzshöz viszonyított mutációtípus függvényében. A minták közötti különbségek a mutációk számának időbeli növekedését tükrözik, amelyet az antibiotikum jelenléte okozott a vizsgálat 5 napja alatt. A kezeletlen (0x AMX) mintához viszonyított, a hatóanyag által indukált mutációk számát zárójelben tüntettem fel.

Mutáció típusa		0x AMX	1x AMX	10x AMX	100x AMX	1000x AMX
Komplex *	<i>Azonosított</i>	121	119	116	115	117 (+1)
	<i>Összes</i>	311	286	193	290	294
Deléció	<i>Azonosított</i>	20	20	20	19	20
	<i>Összes</i>	41	41	42	41	41
Inzerció	<i>Azonosított</i>	4	4	4	3	5 (+1)
	<i>Összes</i>	14	15	15	13	15
SNP **	<i>Azonosított</i>	786	781	774	781 (+6)	789 (+5)
	<i>Összes</i>	1447	1364	1393	1381	1410

*összetett mutáció, amely többszörös inzerciót, deléció és szubsztitúciót tartalmazhat;

**egy pontos nukleotid polimorfizmus. AMX—amoxicillin.

A mintákban kimutatott mutációk többsége az SNP kategóriába tartozott. Az SNP-mutációkat követően a teljes aminosavcserével járó összetett mutációk következtek, amelyek legnagyobb mennyiségben az 1x-es mintában voltak jelen. Az antimikrobiális rezisztencia szempontjából releváns mutációk vizsgálata során SNP-knek tulajdonítható genomikai változásokat azonosítottunk, amelyek potenciálisan magyarázatot adhatnak az amoxicillin expozíciót követően tapasztalt több antibiotikummal szembeni MIC-értékek növekedésére (**16. táblázat**). Az *ampC* génben 100x és 1000x koncentrációban figyelemre méltó nukleinsavváltozást figyeltünk meg, ami magyarázatot adhat a **12. táblázatban** felsorolt β -laktám hatóanyagokkal szembeni csökkent érzékenységre. Emellett lényeges kiemelni az *acrB* génben megfigyelt mutációt, amely az *acrAB-toIC* pumparendszer fokozott aktiválódását eredményezhette. Az amoxicillin expozíció hatására a legmagasabb gyógyszerkoncentrációnál pontmutáció következett be a *pta* génben, amelynek expressziója a foszfomicin hatóanyaggal szembeni rezisztencia kialakulásához vezethet [324]. Az *ompN* gén egy olyan külső membránfehérjét határoz meg, aminek pontmutációja hozzájárulhat a rezisztencia kialakulásához [325].

16. táblázat Az antimikrobiális rezisztencia szempontjából fontosabb géneket érintő bekövetkező egy pontos nukleotid polimorfizmusok (SNP-k) az amoxicillin hatására

Gén	0x	1x	10x	100x	1000x	Nukleinsav csere	Hatás	Termék
<i>ampC</i>				x	x	meghatározatlan	<i>ampC</i> -promoter n.-11C>T	meghatározatlan
<i>acrB</i>					x	A-T	hibás változat c.145T>A p.Tyr49Asn	efflux RND transzporter permeáz
<i>pta</i> *					x	G-T	hibás változat c.208C>A p.Pro70Thr	foszfát-acetiltranszferáz
<i>ompN</i>				x		A-G	hasonló változat c.75T>C p.Tyr25Tyr	porinfehérje

*nem klasszikus antimikrobiális rezisztencia gén, de kifejeződése befolyásolja a rezisztenciát

5.2.3. Cefotaxim fenotípusos eredmények

A cefotaxim hatóanyag esetében a baktériumoknak 13 napra volt szükségük, hogy a hatóanyag 1000-szeresét tartalmazó agarrészbe is növekedjen. A mintavételt követően elvégzett MIC-érték meghatározás eredményei alapján megfigyelhető, hogy az összes hatóanyag esetében a MIC-értékek jelentős növekedése következett be (**17. táblázat**).

17. táblázat A cefotaxim hatóanyag növekvő koncentrációjának hatása önmaga és más hatóanyagok minimális gátló koncentrációjára (MIC). Félkövérrrel kiemelve azok az értékek láthatóak, melyek a kiindulási értékhez képest megnövekedett MIC ($\mu\text{g/ml}$) értéket mutattak. Piros kerettel kiemelve láthatók az AMEG B kategóriás hatóanyagok.

Minta	CTX	CFR	CFT	CFQ	ENR	KOL	FLO	OTC	PSA	AMX	NEO	
	$\mu\text{g/ml}$											
0x CTX	0,03	0,25	0,06	0,06	0,003	0,5	16	2	8	8	16	
1x CTX	0,125	0,25	0,06	0,06	0,003	0,5	16	2	8	8	16	
10x CTX	0,25	0,25	0,06	0,06	0,03	0,5	128	4	16	32	16	
100x CTX	4	16	8	4	0,125	8	256	4	32	>512	64	
1000x CTX	16	64	32	8	0,125	32	256	16	64	>512	128	

CTX—cefotaxim, CFR—ceftriaxon, CFT—ceftiofur, CFQ—cefkvinom, ENR—enrofloxacin, KOL—kolisztin, AMX—amoxicillin, OTC—oxitetraciklin, PSA—potenciált szulfonamid (szulfametoxazol, trimetoprim 19:1 arányban), FLO—florfenikol, NEO—neomicin

A **18. táblázatban** látható, hogy az ESBL termelésre irányuló, a CLSI protokoll szerint elvégzett teszt a korábban cefotaxim hatóanyaggal kezelt törzsek esetében nem mutatott legalább háromszoros hígítás csökkenést a klavulánsav jelenlétében, amit az *ampC* gén jelenléte magyarázhat.

18. táblázat A kiterjedt spektrumú β -laktamáz (ESBL) termelés vizsgálata a *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) által ajánlott ceftazidim (CTZ), cefotaxim (CTX) és azok klavulánsavval (KLA) történő kombinációjával történt.

Minta						
	CTZ	CTZ + KLA	Különbség	CTX	CTX + KLA	Különbség
	$(\mu\text{g/ml})$			$(\mu\text{g/ml})$		
0x CTX	0,03	0,03	1x	0,03	0,03	1x
1x CTX	0,03	0,03	1x	0,125	0,125	1x
10x CTX	0,06	0,06	1x	0,25	0,125	2x
100x CTX	8	4	2x	4	2	2x
1000x CTX	8	8	1x	16	8	2x

AMX—amoxicillin, CTZ—ceftazidim, CTZ + KLA—ceftazidim-klavulánsav, CTX—cefotaxim, CTX + KLA—cefotaxim-klavulánsav

5.2.4. Cefotaxim genotípusos eredmények

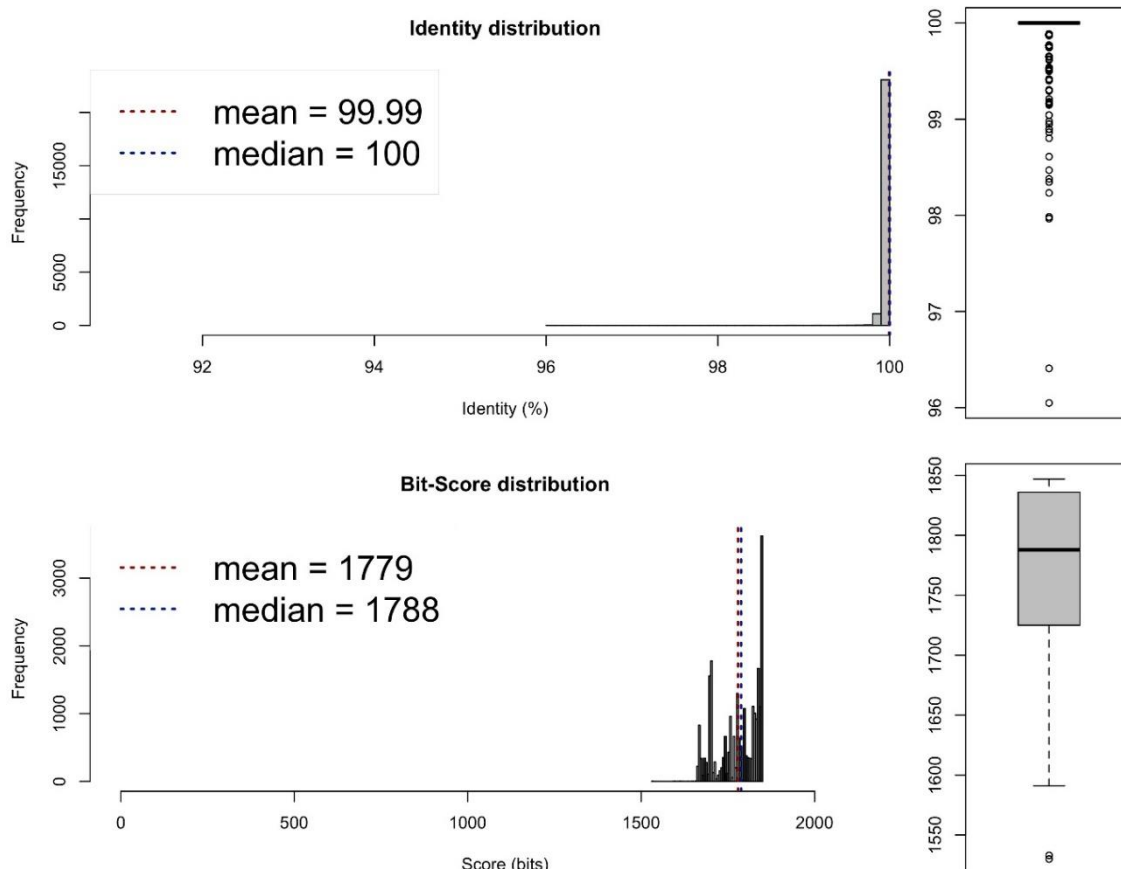
A contigok minőség-ellenőrzésének eredményeit a **19. táblázat** foglalja össze.

19. táblázat A contigok minőségi adatai a QUASt szoftver elemzése alapján

Minta	Readok	Contigok	Lefedettség	N50	N75	L50	L75
0x CTX	2277416	249	55.8348	120 956	65 648	14	27
1x CTX	2421900	253	59.5407	132 252	57 752	14	27
10x CTX	2444649	237	59.7927	155 433	84 590	12	24
100x CTX	2315672	260	56.5416	120 953	50 443	15	29
1000x CTX	1413575	327	34.4063	73 430	29 355	21	48

CTX - cefotaxim

A 0x és 1000x cefotaxim genomok közötti genomi diverzitáselemzést az ANI v2.0 szoftver segítségével végeztük el (**6. ábra**), ami alapján a minták faji azonossága 99,99%-os a minták között.



6. ábra A 0x és 1000x cefotaxim minták genomjai közötti átlagos nukleotid azonosság (ANI) 95% feletti faji azonossággal. One-way ANI 1: 99,99% (SD: 0,17%), 24483 fragmentumból. One-way ANI 2: 99,99% (SD: 0,07%), 24366 fragmentumból. Two-way ANI: 99,99% (SD: 0,07%), 24307 fragmentumból

A minták ARG készletének plazmidon, fágon és MGE-ként való hordozásának vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a *bacA* gén minden mintában fágon volt megtalálható, azonban a cefotaxim 1x koncentrációjával való kezelést követően MGE-ként lett azonosítva minden további mintában. Ezen kívül a cefotaxim 100x és 1000x koncentrációjának hatására az *emrB* gén kromozómáról átkerült fágra. A cefotaxim 10x koncentrációjával kezelt minta esetén pedig az *ampC* gén plazmidra ugrott.

A cefotaxim mintákban összesen 9673 mutáció volt kimutatható, amelyek közül 4922-nek volt azonosított funkciója. Amikor ezeket a mutációkat összehasonlítottam a 0x alapmintával, az 1x minta esetében 101,3%-os, a 10x minta esetében 101,4%-os, a 100x minta esetében 118,9%-os és az 1000x minta esetében 118,3%-os volt az átfedés. Az egyes mutációtípusok eloszlása a mintákban a **20. táblázatban** látható. Minden mutációt a

bioinformatikai elemzéshez referencia törzsként használt SYNB8802 törzshöz viszonyítva értelmeztünk. A deléciós mutációk, amelyek egyetlen aminosav elvesztését eredményezik a 100x és 1000x cefotaxim mintákban fordultak elő a leggyakrabban. Számos inzerciót figyeltünk meg a cefotaximmal kezelt törzsek 100x és 1000x mintáiban. Az ún. SOS box gének aktiválódásra utal a 100x és 1000x minták esetén az ezt szabályozó *ruvB*, *recJ*, *polB* és *umuC* génekben bekövetkező pontmutációk.

20. táblázat Az egyes mintákban megfigyelt és azonosított mutációk száma az elemzéshez használt referencia törzshez viszonyított mutációtípus függvényében. A minták közötti különbségek a mutációk számának időbeli növekedését tükrözik, amelyet az antibiotikum-koncentráció növelése okozott a vizsgálat 13 napja alatt. A kezeletlen (0x CTX) mintához viszonyított, a hatóanyag által kiváltott mutációk számát zárójelben tüntettem fel.

Mutáció típusa		0x CTX	1x CTX	10x CTX	100x CTX	1000x CTX
Komplex *	<i>Azonosított</i>	116	120	118 (+1)	117 (+3)	116 (+2)
	<i>Összes</i>	311	309	327	297	305
Deléció	<i>Azonosított</i>	19	20	20	23 (+4)	22 (+3)
	<i>Összes</i>	38	37	38	42	41
Inzerció	<i>Azonosított</i>	3	3	3	16 (+13)	14 (+11)
	<i>Összes</i>	12	12	13	42	33
SNP **	<i>Azonosított</i>	774	779 (+7)	784 (+13)	928 (+161)	927 (+174)
	<i>Összes</i>	1448	1486	1585	1641	1656

*Összetett mutáció, amely többszörös inzerciót, deléciót és szubsztitúciót tartalmazhat;

**egyponos nukleotid polimorfizmus. CTX—cefotaxim.

A cefotaxim-expozíció hatására az amoxicillinhez képest lényegesen komplexebb mutációs változások következtek be. A legfontosabb, komplex aminosavcserét magában foglaló mutáció az *ampC* gén promóter régiójában zajlott [326], olyan változásokat indukálva, amelyek előre jelzik a béta-laktám antibiotikumokkal szembeni enzimatikus inaktiváció fenotípusos kifejeződését (**21. táblázat**).

A 100x és 1000x koncentrációjú cefotaxim-expozíció számos deléciót eredményezett, amelyek elsősorban a mutációjavító fehérjéket meghatározó géneket és a sejtmembrányomás változásainak érzékeléséért felelős géneket érintették.

21. táblázat Az antimikrobiális rezisztencia szempontjából fontosabb komplex mutációk cefotaxim hatására

Gén	0x	1x	10x	100x	1000x	Nukleinsav csere	Hatás	Termék
<i>ampC</i>			x	x	x	GCC-CCA	<i>ampC</i> -promoter p.A2P	A->P aminosav csere
						GTA-GAA	<i>ampC</i> -promoter p.V4E	V->E aminosav csere
						CGG-GGG	<i>ampC</i> -promoter p.R11G	R->G aminosav csere
						CGC-CAC	<i>ampC</i> -promoter p.R8H	R->H aminosav csere
<i>ampC</i>				x	x	meghatározatlan	<i>ampC</i> -promoter n.32T>A	T->A aminosav csere Fenotípus amoxicillin, amoxicillin-clavulánsav, ampicillin, ampicillin- clavulánsav, cefixim, cefotaxim, cefoxitin, ceftazidim, piperacillin rezisztencia a β-laktamáz enzim termelődése miatt.

A—alanin; P—prolin; V—valin; E—glutaminsav; R—arginin; G—glicin; H—hisztidin; T—treonin

Több inzerciót is megfigyeltünk, amelyek közül a *marR* gén mutációjának van jelentősége (**22. táblázat**). Ez a gén represszor operonként hozzájárul a különböző antibiotikumok, például penicillinekkal, cefalosporinokkal, tetraciklinekkel, rifampicinnel, klóramfenikollal és fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia kialakulásához [327, 328].

22. táblázat Az antimikrobiális rezisztencia szempontjából fontos inzerciók a cefotaxim hatására

Gén	0x	1x	10x	100x	1000x	Nukleinsav csere	Hatás	Termék
<i>marR</i>				x		C-CA	leolvasási keret változás c.377dupA p.Asn126fs	többszörös antibiotikum- rezisztencia transzkripció szabályozó

A legösszetettebb változásokat az SNP-k okozták, körülbelül 234-féle gén mutálódott a hatóanyag 10x, 100x és 1000x koncentrációjára reagálva a kezeletlen törzshöz képest. Ezek közül az antibiotikum-rezisztenciával összefüggő mutációkat emeltem ki a **23. táblázatban**. Érdeemes megemlíteni az *acrAB-toIC* pumparendszer működését befolyásoló mutációt, amely az *acrR* represszor génben [329] valamint az *acrB* génben következett be [330, 331]. A *robA* gén az *acrAB* efflux pumpát meghatározó gének pozitív szabályozójaként működik [332]. Szintén figyelemre méltó az *ampC* gén promóter régiójának változása [326] 100x és 1000x koncentrációban. Mutációkat figyeltünk meg az *mrxA* génben, amely a bakteriális sejtfal szintézisében játszik szerepet [333, 334], valamint az *mdtB* génben, amely az *mdtABC-toIC* komplex efflux pumparendszer egyik komponense [30] továbbá az *emrR* génben, amely az *emrAB-toIC* komplex efflux pumparendszer regulátor génje [28].

23. táblázat Az antimikrobiális rezisztencia szempontjából fontos SNP-k a cefotaxim hatására

Gén	0x	1x	10x	100x	1000x	Nukleinsav csere	Hatás	Termék
<i>acrR</i>			x	x	x	T-C	hibás változat c.458T>C p.Met153Thr	multidrug efflux transzporter transzkripció represszor
<i>ampC</i>				x	x	C-T	hibás változás c.922G>A p.Ala308Thr	cefalosporin-hidrolizáló C osztályú béta-βEC-5
<i>acrB</i>			x	x		G-C	hibás változat c.1693C>G p.Pro565Ala	efflux RND transzporter permeáz
						C-T	hibás változat c.2906G>A p.Arg969Gln	
<i>robA</i>			x	x		C-T	hibás változat c.467G>A p.Arg156His hasonló_variáns c.849G>A p.Leu283Leu	MDR efflux pumpa <i>acrAB</i> transzkripció aktivátor
<i>mrcA</i>				x	x	G-A	hibás változat c.772G>A p.Ala258Thr	peptidoglikán glikoziltranszferáz/peptidoglikán DD-transzpeptidáz
<i>mdtB</i>				x		G-A	hibás változat c.805G>A p.Ala269Thr	multidrug efflux RND transzporter permeáz alegység
<i>emrR</i>					x	T-C	hibás változat c.478T>C p.Ser160Pro	multidrug efflux transzporter <i>emrAB</i> transzkripció represszor

5.2.5. Florfenikol fenotípusos eredmények

Florfenikol esetén 10 napra volt szükség, hogy a baktérium teljesen elszaporodjon a lemezen. Az egyes antibiotikum koncentrációt tartalmazó agarsávokból vett minták esetén meghatározott új MIC értékek esetén megfigyelhető, hogy a florfenikol hatására a legtöbb hatóanyag MIC-értéke már az 1x dózis hatására megnőtt, ami a növekvő hatóanyag koncentráció – különösen az 1000x koncentráció – hatására tovább emelkedett. A kolisztin és a neomicin MIC-értéke a florfenikol 1000x koncentrációjának hatására sem változott. Meg kell még említeni az amoxicillint, amelynek MIC-értéke csak a 100x koncentrációban alkalmazott florfenikol hatására kezdett el emelkedni (24. táblázat).

24. táblázat Florfenikol növekvő koncentrációjának hatása a vizsgált hatóanyagok minimális gátló koncentráció (MIC) értékére. Félkövérrel kiemelve azok az értékek láthatóak, amelyek a kiindulási értékhez képest megnövekedett MIC ($\mu\text{g/ml}$) értéket mutattak. Piros kerettel kiemelve láthatók az AMEG B kategóriás hatóanyagok.

Minta	FLO	CTX	CFR	CFT	CFQ	ENR	KOL	OTC	PSA	AMX	NEO
$\mu\text{g/ml}$											
0x FLO	16	0,03	0,25	0,06	0,06	0,003	0,5	2	8	8	16
1x FLO	64	0,125	1	0,125	0,25	0,015	2	4	16	8	16
10x FLO	128	0,5	1	0,25	0,5	0,06	1	16	32	8	32
100x FLO	>512	0,5	0,5	0,5	0,5	0,03	0,125	32	32	16	16
1000x FLO	>512	2	0,5	2	0,5	0,5	0,5	64	64	32	16

FLO—florfenikol, CTX—cefotaxim, CFR—ceftriaxon, CFT—ceftiofur, CFQ—cefkvinom, ENR—enrofloxacin, KOL—kolisztin, OTC—oxitetraciklin, PSA—potenciált szulfonamid (szulfametoxazol, trimetoprim 19:1 arányban), AMX—amoxicillin, NEO—neomicin

A CLSI szabvány szerint elvégzett vizsgálat során egy minta esetén sem volt tapasztalható a hatóanyag önmagában történő használatához képest a klavulánsavval történő kombináció esetén legalább hígítás csökkenés (25. táblázat).

25. táblázat A kiterjedt spektrumú β -laktamáz (ESBL) vizsgálat eredményei a *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) által előírt ceftazidim (CTZ), cefotaxim (CTX) és azok klavulánsavas (KLA) kombinációjával.

Minta	CTZ	CTZ + KLA	Különbség	CTX	CTX + KLA	Különbség
	$(\mu\text{g/ml})$			$(\mu\text{g/ml})$		
0x FLO	0,03	0,015	2x	0,03	0,03	1x
1x FLO	0,03	0,015	2x	0,03	0,03	1x
10x FLO	0,06	0,03	2x	0,06	0,03	2x
100x FLO	0,25	0,125	2x	0,06	0,06	1x
1000x FLO	0,25	0,125	2x	0,125	0,06	2x

AMX—amoxicillin, CTZ—ceftazidim, CTZ + KLA—ceftazidim-klavulánsav, CTX—cefotaxim, CTX + KLA—cefotaxim-klavulánsav

5.2.6. Florfenikol genotípusos eredmények

A contigok minőségellenőrzésének eredményét a 26. táblázat tartalmazza. A readszámok alapján az egyes minták hasonló minőséggel rendelkeznek, a contigok száma is nagyon hasonló.

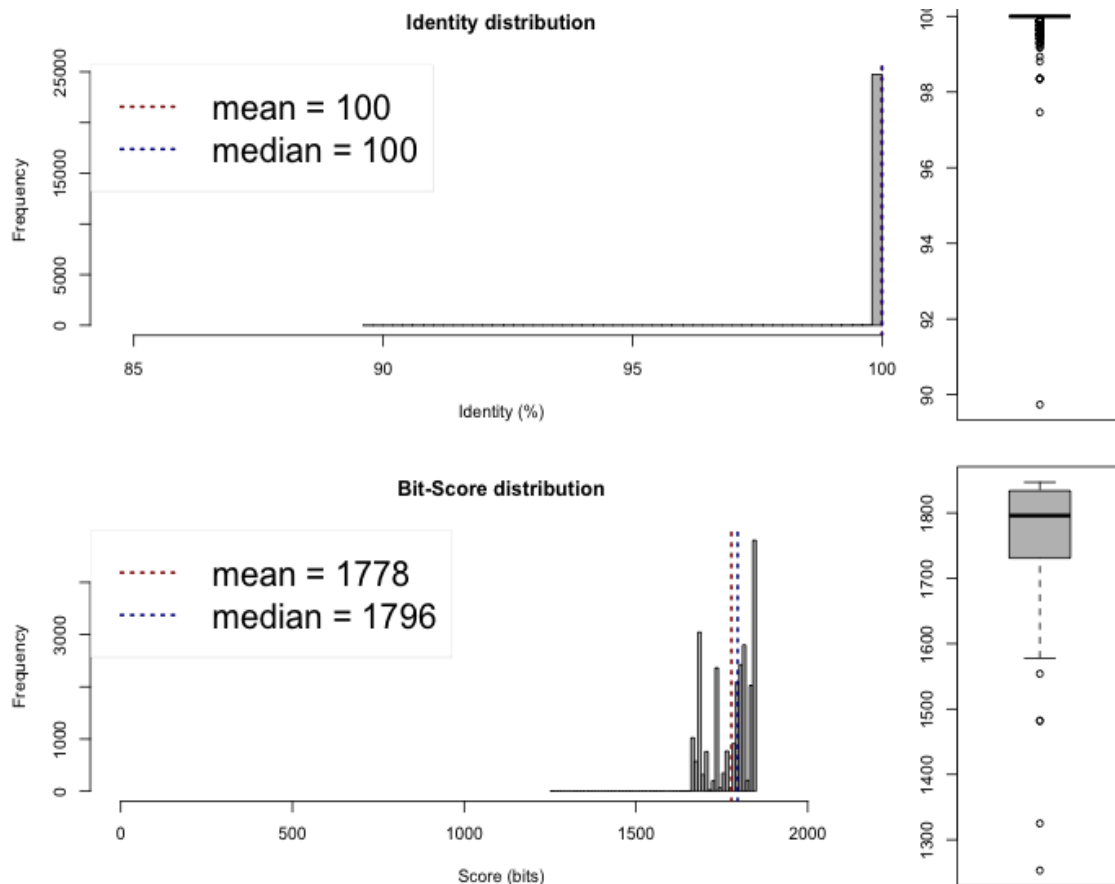
26. táblázat A contigok minőségi adatai a QUASt szoftver elemzése alapján

Minta	Readok	Contigok	Lefedettség	N50	N75	L50	L75
0x FLO	3815950	149	156,64	184825	101461	10	19
1x FLO	4411308	112	169,864	287102	132336	6	13
10x FLO	3049718	128	164,932	194885	104806	8	17
100x FLO	3907460	118	167,917	194926	107365	8	17
1000x FLO	3414732	119	168,079	184922	106685	8	18

FLO-florfenikol

Az mIplasmid szoftver elemzése alapján az összes azonosított ARG kromoszómálisan volt megtalálható. A VirSorter szoftver segítségével végzett vizsgálat alapján fágon hordozott gén volt az összes mintában a *bacA* gén, az *emrB* gén pedig a 10x mintába ugrott át fágra. A MobileElementFinder szoftver segítségével az *ampH* gént a 1x és 10x mintákban, a *bacA* géneket pedig az összes mintában MGE-ként azonosítottam.

A **7. ábrán** látható az ANI v2.0 szoftverrel a 0x és 1000x florfenikol minták genomjai között végzett diverzitáselemzés, ami 99,99%-os faji azonosságot mutat.



7. ábra A 0x és 1000x florfenikol minták genomjai közötti átlagos nukleotid azonosság (ANI) 95% feletti faji azonossággal. One-way ANI 1: 100,0% (SD: 0,10%), 24858 fragmentumból. One-way ANI 2: 99,99% (SD: 0,15%), 24921 fragmentumból. Two-way ANI: 100,0% (SD: 0,07%), 24810 fragmentumból.

A mintákban összesen 8753 db mutáció volt kimutatható, amelyből 4623 db volt azonosítható. Az összes mutáció megoszlása mintánként 1722-1777 db között, az azonosított mutációk megoszlása mintánként 918-933 db között mozgott. Az átfedés a kiindulási 0x mintához képest az 1x minta esetén 101,3%-os, a 10x minta esetén 101,1%, a 100x minta esetén 99,9%-os, az 1000x minta esetén 99,7%-os volt. Az egyes mutáció típusok megoszlását a mintákban a **27. táblázat** tartalmazza.

27. táblázat Az egyes mintákban megfigyelt összes és azok közül azonosított mutációk száma a mutáció típusának függvényében. A kezeletlen (0x FLO) mintához viszonyított, a hatóanyag által kiváltott mutációk számát zárójelben tüntettem fel.

Mutáció típusa		0x FLO	1x FLO	10x FLO	100x FLO	1000x FLO
Komplex *	Azonosított	118	119	118	116	116
	Összes	291	295	291	300	292
Deléció	Azonosított	19	20 (+1)	21 (+2)	21 (+2)	20 (+1)
	Összes	39	41	42	43	41
Inzerció	Azonosított	3	4 (+1)	3	4 (+1)	3
	Összes	13	15	14	15	13
SNP **	Azonosított	781	790	789 (+3)	779 (+3)	779 (+4)
	Összes	1415	1411	1388	1419	1376

*Összetett mutáció, amely többszörös inzerciót, deléció és szubsztitúciót tartalmazhat;

**egy pontos nukleotid polimorfizmus. FLO – florfenikol.

A mintákban a mutációk többsége SNP típusú volt, amelyek közül a legtöbbet az 1x minta esetén azonosítottam; ezt követi a komplex mutáció, amely teljes aminosav kicserélődéssel jár, a legtöbb ilyen mutáció szintén az 1x minta esetén volt megfigyelhető. A deléció egy-egy aminosav elvesztésével járó mutáció, amely leggyakrabban a 10x és 100x mintákban volt megfigyelhető; a legkevesebb az azonosított inzerciók száma volt.

Az antimikrobiális rezisztencia szempontjából jelentős mutációkat a **28. táblázatban** összefoglalt SNP-k okozta genom változások szemléltetik. Ezek kivétel nélkül multidrug efflux pumpát meghatározó génekben bekövetkező egy pontos mutációk voltak, amely mutációk az adott gén expressziójához vezethettek.

28. táblázat Az antimikrobiális rezisztencia szempontjából lényeges géneket érintő mutációk florfenikol hatására

Gén	0x	1x	10x	100x	1000x	Nukleinsav csere	Hatás	Termék
<i>mdtC</i>	x	x	x	x	x	C-A	hibás változat c.1860C>A p.Ser620Arg	multidrug efflux RND transzporter permeáz alegység
<i>mdtN</i>	x	x	x	x	x	G-A	hibás változat c.671C>T p.Thr224Ile	multidrug efflux transzporter periplazmatikus adaptor alegység
<i>emrR</i>			x	x	x	C-A	hibás változat c.129C>A p.Asn43Lys	multidrug efflux transzporter <i>emrAB</i> transzkripció represszor gén
<i>acrB</i>				x	x	T-A	hibás változat c.1706A>T p.Gln569Leu	RND efflux transzporter permeáz
<i>acrR</i>					x	G-A	hibás változat c.506G>A p.Gly169Asp	multidrug efflux transzporter transzkripció represszor gén
<i>robA</i>					x	C-T	hibás változat c.208G>A p.Ala70Thr	MDR efflux pumpa <i>acrAB</i> transzkripció aktivátor gén

A referencia törzshöz képest az *mdtC* és *mdtN* gének mutációja az összes mintában kimutatható volt, ez magyarázatot adhat bizonyos hatóanyagok eleve magas MIC-értékére, aktív multidrug efflux pumpa működése következtében. A kezelés hatására az *emrR* génben bekövetkező mutáció a 10x és 100x mintákban volt kimutatható, amely gén multidrug efflux pumpa szabályozásában játszik szerepet. Az *acrAB-toIC* pumparendszer működését meghatározó *acrB* gén, az ezt szabályozó *acrR* és *robA* gének esetén bekövetkező mutációk fokozott pumpaműködéshez vezethettek.

Az *mdtC* gén egy olyan transzportert határoz meg, amely az *mdtB* génnel heteromultimer komplexet alkot, így egy multidrug-transzportert képez. Az *mdtBC* az *mdtABC-toIC* efflux-komplex része. *MdtB* hiányában az *mdtC* homomultimer komplexet képezhet, amely egy működő efflux komplexet eredményez, szűkebb gyógyszer-spektrummal [30]. A mintáinkból mindhárom említett gént sikerült kimutatni, feltételezhetjük, hogy a referencia genomhoz képest eleve megtalálható mutáció eredményezte a vizsgált *E. coli* törzs számos hatóanyaggal szembeni magas kiindulási MIC-értékét.

Az *mdtN* gén egy multidrug-rezisztencia efflux pumpát határoz meg. Részt vehet a puromicin-acriflavinnal és a tetrafenilarsónium-kloriddal szembeni rezisztencia kialakításában [335–337]. Ezt a gént szintén az összes mintából kimutattam, ami arra utal, hogy az eleve megtalálható mutáció hozzájárult egyes hatóanyagok esetén a magas kiindulási MIC-értékhez.

Az *emrR* gén az *emrAB-toIC* multidrug efflux pumpa komplex negatív szabályozója az *E. coli*-ban. Mutációi az *emrAB-toIC* komplex kifejeződéséhez vezetnek [28]. A minták közül az 10x és 100x mintákban megjelenő mutáció hozzájárulhatott a multidrug efflux pumpa kifejeződéséhez, amely komplex pumparendszer mindegyik elemét az összes mintában azonosítottam (*emrA*, *emrB*, *toIC*). Az *emrA* és *emrB* gén különösen az enrofloxacin, a *toIC* gén pedig szinte az összes többi hatóanyag kipumpálásáért felelős efflux pumpa kifejeződéséért felel, továbbá magyarázatot adhatnak a magas florfenikol koncentrációk hatására bekövetkező más hatóanyagok MIC-értékének növekedésére.

Az *acrB* gén az *acrAB-toIC* multidrug efflux komplex fehérje alegysége. Az *acrB* egy heterotrimerként működik, amely a belső membránkomponenst alkotja, és elsősorban a szubsztrát felismerésért és az energia transzdukcióért felelős, mivel gyógyszer-proton antiporterként működik [330, 331, 338, 339]. Mutációja a 100x és 1000x florfenikol koncentráció hatására következett be, amely szintén hozzájárulhatott a megemelkedett MIC-értékekhez.

Az *acrR* gén az *acrAB-toIC* multidrug efflux komplex represszora. Az *acrR* mutációi magas szintű antibiotikum-rezisztenciát eredményeznek [329]. Ennek a génnek a mutációja

csak az 1000x florfenikol koncentrációval kezelt minta esetén volt kimutatható, ami valószínűleg hozzájárult a további MIC érték növekedéséhez.

A *robA* gén az *acrAB* efflux pumpát meghatározó gének pozitív szabályozója, és szerkezetileg hasonló a *soxS* és a *marA* génekhez [25, 340]. Ennek a mutációja szintén csak az 1000x florfenikol koncentrációval kezelt minta esetén volt kimutatható, így hozzájárulhatott a magas MIC-értékek kialakulásához.

5.2.7. Enrofloxacin fenotípusos eredmények

Enrofloxacin hatóanyag esetén 10 napra volt szükség, hogy az *E. coli* törzs teljesen elszaporodjon a MEGA-platen. Enrofloxacin hatására minden vizsgált hatóanyagnál MIC-érték növekedést tapasztaltunk az 1000x koncentráció esetében, ceftriaxon és ceftiofur esetén ez már a 100x koncentrációnál is megfigyelhető volt (29. táblázat).

29. táblázat Enrofloxacin növekvő koncentrációjának hatása a vizsgált hatóanyagok minimális gátló koncentráció (MIC) értékére. Félkövérrel kiemelve azok az értékek láthatóak, melyek a kiindulási értékhez képest megnövekedett MIC (µg/ml) értéket mutattak. Piros kerettel kiemelve láthatók az AMEG B kategóriás hatóanyagok.

Minta	ENR	CTX	CFR	CFT	CFQ	KOL	AMX	OTC	PSA	FLO	NEO
	µg/ml										
0x ENR	0,003	0,03	0,25	0,06	0,06	0,5	8	2	8	16	16
1x ENR	0,03	0,03	0,25	0,06	0,06	0,5	8	2	8	16	16
10x ENR	0,25	0,03	0,25	0,06	0,06	0,5	8	2	16	32	16
100x ENR	0,5	0,03	0,5	0,125	0,06	0,5	8	2	16	32	16
1000x ENR	4	1	1	0,5	0,5	8	32	8	64	256	16

ENR—enrofloxacin, CTX—cefotaxim, CFR—ceftriaxon, CFT—ceftiofur, CFQ—cefkvinom, KOL—kolisztin, AMX—amoxicillin, OTC—oxitetraciklin, PSA—potenciált szulfonamid (szulfametoxazol, trimetoprim 19:1 arányban), FLO—florfenikol, NEO—neomicin

Az enrofloxaccinnal kezelt törzsek esetén sem tapasztaltunk ESBL termelésre utaló MIC-érték csökkenést a CLSI protokollt követve (30. táblázat).

30. táblázat A kiterjedt spektrumú β-laktamáz (ESBL) vizsgálat eredményei a *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) által előírt ceftazidim (CTZ), cefotaxim (CTX) és azok klavulánsavas (KLA) kombinációjával.

Minta	CTZ			CTX		
	CTZ	CTZ + KLA	Különbség	CTZ	CTZ + KLA	Különbség
	(µg/ml)			(µg/ml)		
0x ENR	0,03	0,03	1x	0,03	0,03	1x
1x ENR	0,03	0,03	1x	0,03	0,03	1x
10x ENR	0,03	0,03	1x	0,03	0,03	1x
100x ENR	0,03	0,03	1x	0,03	0,03	1x
1000x ENR	0,03	0,03	1x	1	0,5	2x

AMX—amoxicillin, CTZ—ceftazidim, CTZ + KLA—ceftazidim-klavulánsav, CTX—cefotaxim, CTX + KLA—cefotaxim-klavulánsav

5.2.8. Enrofloxacin genotípusos eredmények

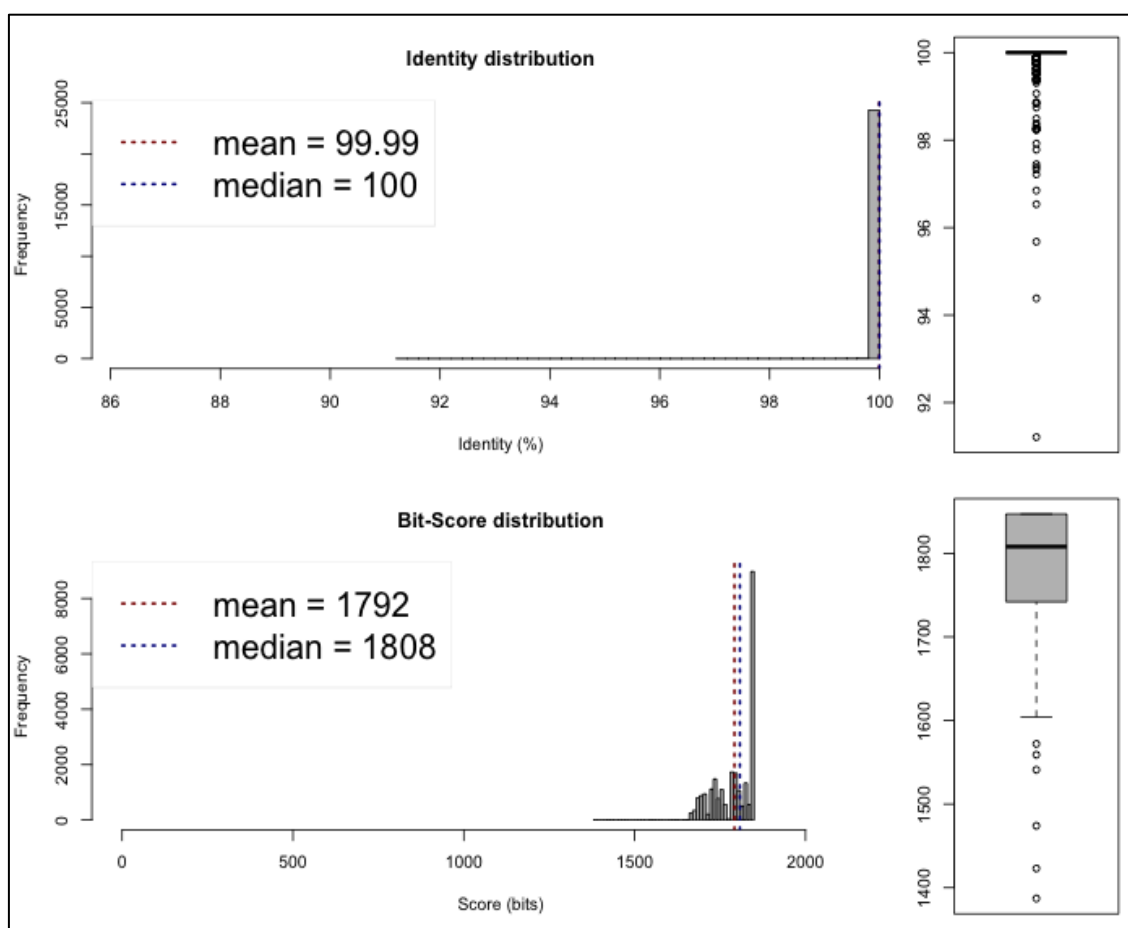
Enrofloxacin esetén a contigok minőségellenőrzésének eredményét a **31. táblázat** tartalmazza. Az egyes minták hasonló minőséget tükröznek.

31. táblázat A contigok minőségi adatai a QFAST szoftver elemzése alapján

Minta	Readek	Contigok	Lefedettség	N50	N75	L50	L75
0x ENR	2644967	244	64,75	94103	45377	16	35
1x ENR	2439834	229	59,71	102465	49984	16	32
10x ENR	2330488	126	57,09	105213	50556	14	30
100x ENR	2280520	130	55,89	115841	85532	14	26
1000x ENR	2373082	204	58,67	112848	58288	15	29

ENR – enrofloxacin

A **8. ábrán** látható az ANI v2.0 szoftverrel a 0x és 1000x enrofloxacin minták genomjai között végzett diverzitáselemzés, ami 99,99%-os faji azonosságot mutat.



8. ábra A 0x és 1000x florfenicol minták genomjai közötti átlagos nukleotid azonosság (ANI) 95% feletti faji azonossággal. One-way ANI 1: 99,99% (SD: 0,34%), 24474 fragmentumból. One-way ANI 2: 99,99% (SD: 0,10%), 24422 fragmentumból. Two-way ANI: 99,99% (SD: 0,10%), 24365 fragmentumból.

Az azonosított ARG-k közül a plazmidon nem tudtam igazolni gén jelenlétét egyik minta esetén sem, a korábbiakhoz hasonlóan a *bacA* gén fágon volt megtalálható az összes minta esetén. Az *emrB* gén a 10× mintában, az *acrA* gén, a *gadW* gén, a *gadX* gén, az *mdtE*, az *mdtF*, az *mdtN*, az *mdtO* és az *mdtP* gének, és a *tolC* gén csak a kiindulási mintában volt fágon azonosítható; amennyiben a 10 000 bázispáron belüli kritériumnak megfelelően értékeltük az eredményeket. MGE-ként azonosítottam a kiindulási mintában az *acrS*, az *mdtN*, az *mdtP*, az *mdtO* és a *tolC* géneket, az *acrE* és *acrF* gének a 0× és a 10× mintában voltak MGE-k. A *bacA* gén az összes mintában MGE volt. Az *ampH* gén csak a 10× mintában, az *ugd* gén pedig az 1×, a 100× és az 1000× mintákban volt MGE.

A mintákban összesen 9063 db mutáció volt kimutatható, amelyből 4483 db volt azonosítható. Az összes mutáció megoszlása mintánként 1631-1936 db között, az azonosított mutációk megoszlása mintánként 765-933 db között mozgott. Az átfedés a kiindulási 0× mintához képest az 1x minta esetén 100,0%-os, a 10x minta esetén 100,6%, a 100x minta esetén 100,4%-os, az 1000x minta esetén 82,5%-os volt. Az egyes mutáció típusok megoszlását a mintákban a **32. táblázat** tartalmazza.

32. táblázat Az egyes mintákban megfigyelt összes és azok közül azonosított mutációk száma a mutáció típusának függvényében. A kezeletlen (0× ENR) mintához viszonyított, a hatóanyag által kiváltott mutációk számát zárójelben tüntettem fel.

Mutáció típusa		0× ENR	1× ENR	10× ENR	100× ENR	1000× ENR
Komplex*	<i>Azonosított</i>	116	119	120 (+2)	122 (+1)	86 (+3)
	<i>Összes</i>	295	309	321	318	270
Deléció	<i>Azonosított</i>	19	17	19	22 (+2)	22 (+1)
	<i>Összes</i>	39	35	38	42	38
Inzerció	<i>Azonosított</i>	4	3	3	5 (+2)	9 (+6)
	<i>Összes</i>	12	12	12	14	17
SNP**	<i>Azonosított</i>	788	788 (+6)	791 (+9)	782 (+11)	648 (+32)
	<i>Összes</i>	1454	1458	1565	1508	1306

*Összetett mutáció, amely többszörös inzerciót, deléció és szubsztitúciót tartalmazhat;
**egy pontos nukleotid polimorfizmus. ENR—enrofloxacin

Az antimikrobiális rezisztencia kialakulásának szempontjából fontos ARG mutációkat a **33. táblázat** foglalja össze. A *parC* gén esetén egy komplex mutáció volt megfigyelhető, ez a gén a topoisoméráz IV alegysége, amely dekaténálja és lazítja a DNS-t, ezáltal lehetővé teszi a gének hozzáférést a transzkripcióhoz vagy a translációhoz. A *parC* pontmutációi megakadályozzák, hogy a fluorokinolonok gátolják a DNS-szintézist, és alacsony szintű rezisztenciát eredményeznek. A magasabb szintű rezisztencia a *gyrA* és a *parC* együttes mutációiból ered [180].

Az *acrR* gén esetén deléció és inzerció is megfigyelhető volt, ez a gén az *acrAB-toIC* multidrug efflux pumparendszer represszora. Mutációi magas szintű antibiotikum-rezisztenciát eredményeznek [329]. Antibiotikum jelenlétében az *E. coli* túlexpresszálja a *marR* regulátor gént, ami a *marA* aktivátor fehérje expresszióját váltja ki, az pedig az *acrAB* multidrug efflux pumpa indukálása mellett az *ompF* porin szintézisét is lefelé szabályozza [134, 328]. Az *acrA* génben már a hatóanyag 10x koncentrációja esetén bekövetkezett egy pontmutáció, ami a 100x és 1000x koncentrációk esetén is megfigyelhető volt. Ez a gén az *acrA-AcrB-ToIC* multidrug efflux komplex transzportfehérje periplazmatikus részét képviseli [125]. A *robA* gén az *acrAB* efflux pumparendszer pozitív szabályozója [25, 340], pontmutációja a 10x koncentráció esetén volt megfigyelhető. Az *emrR* gén esetén csak az 1000x koncentráció hatására figyeltünk meg pontmutációt, ami az *emrAB-toIC* multidrug efflux pumpa komplex kifejeződéséhez vezethet [28].

33. táblázat Az antimikrobiális rezisztencia szempontjából enrofloxacin hatóanyag indukálta fontosabb mutációk

Gén	0x	1x	10x	100x	1000x	Nukleinsav csere	Hatás	Termék
KOMPLEX*								
<i>parC</i>					x	GCA-ACC	hibás változat c.321_323delTGCinsGGT p.Ala108Val	DNS topoizomeráz IV A alegység
DELÉCIO								
<i>acrR</i>					x	CA-C	leolvasási keret változás c.430delA p.Thr144fs	multidrug efflux transzporter transzkripció represszor gén
INZERCIO								
<i>acrR</i>					x	T-TG	leolvasási keret változás c.190dupG p.Glu64fs	multidrug efflux transzporter transzkripció represszor gén
<i>marR</i>					x	G-GA	leolvasási keret változás c.186dupA p.Val63fs	többszörös antibiotikum- rezisztencia transzkripció szabályozó gén
<i>ompF</i>				x	x	A-ATC G-GC	leolvasási keret változás c.27_28dupGA p.Ile10fs leolvasási keret változás c.433dupG p.Ala145fs	porin
SNP**								
<i>acrA</i>		x	x	x		C-T	hasonló változat c.150G>A p.Leu50Leu	multidrug efflux RND transzporter periplazmatikus adaptor alegység <i>acrA</i>
<i>emrR</i>					x	T-C	hibás változat c.478T>C p.Ser160Pro	multidrug efflux transzporter <i>emrAB</i> transzkripció represszor gén
<i>gyrA</i>		x	x	x		T-C	hibás változat c.260A>G p.Asp87Gly	DNS topoizomeráz (ATP- hidrolizáló) A alegység
<i>robA</i>		x				C-T	hibás változat c.467G>A p.Arg156His	MDR efflux pumpa <i>acrAB</i> transzkripció aktivátor gén

*Összetett mutáció, amely többszörös inzerciót, deléció és szubsztitúciót tartalmazhat

**egy pontos nukleotid polimorfizmus.

A hatóanyagcsoporttal szemben rezisztenciát kialakító gének közül a legfontosabb a *gyrA* és *parC* gén, amelyekben mutációt figyeltünk meg a 10x, 100x és 1000x

koncentrációk hatására. A gén mutációja a fluorokinolon hatóanyag kötődésének kisebb affinitását eredményezi, ami a DNS-szintézis gátló hatás csökkenéséhez vezet [174]. A *parC* és a *gyrA* mutációi együttesen nagymértékű MIC-érték növekedést eredményeznek, amit jól tükröznek az enrofloxacinnal szemben jelentős mértékben megnövekedett MIC-értékek. Továbbá az 1000x mintában az ún. SOS box gének működését szabályozó *uveY* génben is megfigyeltünk pontmutációt.

5.2.9. Kolisztin fenotípusos eredmények

Kolisztin esetén 12 napra volt szükség a teljesen benője a lemezt a baktériumtörzs. A hatóanyag MIC-értékének növekedésén kívül más hatóanyagok esetében nem tapasztaltuk MIC-érték növekedést, még a magas koncentrációk hatására sem (**34. táblázat**).

34. táblázat Kolisztin növekvő koncentrációjának hatása a vizsgált hatóanyagok minimális gátló koncentráció (MIC) értékére. Félkövérrel kiemelve azok az értékek láthatóak, melyek a kiindulási értékhez képest megnövekedett MIC ($\mu\text{g/ml}$) értéket mutattak. Piros kerettel kiemelve láthatók az AMEG B kategóriás hatóanyagok.

Minta	KOL	CTX	CFR	CFT	CFQ	ENR	AMX	OTC	PSA	FLO	NEO
$\mu\text{g/ml}$											
0x KOL	0,5	0,03	0,25	0,06	0,06	0,003	8	2	8	16	16
1x KOL	0,5	0,03	0,25	0,06	0,06	0,007	8	2	8	16	16
10x KOL	1	0,03	0,25	0,06	0,06	0,007	8	2	8	16	16
100x KOL	32	0,03	0,25	0,06	0,06	0,003	8	2	8	16	16
1000x KOL	64	0,03	0,25	0,06	0,06	0,003	8	2	8	16	16

KOL—kolisztin, CTX—cefotaxim, CFR—ceftriaxon, CFT—ceftiofur, CFQ—cefquinom, ENR—enrofloxacin, AMX—amoxicillin, OTC—oxitetraciklin, PSA—potenciált szulfonamid (szulfametoxazol, trimetoprim 19:1 arányban), FLO—florfenikol, NEO—neomicin

Az ESBL termelésre irányuló vizsgálat továbbra is negatívnak bizonyult (**35. táblázat**).

35. táblázat A kiterjedt spektrumú β -laktamáz (ESBL) vizsgálat eredményei a *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) által előírt ceftazidim (CTZ), cefotaxim (CTX) és azok klavulánsavas (KLA) kombinációjával.

Minta	CTZ	CTZ + KLA	Különbség	CTX	CTX + KLA	Különbség
	$(\mu\text{g/ml})$			$(\mu\text{g/ml})$		
0x KOL	0,03	0,03	1x	0,03	0,03	1x
1x KOL	0,03	0,03	1x	0,03	0,03	1x
10x KOL	0,03	0,03	1x	0,03	0,03	1x
100x KOL	0,03	0,03	1x	0,03	0,03	1x
1000x KOL	0,03	0,03	1x	0,03	0,03	1x

KOL—kolisztin, CTZ—ceftazidim, CTZ + KLA—ceftazidim-klavulánsav, CTX—cefotaxim, CTX + KLA—cefotaxim-klavulánsav

5.2.10. Kolisztin genotípusos eredmények

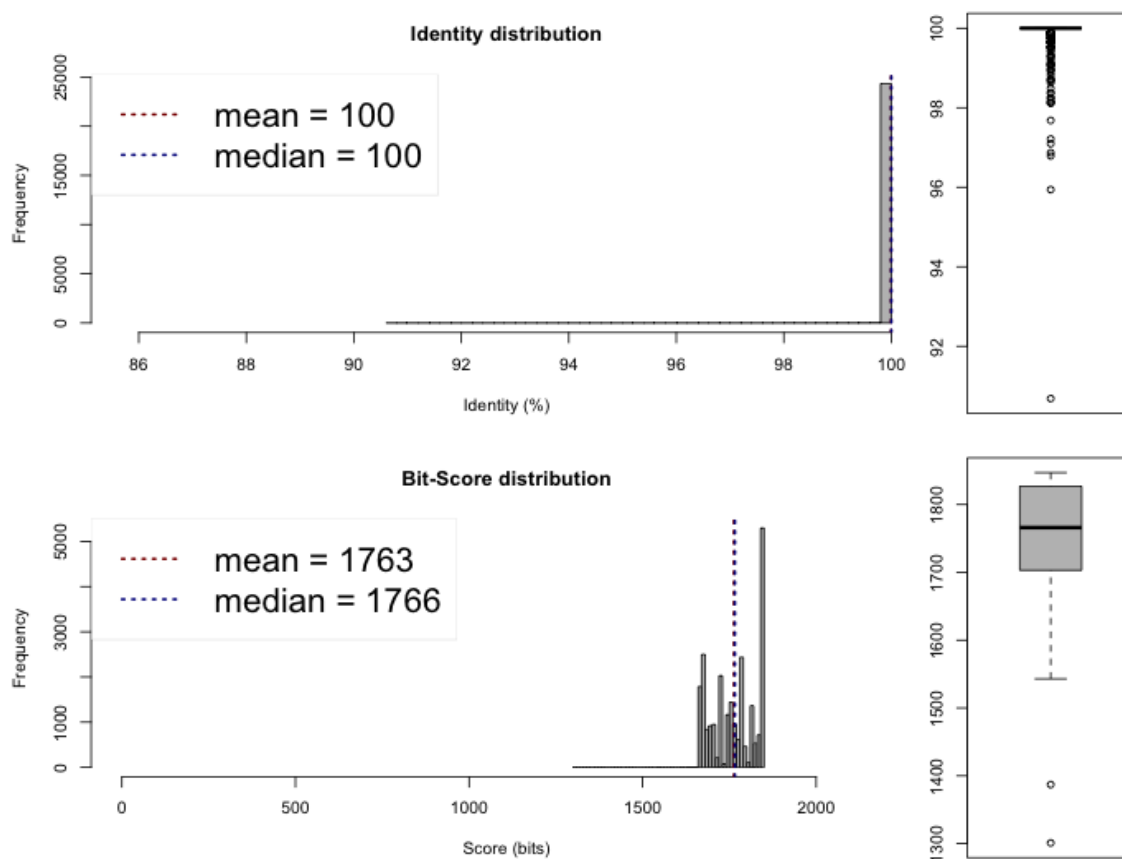
A contigok minőségellenőrzésének eredményeit a **36. táblázat** foglalja össze.

36. táblázat A contigok minőségi adatai a QUASt szoftver elemzése alapján, kolisztin esetén

Minta	Read	Contig	Lefedettség	N50	N75	L50	L75
0x KOL	2285020	98	55,88	166545	85600	9	20
1x KOL	2783075	211	68,17	104917	57800	15	30
10x KOL	2425599	213	59,44	110862	57795	15	30
100x KOL	2546257	227	62,31	104843	57853	15	30
1000x KOL	2658682	146	65,34	89274	44932	18	36

KOL - kolisztin

A **9. ábrán** látható az a 0x és 1000x kolisztin minták ANI v2.0 szoftverrel történő genomjai között végzett diverzitáselemzés, ami 99,99%-os faji azonosságot mutat.



9. ábra A 0x és 1000x florfenikol minták genomjai közötti átlagos nukleotid azonosság (ANI) 95% feletti faji azonossággal. One-way ANI 1: 99,99% (SD: 0,31%), 24570 fragmentumból. One-way ANI 2: 100,0% (SD: 0,11%), 24467 fragmentumból. Two-way ANI: 100,0% (SD: 0,09%), 24409 fragmentumból.

Az azonosított ARG-k közül a *bacA* gén minden mintában fágón volt megtalálható. Az *emrB* gén viszont csak az 1000x mintában került át fágra. Plazmidon nem azonosítottam ARG-t. Az MGE-ként való hordozás tekintetében a *bacA* gén az összes mintában mobilis volt, az *ampH* gén esetén viszont csak az 1000x mintában azonosítottam azt MGE-ként.

A mintákban összesen 9279 db mutáció volt kimutatható, amelyből 4654 db volt azonosítható. Az összes mutáció megoszlása mintánként 1833-1896 db között, az azonosított mutációk megoszlása mintánként 922-938 db között mozgott a referencia genomhoz képest. Az átfedés a kiindulási 0x mintához képest az 1x minta esetén 100,5%-os, a 10x minta esetén 99,6%, a 100x minta esetén 99,9%-os, az 1000x minta esetén 98,8%-os volt. Az egyes mutáció típusok megoszlását a mintákban a **37. táblázat** tartalmazza.

37. táblázat Az egyes mintákban megfigyelt összes és azok közül azonosított mutációk száma a mutáció típusának függvényében. A kezeletlen (0x KOL) mintához viszonyított, a hatóanyag által kiváltott mutációk számát zárójelben tüntettem fel.

Mutáció típusa		0x KOL	1x KOL	10x KOL	100x KOL	1000x KOL
Komplex*	<i>Azonosított</i>	122	124 (+4)	121 (+2)	123 (+4)	115
	<i>Összes</i>	312	315	310	316	314
Deléció	<i>Azonosított</i>	20	20	19	20	20
	<i>Összes</i>	40	38	40	40	40
Inzerció	<i>Azonosított</i>	3	4 (+1)	3	3	3
	<i>Összes</i>	12	14	12	12	11
SNP**	<i>Azonosított</i>	788	790 (+5)	786 (+4)	786 (+5)	784 (+9)
	<i>Összes</i>	1498	1480	1479	1465	1531

*Összetett mutáció, amely többszörös inzerciót, deléció és szubsztitúciót tartalmazhat; **egy pontos nukleotid polimorfizmus. KOL—kolisztin

Kolisztin esetén a mutációk száma meglehetősen kevés a többi vizsgált hatóanyaghoz képest (**38. táblázat**), összesen 18-féle génben volt pontmutáció tapasztalható, amelyek közül két gén kapcsolódik közvetlenül a rezisztencia kialakításához. Összesen két olyan génben sikerült mutációt azonosítani (**38. táblázat**), amely kapcsolódik az antimikrobiális rezisztencia kialakításához. Az *ftsI* gén esetében *K. pneumoniae*-ban írták le tige ciklin mutációs szelekciós nyomását, ami deléció következtében a kolisztin MIC-értékének növekedésében nyilvánult meg [341]. A vizsgálataink során kolisztin hatására egy SNP mutáció volt megfigyelhető a 100x és 1000x minták esetében.

Antibiotikum jelenlétében, stresszhatás következtében az *ompC* porin fehérjét meghatározó gén az *ompF* génnel együtt downregulálódik. Ez a sejtmembrán áteresztő képességének csökkenéséhez vezet, ami a β -laktámokkal szembeni rezisztencia kialakulásához vezet. Leírták, hogy ennek következtében a tetraciklinel szemben rezisztenciát kialakító effluxpumpa gének upregulálódnak [342]. Ez a mutáció azonban csak az 1x kolisztin koncentrációval kezelt mintában volt megfigyelhető a referencia törzshöz képest.

38. táblázat Az antimikrobiális rezisztencia szempontjából lényeges SPN mutációk kolisztin hatására

Gén	0x	1x	10x	100x	1000x	Nukleinsav csere	Hatás	Termék
<i>ftsI</i>				x	x	T-A	hibás változat c.1698T>A p.Asp566Glu	peptidoglikán glikoziltranszferáz
<i>ompC</i>		x				G-A	hasonló változat c.498C>T p.Val166Val	porin

5.2.11. Potenciált szulfonamid fenotípusos eredmények

Ebben az esetben 7 napra volt szükség, hogy a baktérium benője a legnagyobb koncentrációt tartalmazó sávot. Potenciált szulfonamid hatására az összes vizsgált hatóanyag MIC-érték növekedését figyeltük meg a 100x és az 1000x koncentrációk hatására (**39. táblázat**).

39. táblázat Potenciált szulfonamid növekvő koncentrációjának hatása a vizsgált hatóanyagok minimális gátló koncentráció (MIC) értékére. Félkövérrel kiemelve a megnövekedett MIC ($\mu\text{g/ml}$) értéket mutató minták. Piros kerettel kiemelve láthatók az AMEG B kategóriás hatóanyagok.

Minta	PSA	CTX	CFR	CFT	CFQ	ENR	KOL	OTC	AMX	FLO	NEO
		$\mu\text{g/ml}$									
0x PSA	8	0,03	0,25	0,06	0,06	0,003	0,5	2	8	16	16
1x PSA	8	0,03	0,5	0,06	0,06	0,003	0,5	2	8	16	32
10x PSA	256	1	1	0,25	0,25	0,06	0,5	2	32	128	32
100x PSA	512	2	1	0,5	0,5	0,06	32	4	64	256	64
1000x PSA	>512	2	2	4	1	0,5	32	16	64	512	64

PSA—potenciált szulfonamid (szulfametoxazol, trimetoprim 19:1 arányban), CTX—cefotaxim, CFR—ceftriaxon, CFT—ceftiofur, CFQ—cefkvinom, ENR—enrofloxacin, KOL—kolisztin, OTC—oxitetraciklin, AMX—amoxicillin, FLO—florfenikol, NEO—neomicin

Az ESBL termelésre irányuló vizsgálat ebben az esetben is negatív volt (**40. táblázat**).

40. táblázat A kiterjedt spektrumú β -laktamáz (ESBL) vizsgálat eredményei a *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) által előírt ceftazidim (CTZ), cefotaxim (CTX) és azok klavulánsavas (KLA) kombinációjával.

Minta	CTZ	CTZ + KLA	Különbség	CTX	CTX + KLA	Különbség
	$(\mu\text{g/ml})$			$(\mu\text{g/ml})$		
0x PSA	0,03	0,03	1x	0,03	0,03	1x
1x PSA	0,03	0,03	1x	0,03	0,03	1x
10x PSA	0,5	0,25	2x	1	0,5	2x
100x PSA	0,5	0,25	2x	2	2	1x
1000x PSA	0,5	0,5	1x	2	2	1x

AMX—amoxicillin, CTZ—ceftazidim, CTZ + KLA—ceftazidim-klavulánsav, CTX—cefotaxim, CTX + KLA—cefotaxim-klavulánsav

5.2.12. Potenciált szulfonamid genotípusos eredmények

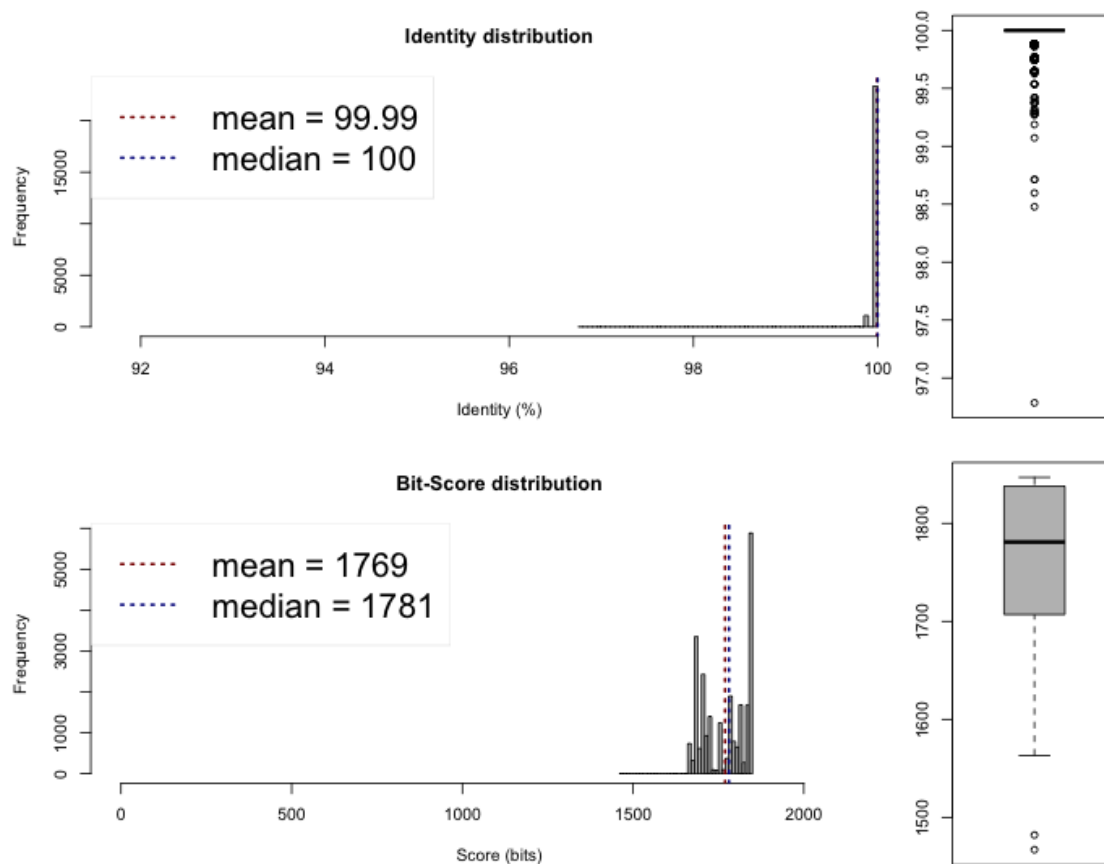
A contigok minőségellenőrzését követően kapott eredmények tükrözik a szekvenálás minőségét (41. táblázat).

41. táblázat A contigok minősége a QCAST szoftver elemzése alapján, potenciált szulfonamid minták esetén

Minta	Read	Contig	Lefedettség	N50	N75	L50	L75
0x PSA	3362592	115	164,453	192736	107365	7	16
1x PSA	3600632	124	169,511	202436	107365	8	17
10x PSA	2992404	130	166,197	184845	111826	10	18
100x PSA	3978966	144	160,161	144711	81368	12	23
1000x PSA	3099440	131	145,395	160547	104931	10	20

PSA — potenciált szulfonamid (szulfametoxazol és trimetoprim 19:1 arányban)

A **10. ábrán** láthatjuk a potenciált szulfonamiddal nem kezelt (0x) és annak 1000x koncentrációjával kezelt minták genomjai közötti diverzitáselemzést, ami 99,99%-os faji azonosságot mutat.



10. ábra A 0x és 1000x potenciált szulfonamid minták genomjai közötti átlagos nukleotid azonosság (ANI) 95% feletti faji azonossággal. One-way ANI 1: 99.98% (SD: 0.44%), 24651 fragmentumból. One-way ANI 2: 99.99% (SD: 0.11%), 24584 fragmentumból. Two-way ANI: 99.99% (SD: 0.04%), 24544 fragmentumból.

Az azonosított ARG-k közül a *bacA* gén az összes mintában fágon volt megtalálható. A 10× és az 1000× koncentrációval kezelt minták esetén viszont az *emrB* gén is átkerült fágra. A *bacA* gén továbbá minden esetben MGE volt egyben, az 1× és 10× mintákban viszont az *acrE* és *acrF* gének is MGE-ként jelennek meg.

A **42. táblázat** összefoglalja a mintákban megfigyelt mutációk számát a referencia genomhoz képest. A mintákban összesen 9278 db mutáció volt kimutatható, amelyből 4935 db volt azonosítható. Az összes mutáció megoszlása mintánként 1752-1958 db között, az azonosított mutációk megoszlása mintánként 923-1074 db között mozgott a referencia genomhoz képest. Az átfedés a kiindulási 0x mintához képest az 1× minta esetén 101,6%-os, a 10× minta esetén 107,3%, a 100× minta esetén 109,4%-os, az 1000× minta esetén 116,4%-os volt.

42. táblázat Az egyes mintákban megfigyelt összes és azok közül azonosított mutációk száma a mutáció típusának függvényében

Mutáció típusa		0× PSA	1× PSA	10× PSA	100× PSA	1000× PSA
Komplex*	Azonosított	118	122	115	115	117 (+1)
	Összes	293	310	300	286	294
Deléció	Azonosított	20	20	21 (+3)	27 (+3)	29 (+11)
	Összes	42	42	48	56	68
Inzerció	Azonosított	4	4	12 (+8)	14 (+10)	15 (+12)
	Összes	15	14	23	27	25
SNP**	Azonosított	781	792 (+1)	842 (+54)	854 (+82)	913 (+114)
	Összes	1402	1465	1510	1487	1571

*Összetett mutáció, amely többszörös inzerciót, deléció és szubsztitúciót tartalmazhat;

**egypontos nukleotid polimorfizmus. PSA—potenciált szulfonamid

A **43. táblázat** összefoglalja azokat a mutációkat, amelyek az antimikrobiális rezisztencia fenotípusos kifejeződéséhez hozzájárulhattak.

Az *emrR* gén deléciós mutációja az 1000× mintában volt megfigyelhető, ami az *emrAB-toIC* multidrug efflux pumparendszer kifejeződéséhez vezethet [28]. Az *mdtM* gén egy multirezisztenciáért felelős fehérjét határoz meg és bizonyították az *acrAB-toIC* pumparendszerrel való kölcsönhatását. Ennek a génnek a deléciója volt megfigyelhető a hatóanyag 1000x koncentrációjának hatására. Egy olyan transzmembrán gyógyszer/H+ antiporterről van szó, ami *E. coli* esetén több hatóanyaggal szembeni rezisztencia kialakulásához vezet [343]. Az *yfiB* gén egy *ompA* külső membrán lipoprotein [344], aminek mutációja rezisztencia kialakulásához vezethetnek például *E. coli*-ban [162, 184]; deléciója az 1000× mintában következett be.

43. táblázat Az antimikrobiális rezisztencia szempontjából lényeges géneket érintő deléciók, inverziók és SNP-k

Gén	0x	1x	10x	100x	1000x	Nukleinsav kicserélődés	Hatás	Termék	
DELÉCIO									
<i>emrR</i>					x	GA-G	leolvasási keret változás c.291delA p.Lys97fs	multidrug efflux transzporter EmrAB transzkripció represszor gén	
<i>mdtM</i>					x	CA-C	leolvasási keret változás c.15delT p.Phe5fs	multidrug efflux MFS transzporter gén	
<i>yfiB</i>					x	GA-G	leolvasási keret változás c.405delA p.Lys135fs	<i>ompA</i> családba tartozó fehérje	
INZERZIO									
<i>acrF</i>					x	T-TC	leolvasási keret változás c.1281dupC p.Arg428fs	multidrug efflux RND transzporter permeáz alegység	
<i>mdtF</i>				x		G-GT	leolvasási keret változás c.33dupT p.Ala12fs	multidrug efflux szivattyú RND permeáz gén	
SNP									
<i>acrB</i>	x	x	x	x	x	T-C	leolvasási keret változás c.985A>G p.Thr329Ala	efflux RND transzporter permeáz	
						A-G	leolvasási keret változás c.1186T>C p.Phe396Leu		
						A-G	leolvasási keret változás c.95T>C p.Val32Ala		
						T-C	leolvasási keret változás c.1703A>G p.Asp568Gly		
<i>acrR</i>				x		A-T	leolvasási keret változás c.557A>T p.Asp186Val	multidrug efflux transzporter transzkripció represszor gén	
<i>folA</i>					x		C-T	leolvasási keret változás c.62C>T p.Pro21Leu	3. típusú dihidrofolát reduktáz
<i>folP</i>		x	x	x	x		C-T	leolvasási keret változás c.674G>A p.Gly225Glu	dihidropteroát-szintáz
							G-A	leolvasási keret változás c.190C>T p.Pro64Ser	
							T-C	leolvasási keret változás c.184A>G p.Thr62Ala	
<i>marR</i>				x		A-G	leolvasási keret változás c.254A>G p.Glu85Gly	többszörös antibiotikum-rezisztencia transzkripció szabályozó gén	
<i>mdtB</i>				x			T-C	hasonló változat c.2883T>C p.Cys961Cys	multidrug efflux RND transzporter permeáz alegység
<i>mdtF</i>					x		A-G	hibás változat c.2510A>G p.Asp837Gly	multidrug efflux pumpa RND permeáz gén

Az *acrF* gén inverziója az 1000x mintában következett be, ami az *acrB* génhez hasonló belső membrán transzporter, ami multidrug efflux pumpák működését befolyásolja az *acrEF-toIC* komplex működésében [27]. Az *mdtF* gén deléciója és SNP-ja a 100x mintában volt megfigyelhető, az *mdtEF-toIC* multidrug efflux pumparendszer belső membrán transzporterét határozza meg [345].

Az SNP-k közül ki kell emelni az *acrB* gén 1x, 10x, 100x és 1000x mintákban bekövetkezett mutációját, ami az *acrAB-toIC* multidrug efflux komplex fehérje alegysége, egy heretrotrimerként működik, a belső membránkomponenst alkotva, gyógyszer-proton antiporterként működik [330, 331, 338, 339]. Az *acrR* gén az *acrAB-toIC* pumparendszer represszora, aminek mutációja magas szintű antibiotikum-rezisztenciát eredményez [329].

A potenciált szulfonamidok szempontjából a leglényegesebb mutáció az 1000x mintában a *folA* génben, valamint a 10x, a 100x és az 1000x mintákban a *folP* génben következett be. Előbbi gén a dihidrofolát-reduktáz segítségével történő tetrahidrofolsav nevű koenzim szintézise történik, amely a DNS-nukleotid timidin *de novo* szintézisének fontos előanyaga. A baktériumok egyik védekezési módja ennek a túltermelése, a *folA* génben bekövetkezett mutáció feltételezhetően ezáltal járulhatott hozzá a diaminopirimidinekkel szembeni rezisztenciához [346].

A *folP* (dihidropteroát-szintáz) pontmutációi megakadályozzák, hogy a szulfonamid-antibiotikumok gátolják a folsavszintézist, és így szulfonamid-rezisztenciát eredményeznek [347]. A *folA* és a *folP* gének együttes mutációja vezethetett a potenciált szulfonamid kombináció esetén megfigyelt magas MIC-értékhez.

A *marR* gén mutációja (100x minta) más hatóanyagok esetén is megfigyelhető volt, a hatóanyag jelenlétében az *E. coli* túlexpresszálja a *marR* regulátor gént, ami a *marA* aktivátor fehérje expresszióját váltja ki, az pedig az *acrAB-toIC* efflux pumparendszer fokozott aktiválódásához vezet [134, 328]. Túlexpressziója a 100x mintában jelent meg.

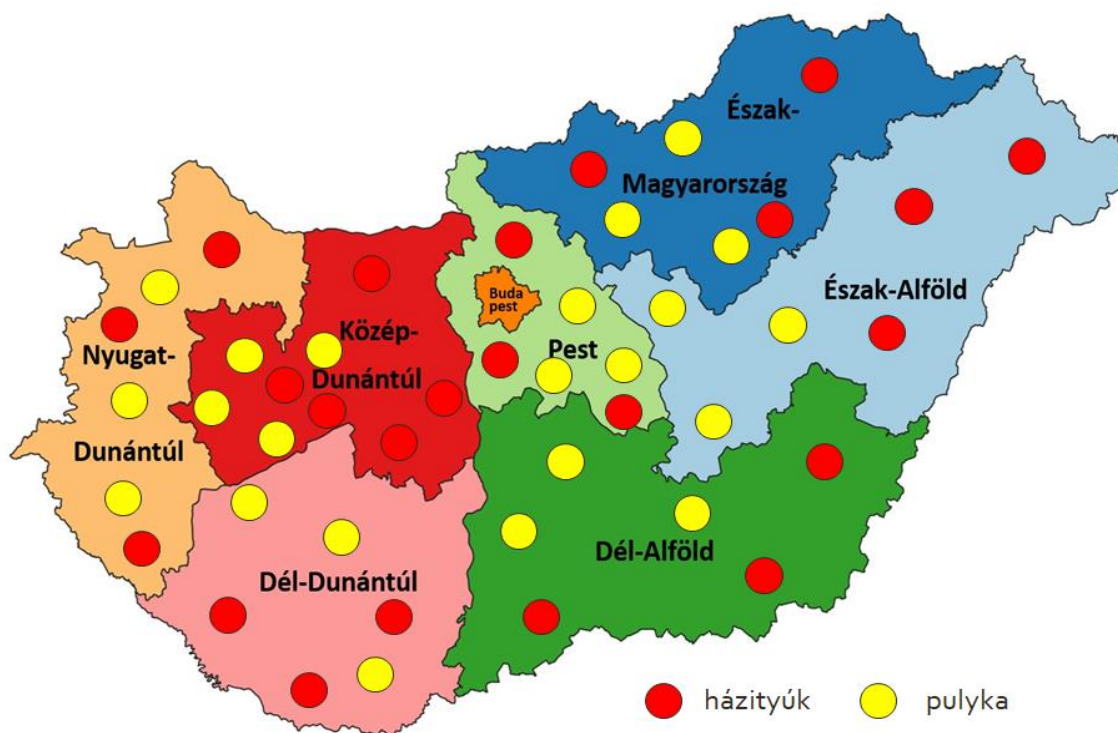
Az *mdtB* gén az *mdtABC-toIC* efflux pumparendszer része. Mutációja, amennyiben az az expresszió hiányához vezet, az *mdtC* gén expressziójának kiváltásán keresztül pedig egy működő efflux pumparendszert eredményez [30]. SNP-je a 100x mintában volt megfigyelhető.

Az *mdtF* gén SNP-ja a 1000x mintában volt megfigyelhető, ami az *mdtEF-toIC* multidrug efflux pumparendszer belső membrán transzporterét adja [345], mutációja pedig hozzájárhatott az pumparendszer fokozott működése révén az egyes hatóanyag megemelkedett MIC-értékéhez.

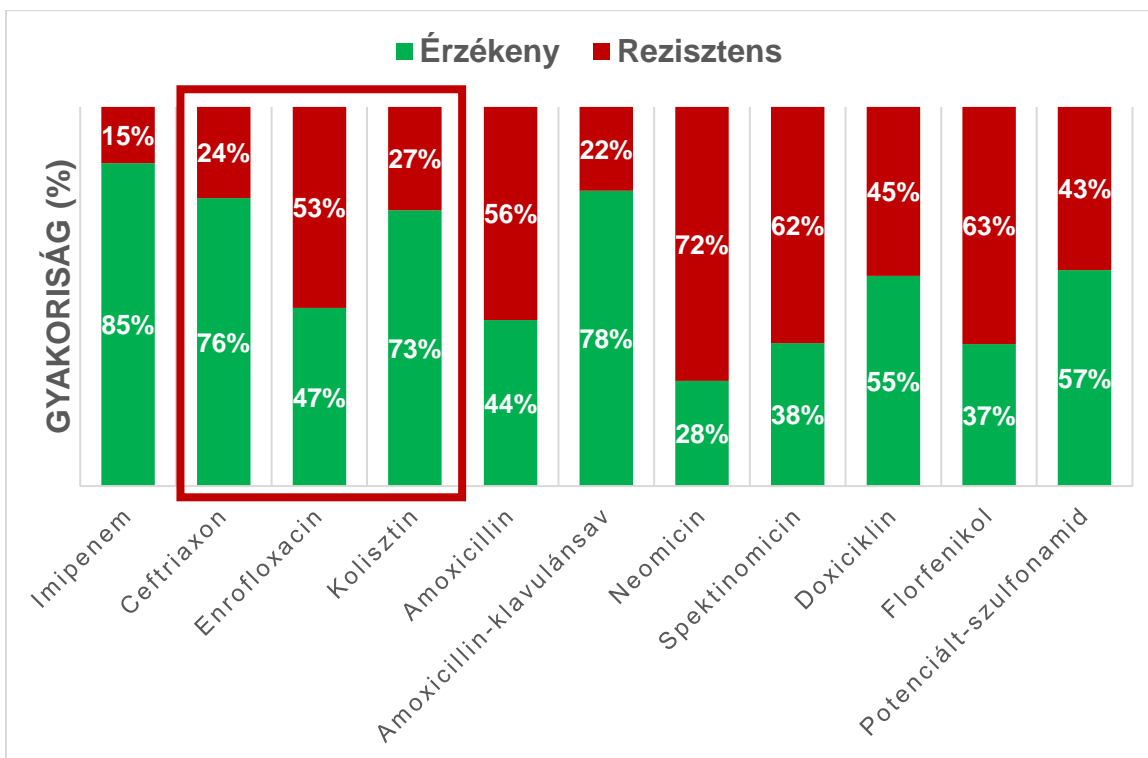
Összességében elmondhatjuk, hogy a potenciált szulfonamid többféle és számos mutáció kialakulását indukálta, amely mutálódott gének expressziója magyarázhatja nemcsak a szulfametoxazol és trimetoprim hatóanyagokkal, hanem a többi vizsgált hatóanyaggal szembeni jelentős MIC-érték növekedést. Továbbá az ún. SOS box gének közül megfigyeltük a 100x és 1000x minták esetén a *recN*, a *recQ* és az *uveB* gének pontmutációját.

5.3. Az *Escherichia coli* törzsek országos antibiotikum érzékenysége

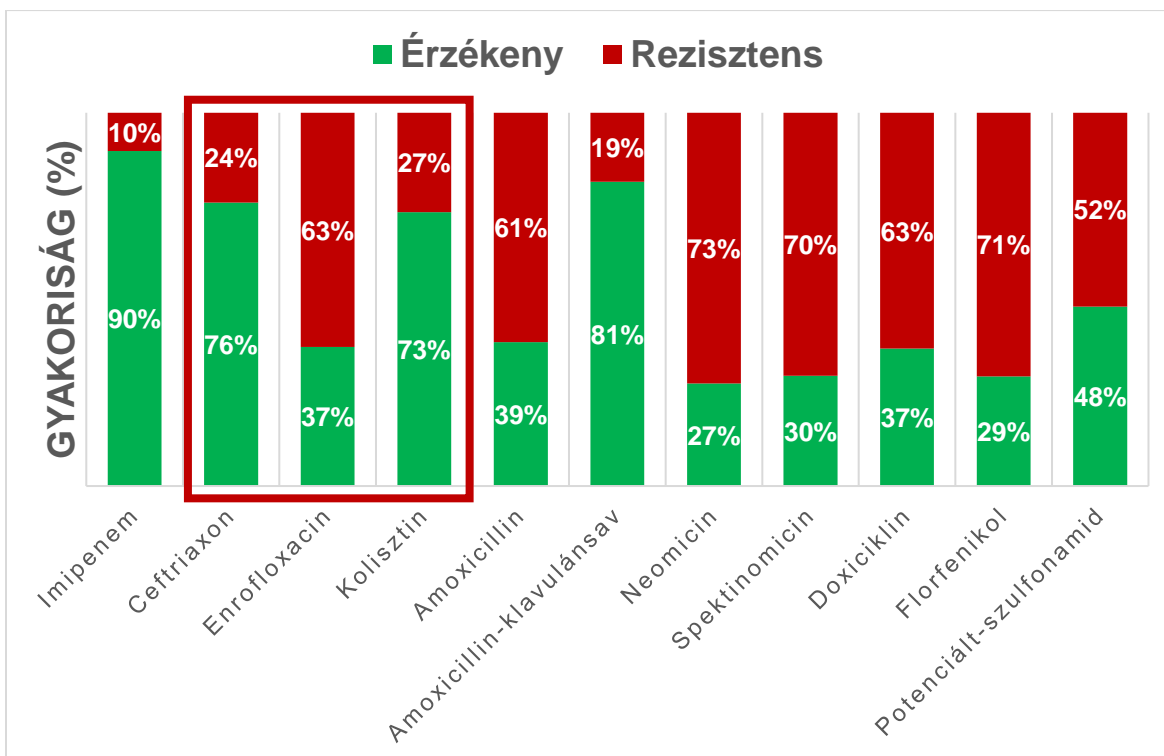
Magyarország hét régiójából házityúk esetén összesen 411 törzset, pulyka esetén pedig 470 törzset izoláltunk. Az összegyűjtött klinikai izolátumok száma házityúk esetén 133, pulyka esetén 70 volt. A mintagyűjtésbe bevont telepek regionális megoszlását a **11. ábra** szemlélteti. A kommenzalista *E. coli* törzsek rezisztencia helyzetét vizsgálva az állat- és közegészségügy számára fontos hatóanyagokra házityúknál a **12. ábra** esetén láthatjuk, hogy a kritikusan fontos antibiotikumok közül a ceftriaxon volt a leghatékonyabb, amellyel szemben a baktériumok 76%-os érzékenységet mutattak. Az enrofloxacin esetében 47%-os, a kolisztin esetében pedig 73%-os volt a baktériumok érzékenysége. Ugyanezt pulykában a **13. ábra** szemlélteti, ebben az esetben a hatóanyagok közül elfogadható mértékű a bakteriális érzékenység kolisztinre (73%), a ceftriaxon esetén 76%-os, enrofloxacin esetén pedig 37%-os bakteriális érzékenységet tapasztaltunk.



11. ábra A vizsgálatba bevont házityúk és pulyka telepek regionális megoszlása

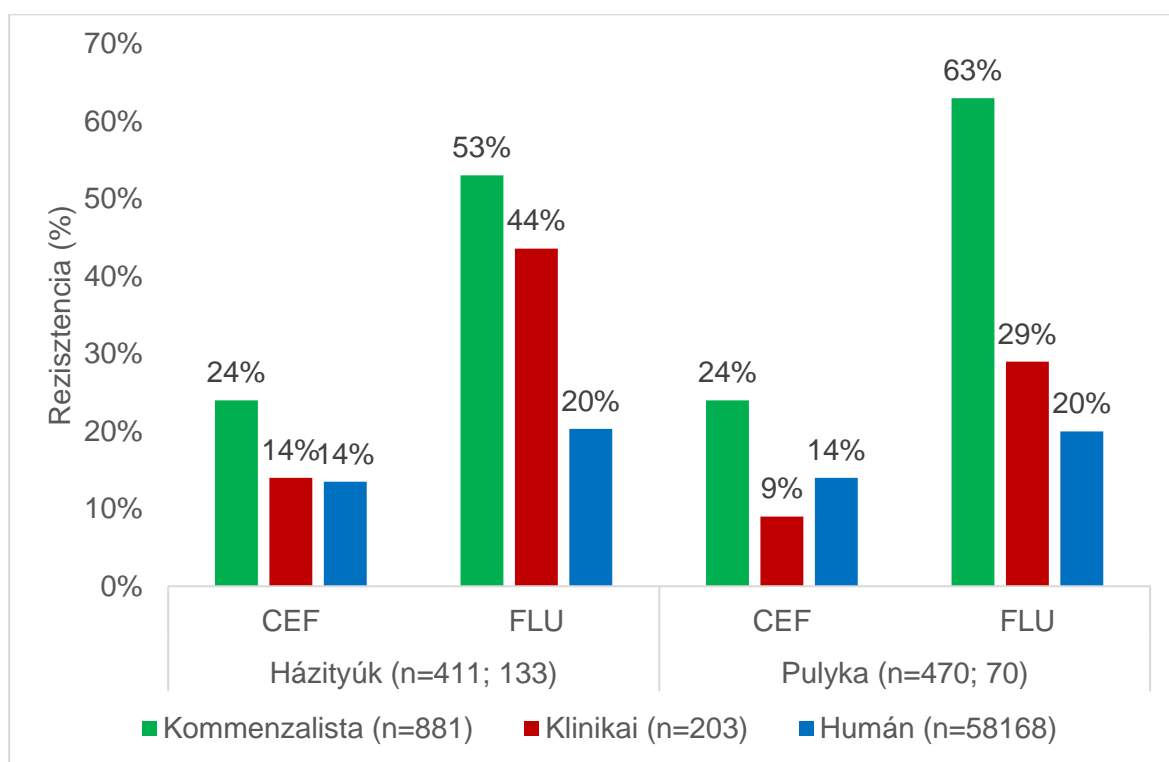


12. ábra A nagylétszámú háziállatok telepekről izolált kommenzalista *Escherichia coli* törzsek (n=411) antibiogramja állat- és közegészségügyileg fontos antibiotikumokra nézve. Piros kerettel kiemelve láthatók az AMEG B kategóriás hatóanyagok.



13. ábra A nagylétszámú pulyka telepekről izolált kommenzalista *Escherichia coli* törzsek (n=470) antibiogramja állat- és közegészségügyileg fontos antibiotikumokra nézve. Piros kerettel kiemelve láthatók az AMEG B kategóriás hatóanyagok.

Amennyiben összehasonlítjuk a kommenzalista, a klinikai esetekből izolált és a humán eredetű *E. coli* törzsek antibiogramját házityúk esetén, úgy láthatjuk, hogy ceftriaxon esetén a humán 14%-os rezisztencia értékhez képest az állategészségügyben a kommenzalista törzseknél nagyobb mértékű a rezisztencia, fluorokinolonok esetén pedig még nagyobb értékek figyelhetők meg mindkét területen. Ugyanez a tendencia figyelhető meg a pulyka eredetű törzsek esetén végzett összehasonlítás során is (14. ábra). A humán minták esetén megfigyelt nagyobb érzékenység oka lehet azonban a sokkal nagyobb mintaelemszám is.

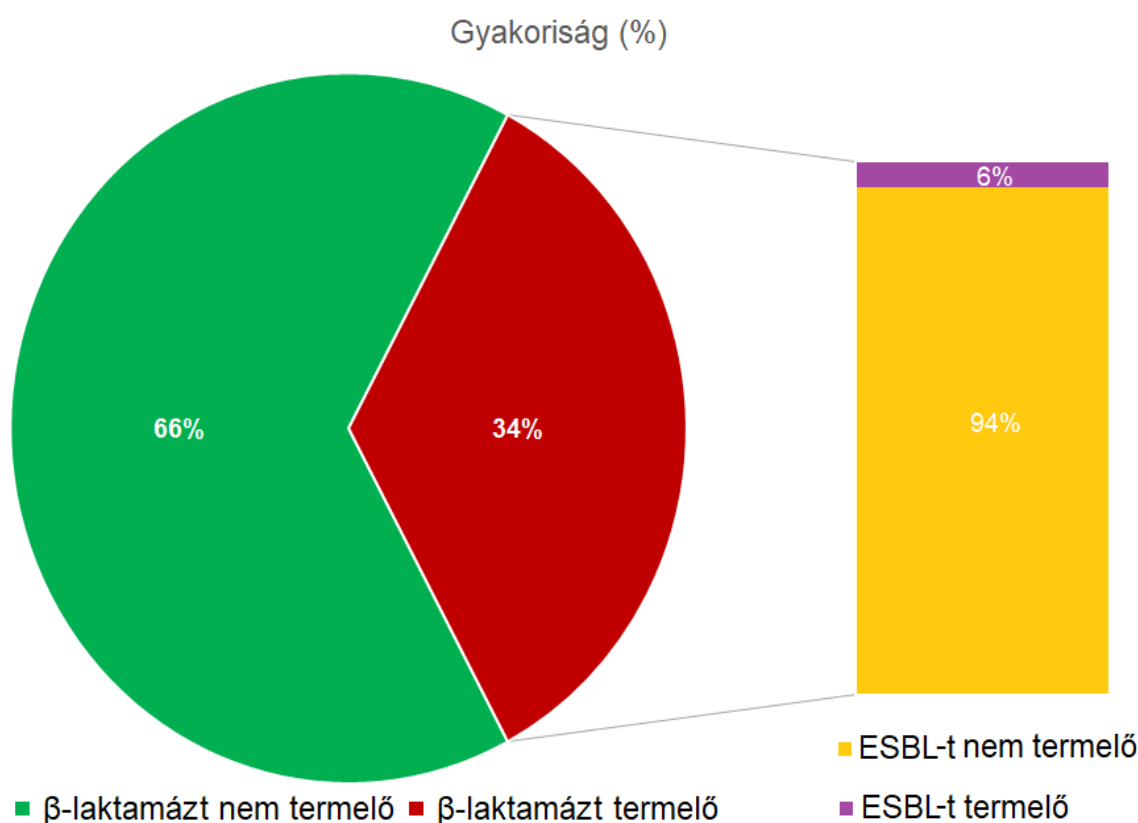


14. ábra A nagylétszámú házityúk és pulyka telepek kommenzalista, a klinikai izolátumok és a humán rezisztencia adatok összehasonlítása kritikusán fontos hatóanyagokra

Ezt követően megvizsgáltuk az izolált törzsek esetleges ESBL termelésének fenotípusos kifejeződését. Összesen 881 kommenzalista *E. coli* törzs előzetesen 15-féle hatóanyagra meghatározott MIC-érték alapján szűrtük le azt a 420 törzset, amelyek MDR törzsnek bizonyultak. Ezeket a törzseket további vizsgálatoknak vetettük alá és humán-egészségügyi szempontból fontos hatóanyagokra határoztuk meg a MIC-értéküket, ezzel dupla előszűrést alkalmazva az ESBL termelésre gyanús törzseket új generációs szekvenálással vizsgáltuk tovább.

Közegészségügyi szempontból kiemelkedő a jelentősége az ESBL termelő törzsek jelenlétének, ehhez a CLSI ajánlása szerint cefotaxim és cefotaxim-klavulánsav hatóanyag

MIC-értékeinek összehasonlítását végeztük el. Amennyiben a klavulánsavas kombináció esetén legalább 3x alacsonyabb MIC-érték figyelhető meg, akkor ESBL termelés feltételezhető, az ilyen törzsek aránya az összes törzshöz képest 6% volt. Amoxicillin és amoxicillin-klavulánsav kombinációk során a kapott MIC-értékeket összehasonlítva, a legalább 3x MIC-érték csökkenés esetén szintén következtethetünk a nagy valószínűséggel β -laktamáz termelő törzsek arányára. Ennek a kritériumnak a törzsek 34%-a felelt meg (15. ábra).



15. ábra A β -laktamáz termelésre és a kiterjedt spektrumú β -laktamáz termelésre (ESBL) gyanús törzsek aránya a *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) vizsgálat elvégzését követően

Az első előszűrés során kapott 420 törzs mind MDR törzs volt, ami az összesen vizsgált 881 törzs 47,7%-a volt. MDR törzsnek számítanak azok a törzsek, amelyek három vagy több antibiotikum csoportba tartozó, azokon belül legalább egy hatóanyaggal szemben mutatnak rezisztenciát.

XDR törzseknek számítanak azok a törzsek, amelyek maximum egy vagy két antibiotikum csoportra érzékenyek és azokon a csoportokon belül egy vagy több


hatóanyagra nézve rezisztenciát mutatnak. Vizsgálataink során 112 törzs volt XDR, ami az összes vizsgált törzsnek a 12,7%-a.

PDR törzseknek számítanak azok a törzsek, amelyek az összes antibiotikum csoporttal szemben rezisztenciát mutatnak. Vizsgálataink során összesen 12 ilyen törzset azonosítottunk, ami az összes vizsgált törzsnek a 1,4%-a volt (**44. táblázat**).

44. táblázat A pánrezisztens törzsek (n=12) antibiotikum rezisztencia profilja és regionális szintű lokalizációja

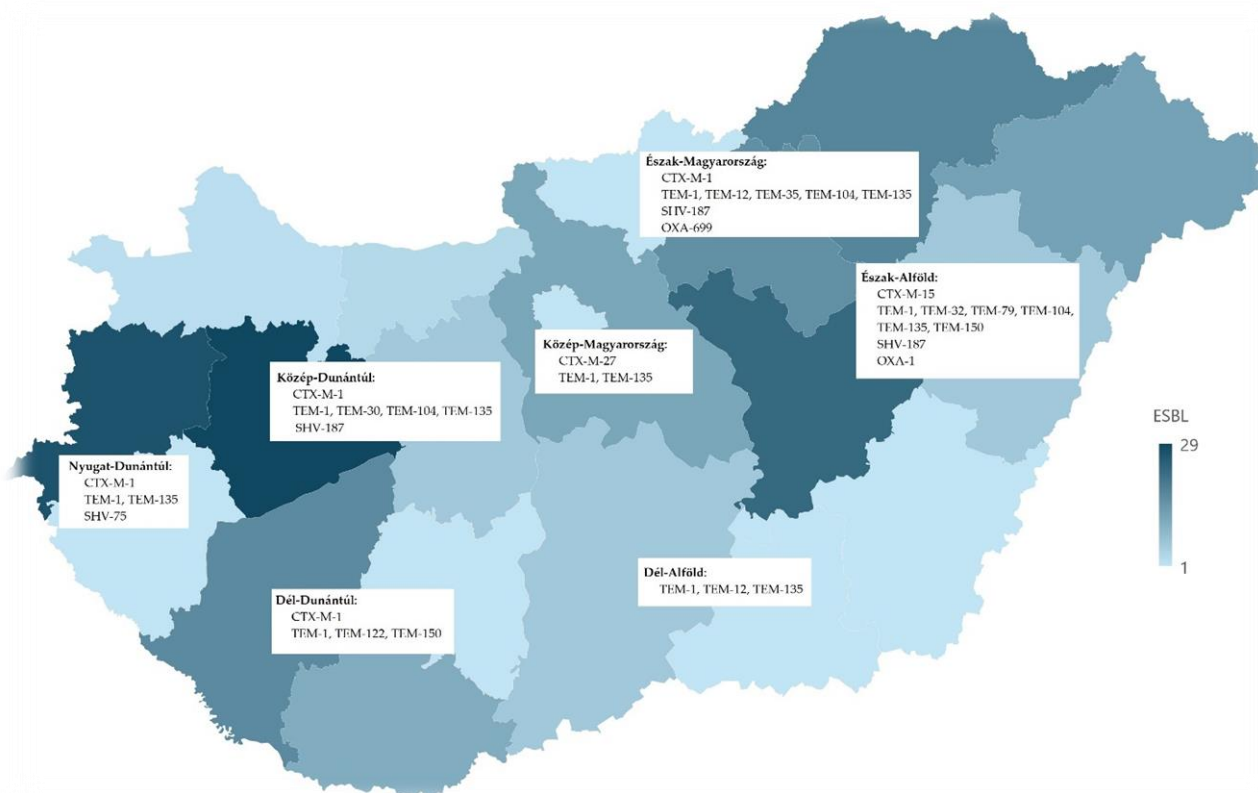
Törzsszám	Antimikrobiális rezisztencia profil	1	2	Régió
219/T/2022	AMX, AMK, CTR, NEO, SPE, DOX, FLO, ENR, KOL, PSA, CTX, IMI, GEN, TOB, AZT			Közép-Dunántúl
241/P/2022	AMX, AMK, CTR, NEO, SPE, DOX, FLO, ENR, KOL, PSA, IMI, GEN, TOB, AZT			Dél-Alföld
252/P/2022	AMX, AMK, CTR, NEO, SPE, DOX, FLO, ENR, KOL, PSA, CTX, IMI, GEN, TOB, AZT			Dél-Alföld
254/P/2022	AMX, AMK, CTR, NEO, SPE, DOX, FLO, ENR, KOL, PSA, CTX, CTK, IMI, GEN, TOB, AZT			Dél-Alföld
287/T/2022	AMX, AMK, CTR, NEO, SPE, FLO, ENR, PSA, IMI, GEN, TOB, AZT			Közép-Dunántúl
309/T/2022	AMX, AMK, CTR, SPE, DOX, FLO, ENR, KOL, PSA, IMI, GEN, TOB, AZT			Közép-Dunántúl
316/T/2022	AMX, AMK, CTR, NEO, SPE, DOX, FLO, ENR, KOL, PSA, IMI, GEN, TOB, AZT			Közép-Dunántúl
323/T/2022	AMX, AMK, CTR, NEO, SPE, DOX, FLO, ENR, KOL, PSA, CTX, IMI, GEN, TOB, AZT			Közép-Dunántúl
441/T/2022	AMX, AMK, CTR, NEO, SPE, DOX, FLO, ENR, KOL, PSA, CTX, IMI, GEN, TOB, AZT			Észak-Alföld
737/P/2022	AMX, AMK, CTR, NEO, SPE, DOX, FLO, ENR, KOL, PSA, CTX, CTK, IMI, GEN, TOB, AZT			Közép-Dunántúl
795/P/2022	AMX, AMK, CTR, NEO, SPE, DOX, FLO, ENR, KOL, PSA, CTX, CTK, IMI, GEN, TOB, AZT			Észak-Magyarország
1103/P/2023	AMX, AMK, CTR, NEO, SPE, DOX, FLO, ENR, KOL, PSA, CTX, IMI, GEN, AZT			Dél-Dunántúl

AMX – amoxicillin; AMK – amoxicillin-klavulánsav; CTR – ceftriaxon; NEO – neomicin; SPE – spektinomycin; DOX – doxiciklin; FLO – florfenicol; ENR – enrofloxacin; KOL – kolisztin; PSA – potenciált szulfonamid (szulfametoxazol és trimetoprim 19:1 arányban), CTX – cefotaxim; CTK – cefotaxim-klavulánsav; IMI – imipenem; GEN – gentamicin; TOB – tobramicin; AZT – aztreonam

 1 – β -laktamáz termelő; 2 – ESBL termelő

5.4. Az *Escherichia coli* törzsek ESBL termelésért felelős génkészlete

A fenotípusos β -laktamáz és ESBL termelésre irányuló vizsgálatok eredményei alapján 253 törzset szűrtünk le, amelyeket új generációs szekvenálással vizsgáltunk. Az ESBL termelésért felelős gének közül *CTX-M* típusú gént 23 esetben azonosítottunk, amelyek *CTX-M-1*, *CTX-M-15* és *CTX-M-27* gének voltak. *TEM*-típusú gént összesen 159 esetben azonosítottunk, amelyek *TEM-1*, *TEM-12*, *TEM-30*, *TEM-32*, *TEM-35*, *TEM-79*, *TEM-104*, *TEM-122*, *TEM-135* és *TEM-150* gének voltak. *SHV*-típusú gént 4 esetben azonosítottunk, ezek *SHV-75* és *SHV-187* gének voltak. Az *OXA*-típusú gének közül 3 esetben *OXA-1* és egy esetben *OXA-699* gént figyeltünk meg. A β -laktamáz termelésért felelős *ampC* gént 21 esetben tudtuk kimutatni, az *EC*-típusú β -laktamáz termelésért felelős géneket (*EC-3*, *EC-5*, *EC-8*, *EC-13*, *EC-15*, *EC-18*, *EC-19*) pedig 205 esetben, továbbá két esetben *MIR-3* gént is azonosítottunk. Az azonosított ESBL-termelésért felelős gének megoszlási gyakoriságát vármegye szintjén a **16. ábra** foglalja össze, az ábrán régiószinten felsorolva láthatóak az azonosított gén-altípusok is.

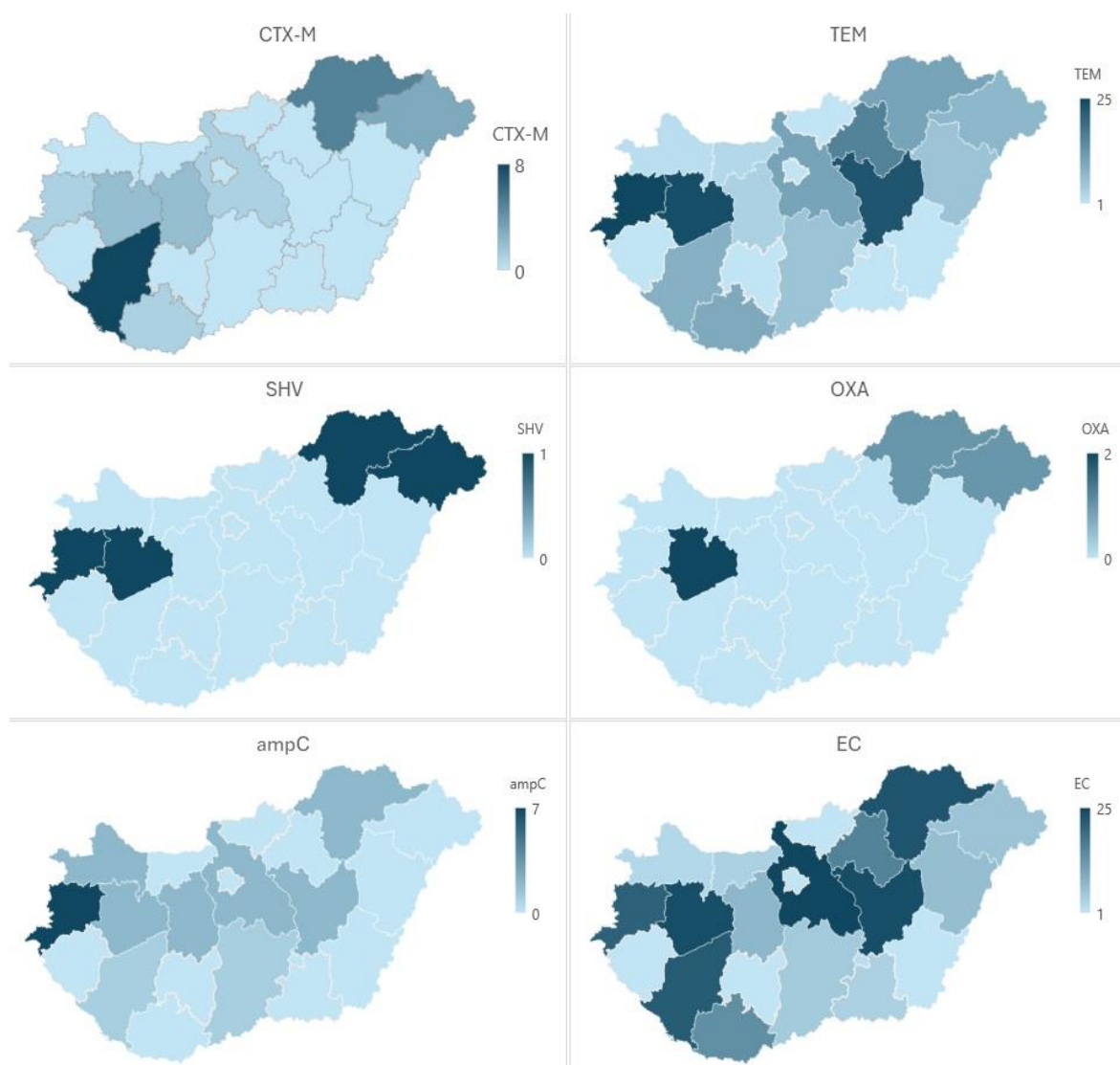


16. ábra A fenotípusosan előszűrt multirezisztens törzsek új generációs szekvenálását követően azonosított ESBL termelésért felelős rezisztencia gének gyakorisága vármegye szintjén, valamint az egyes gének régió szintű előfordulása.

A fenotípusos vizsgálat során ESBL termelőnek bizonyult törzsek 81,6%-a esetén tudtuk genetikailag azonosítani a rezisztenciáért felelős gént. A *CTX-M*-típusú gének 58,1%-a *CTX-M-1* gén volt, amit a *TEM*-típusú gének közül 22,6%-kal a *TEM-1* gén

követett, majd a *CTX-M-15* (6,5%) és *TEM-135* (6,5%) gének következtek, végül pedig a *CTX-M-27* (3,2%) és *TEM-32* (3,2%) gének fordultak elő a leggyakrabban. A törzsek 19,4%-a esetén a *CTX-M-1* gén és a *TEM-1* gén együtt fordult elő, valamint 3,2%-a esetén a *CTX-M-15* és a *TEM-135* gén együttes előfordulása volt megfigyelhető.

A **17. ábra** vármegye szintjén összefoglalja az azonosított β -laktamáz és ESBL termelésért felelős gének gyakoriságát géntípusonként.



17. ábra Az azonosított β -laktamáz és ESBL termelésért felelős rezisztencia gének vármegyei gyakorisága (n=416)

A **45-46. táblázat** összefoglalja a korábban fenotípusosan pánrezisztensnek bizonyult törzsek mögött azonosított rezisztencia géneket. A 218/T/2022-es törzs mögött *EC-8* gén és a *CTX-M-1* gén magyarázza nem csak a β -laktamáz termelést, hanem az ESBL termelést is. A 241/P/200-es törzsnél az *EC-18* gén a β -laktamáz termelésért felel, a *TEM-1* gén jelenléte önmagában azonban nem elég az ESBL termeléshez. A 252/P/2022

és 254/P/2022 törzsek esetén a β -laktamáz termelésért a *MIR-3* gén volt a felelős. A 287/T/2022-es törzsnél a *CTX-M-1* gén jelenléte igazolta a fenotípusos ESBL termelést. A 309/T/2022 és 316/T/2022 törzseknél azonban az *EC-8* és *ampC* gének jelenléte mellett azok fenotípusos kifejeződése nem volt igazolható.

45. táblázat A fenotípusos vizsgálatok során pánrezisztens törzsek mögött azonosított antimikrobiális rezisztencia génkészlet. Kiemelve láthatóak a β -laktamáz és kiterjedt spektrumú β -laktamáz termelésért felelős gének.

Törzsszám	Antimikrobiális rezisztencia gén profil	1	2	Régió
219/T/2022	<i>bacA, tolC, yojl, pmrF, eptA, mdtN, mdtO, mdtP, mdtM, cpxA, acrS, acrE, acrF, mdtE, mdtF, gadW, gadX, marA, ugd, CTX-M-1, EC-8, emrB, emrA, emrR, kdpE, emrE, acrD, mdfA, msbA, ompA, CRP, leuO, acrA, acrB, mdtA, mdtB, mdtC, baeS, baeR, mdtG, mdtH, H-NS, evgS, evgA, emrK, emrY</i>			Közép-Dunántúl
241/P/2022	<i>bacA, tolC, acrS, acrE, acrF, qnrS1, emrR, emrA, emrB, H-NS, emrY, emrK, evgA, evgS, marA, acrB, acrA, EC-18, eptA, mdtN, mdtO, mdtP, ANT(2'')-la, emrE, mdtH, mdtG, yojl, pmrF, qnrB5, mdtA, mdtB, mdtC, baeS, baeR, kdpE, mdfA, msbA, ompA, mdtM, leuO, floR, tet(J), CRP, catA4, sul2, cpxA, CRP, mdtE, mdtF, gadW, gadX, acrD, tet(A), TEM-1</i>			Dél-Alföld
252/P/2022	<i>ompA, msbA, CRP, ramA, emrB, kpnG, emrR, MIR-3, marA, cpxA, acrD, tolC, bacA, fosA2, oqxA, oqxB, H-NS, mdtB, mdtC, baeR, acrB, acrA</i>			Dél-Alföld
254/P/2022	<i>msbA, ompA, acrA, acrB, ramA, CRP, MIR-3, emrR, kpnG, emrB, marA, cpxA, acrD, fosA2, bacA, tolC, H-NS, oqxB, oqxA, baeR, mdt, mdtB</i>			Dél-Alföld
287/T/2022	<i>tolC, bacA, acrS, acrE, acrF, EC-8, H-NS, cpxA, marA, emrR, emrA, emrB, emrY, emrK, evgA, evgS, pmrF, yojl, gadX, gadW, mdtF, mdtE, emrE, kdpE, mdtM, ugd, acrD, CRP, CTX-M-1, mdfA, msbA, ompA, eptA, mdtN, mdtO, mdtP, acrB, acrA, mdtA, mdtB, mdtC, baeS, baeR, leuO, mdtG, mdtH</i>			Közép-Dunántúl
309/T/2022	<i>yojl, pmrF, acrA, acrB, eptA, mdtN, mdtO, mdtP, leuO, emrY, emrK, evgA, evgS, marA, EC-18, mdtA, mdtB, mdtC, baeS, baeR, emrB, emrA, emrR, sul1, acrD, mdtM, tolC, bacA, acrS, acrE, acrF, kdpE, gadX, gadW, mdtF, mdtE, CRP, ompA, msbA, mdfA, mdtG, mdtH, H-NS, cpxA, ugd</i>			Közép-Dunántúl
316/T/2022	<i>acrD, CRP, bacA, emrB, emrA, emrR, marA, tet(B), cpxA, tolC, acrA, acrB, ompA, msbA, mdfA, H-NS, mdtA, mdtB, mdtC, baeS, baeR, mdtM, mdtP, mdtO, mdtN, eptA, ampC, gadX, gadW, mdtF, mdtE, leuO, mdtG, mdtH, yojl, pmrF, ugd, kdpE, evgS, evgA, emrK, emrY</i>			Közép-Dunántúl

A 323/T/2022-es törzsnél az azonosított *EC-18* gén csak a β -laktamáz termelést magyarázza. A 441/T/2022-es törzsben számos ESBL termelésért felelős gén azonosításra került. A 737/P/2022-es törzsben található *EC-13*, *SHV-187* és *TEM-1* gének jelenléte azonban csak a β -laktamáz termeléshez voltak fenotípusosan elegendőek. A 795/P/2022-

es törzsnél L1-típusú β -laktamáz termelésért felelős gént, valamint OXA-699 és TEM-135 géneket azonosítottunk, azonban fenotípusosan ezek kifejeződése nem volt igazolható. A 1103/P/2023-as törzsből található EC-8, TEM-1 és CTX-M-1 gének mind a β -laktamáz termelést és az ESBL termelést is igazolják.

46. táblázat A fenotípusos vizsgálatok során pánrezisztens törzsek mögött azonosított antimikrobiális rezisztencia génkészlet. Kiemelve láthatóak a β -laktamáz és kiterjedt spektrumú β -laktamáz termelésért felelős gének (folytatás).

Törzsszám	Antimikrobiális rezisztencia gén profil	1	2	Régió
323/T/2022	<i>pmrF, yojl, baeR, baeS, mdtC, mdtB, mdtA, ugd, emrE, leuO, CRP, mdtE, mdtF, gadW, gadX, qnrB5, mdtH, mdtG, mdtM, mdtP, mdtO, mdtN, eptA, H-NS, acrD, cpxA, kdpE, EC-18, emrR, emrA, emrB, marA, acrF, acrE, acrS, bacA, tolC, evgS, evgA, emrK, emrY, ompA, msbA, mdfA, acrB, acrA</i>			Közép-Dunántúl
441/T/2022	<i>ompK37, acrB, acrA, ramA, SHV-187, marA, tet(J), kpnE, kpnF, eptB, qnrB17, CRP, catA4 CTX-M-15, arnT, H-NS, CRP, cpxA, baeR, mdtC, mdtB, kpnH, kpnG, emrR, oqxB, oqxA, ompA, msbA, lptD, fosA6, acrE leuO, sul1, qacEdelta1, AAC(3)-VIa, ANT(3'')-IIa, qnrD1, OXA-1, AAC(6'')-Ib-cr6, acrD, TEM-135</i>			Észak-Alföld
737/P/2022	<i>mdtB, mdtC, baeS, baeR, gadX, gadW, mdtF, mdtE, CRP, fosA6, oqxA, oqxB, emrR, kpnG, kpnH, acrS, CRP, arnT, kdpE, cpxA, mdtP, mdtO, mdtN, marA, mdfA, EC-13, cpxA, floR, ompK37, H-NS, acrD, ramA, H-NS, mdtA, qnrS1, tolC, bacA, eptB, acrF, tet(A), acrD, mdtH, fosA6, msbA, ompA, eptA, Yojl, qnrB5, mdtB, mdtC, baeR, lptD, tet(B), acrB, acrA, acrB, emrY, emrK, evgA, evgS, mdtM, linG, ANT(3'')-IIa, ompA, mdtG, leuO, msbA, emrR, emrA, emrB, kpnE, kpnF, SHV-187, marA, ugd, TEM-1</i>			Közép-Dunántúl
795/P/2022	<i>marA, SHV-187, acrB, acrA, H-NS, tet(39), arnT, CRP, abaQ, mdtB, mdtC, baeR, ramA, acrA, acrB, kpnF, kpnE, oqxA, oqxB, acrD, ompA, msbA, lpsB, abaF, adeH, adeF, adeG, adeL, abeS, smeF, smeE, smeD, L1 beta-lactamase, ompK37, adeS, adeR, adeA, adeB, APH(3'')-IIc, ramA, msbA, ompA, ACT-41, ADC-246, acrD, H-NS, kpnH, kpnG, emrR, oqxB, oqxA, adeN, emrB, kpnG, emrR, bacA, lptD, fosA2, cpxA, abeM amvA, baeR, mdtC, mdtB, mdtA, eptB, cpxA, fosA6, CRP, OXA-699, qnrB5, adel, adeJ, adeK, mdtH, marA, TEM-135</i>			Észak-Magyarország
1103/P/2023	<i>evgS, evgA, emrK, emrY, pmrF, yojl, baeR, baeS, mdtC, mdtB, mdtA, ugd, tolC, bacA, acrS, acrE, acrF, tet(A), TEM-1, acrA, acrB, mdtP, mdtO, mdtN, eptA, marA, emrE, CRP, mdtE, mdtF, gadW, gadX, emrR, emrA, mdfA, msbA, ompA, CTX-M-1, mdtM, sul2, acrD, leuO, kdpE, EC-18, mdtG, mdtH, H-NS, cpxA</i>			Dél-Dunántúl

6. Megbeszélés

Az egyes antibiotikum hatóanyagcsoportok közötti keresztrezisztencia kialakulásának feltárása nagy gyakorlati jelentőséggel bír, hiszen segíthet megérteni a globális antimikrobiális rezisztencia terjedésének tendenciáit. Egy matematikai modellekre épülő kutatás során Nichol és mtsai. rávilágítottak arra, hogy cefotaxim hatóanyaggal szemben rezisztens *E. coli* kezelésére a piperacillin jó választás lehet, azonban gentamicin hatóanyagra már kismértékű keresztrezisztenciát figyeltek meg. Ciprofloxacin esetén ennek a matematikai valószínűsége már sokkal nagyobb volt, míg a foszfomicin, az ampicillin, a tikarcillin és a cefalosporin hatóanyagok esetén igen nagy volt a keresztrezisztencia esélye [271]. A saját *in vitro* vizsgálatok alapján (47. táblázat) az amoxicillin rezisztencia kialakulása esetén jó választás lehet az oxitetraciklin, a florfenikol és az enrofloxacin. A florfenikol hatóanyag nem szelektálta a rezisztenciát kolisztinnel és neomicinnel szemben. Kolistin esetén azt tapasztaltuk, hogy egyetlen vizsgált hatóanyag MIC-értékét sem befolyásolta, még a legnagyobb, 1000x koncentrációban sem. Enrofloxacin esetén csak a neomicin MIC-értéke nem változott, a többi hatóanyag MIC-értékét csak az 1000x koncentráció befolyásolta. A cefotaxim és a potenciált szulfonamid már 10x koncentrációban megnövelte az általunk vizsgált összes hatóanyag MIC-értékét. Eredményeink alátámasztják olyan evolúciós vizsgálatok végzésére szolgáló rendszerek létjogosultságát, mint a morbidosztát [348] vagy a MEGA-plate módszer [273, 349], ezek kiküszöbölik a baktériumpopuláció sorozatos újraoltását, ezáltal kevésbé sztochasztikus populációdinamikát tesznek lehetővé [271], ami jobban leképezi a valóságos környezetben lejátszódó folyamatokat. Ugyanakkor azt is kimutatták, hogy a fenotípusos plaszticitásból eredő érzékenységváltozások rövid időn belül reverzibilisek lehetnek [350].

47. táblázat AMEG B kategóriás hatóanyagokkal szemben indukált rezisztencia a vizsgált hatóanyagok tekintetében

Hatóanyag	Cefalosporinok				Enrofloxacin				Kolistin			
	1x	10x	100x	1000x	1x	10x	100x	1000x	1x	10x	100x	1000x
Amoxicillin	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
Cefotaxim	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
Florfenikol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Enrofloxacin	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
Kolistin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Potenciált szulfonamid*	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+

* trimetoprim-szulfametoxazol 1:19 arányban

Vizsgáltuk az egyes hatóanyagok nagy koncentrációjának esetleges hatását az ESBL termelés fenotípusos megjelenésére, annak közegészségügyi jelentősége miatt. A CLSI protokollt követve az eredmények nem igazolták egy esetben sem az ESBL termelést, amit genotípusosan is meg tudtunk erősíteni, hiszen ESBL termelésért felelős gének nem voltak a mintákban. Tehát annak a matematikai esélye, hogy kialakuljon egy olyan mutáció, ami egy teljesen új genetikai tulajdonságot eredményez, a vizsgálathoz használt rendszer nagy mutációs rátája ellenére is kicsi. A CLSI szabvány mellett azonban érdemes azt is szem előtt tartani a csak fenotípusos vizsgálatok végzése esetén, hogy egyes szakirodalmi források leírják, hogy a cefpodoxim (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* gének expressziója hidrolizálja), cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxon vagy aztreaonam hatóanyagok és azok klavulánsavas kombinációjának érzékenységi vizsgálatai is alkalmasak az ESBL termelés igazolására [351], azonban ezen tesztek gyenge érzékenységéhez vezethet olyan β -laktamázok termelése, amit a klavulánsav nem gátol, mint az *ampC* β -laktamáz vagy metallo- β -laktamázok [352]. Genetikai vizsgálataink során az *ampC* gén jelenlétét minden mintában kimutattuk. Tehát, amennyiben kizárólag a CLSI protokollja alapján szeretnénk az ESBL termelést vizsgálni, akkor kaphatunk esetleges fals negatív eredményeket. Azonban a fals negatív eredmények elkerülésére alkalmazható a cefepim hatóanyag, amely a legtöbb *ampC* β -laktamáz gyenge szubsztrátja; a kromogén agarok használata; a kloxacillin tartalmú agar használata vagy EDTA hozzáadásával történő metallo- β -laktamáz inaktiválás [351]. Azonban teljes bizonyossággal genetikai vizsgálatokkal kiegészített fenotípusos vizsgálatok alapján állapítható meg az ESBL termelés kérdése.

Az 1000x hatóanyag koncentrációt tartalmazó agarhoz való adaptációhoz amoxicillin esetén mindösszesen öt napra volt szüksége a mutációkon átesett baktérium törzsnek, potenciált szulfonamid (trimetoprim és szulfametoxazol 1:19 arányban) esetén ehhez 7 nap, florfenikol és enrofloxacin esetén 10 nap, kolisztin esetén 12 nap, cefotaxim esetén pedig 13 napra volt szükség. Az amoxicillin esetén jóval kevesebb mutáció következett be, mint cefotaximnál. Ennek elsődleges okaként feltételezzük, hogy az eltérő kontaktidőnek is szerepe lehetett, azonban a többi hatóanyag esetén azonosított mutációs ráták ezt megcáfolták, hiszen például a 12 napos inkubáció kolisztin esetén hasonló mutációs arányt váltott ki, ellenben a 7 napos potenciált szulfonamid szelekciós nyomás okozta mutációs ráta megközelítette a cefotaximnál tapasztaltakat. A jövőben annak kiderítése érdekében, hogy az egyes hatóanyagcsoportoknál mi az oka az eltérő mutációs szelekciós nyomásnak, további vizsgálatokat tervezünk.

Amoxicillin hatására az *ampC* gén és az *acrB* gén mutációja hozzájárulhatott mind az enzimatis inaktiváláshoz, mind az *acrAB-toIC* pumparendszer fokozott működéséhez. Ezek a genetikailag igazolt génekben bekövetkező mutációk magyarázhatják a

fenotípusosan tapasztalt MIC-érték növekedéseket. Azonban minden esetben meg kell győződni a gének kifejeződéséről is, amihez transzkriptomikai vizsgálatok szükségesek.

A cefotaxim hatására összetettebb változásokat figyeltünk meg a genomban. Ezek közül elsőként az *ampC* gén promóter régiójában bekövetkező többszörös komplex aminosavcserét és egy meghatározatlan mutációt kell kiemelni, amely az elemzések alapján a különböző béta-laktám szerekkel szembeni fenotípusos rezisztencia megjelenését jelzi előre. Az *acrB* gén mutációi, valamint az annak működését szabályozó *acrR* és *robA* gének mutációi határozzák meg az *acrAB-toIC* efflux pumparendszer működését. Az *mdtB* génben is megfigyeltünk mutációt, ami egy olyan transzportert határoz meg, amely az *mdtC* génnel heteromultimer komplexet alkot, így egy multidrug transzportert hoz létre. Az *mdtBC* komplex az *mdtABC-toIC* efflux rendszer része [353]. Az *emrR* génben is megfigyeltünk mutációt, ami negatív regulátorként működik az *emrAB-toIC* multidrug efflux pumpakomplex működésében. Ennek a mutációja az *emrAB-toIC* komplex expresszióját eredményezheti [354]. Az *emrA* és *emrB* gének elsősorban az enrofloxacin kipumpálásáért felelősek, a *toIC* gén a kevésbé potens hatóanyagok kiürítéséért felelős effluxpumpa kifejezéséért felelős. Ezen gének mutációi magyarázhatják más hatóanyagok MIC-értékeinek növekedését a cefotaxim magas koncentrációjára adott válaszként. Az *acrB* gén az *acrAB-toIC* multidrug efflux komplex fehérje egyik része. Az *acrB* heterotrimerként működik, amely a belső membránkomponenst foglalja magában, és döntő szerepet játszik a szubsztrát-felismerésben és az energiaátvitelben, mivel gyógyszer-proton antiporterként működik [330, 331, 338, 339]. Az *acrB* gén mutációit a cefotaxim 10x és 100x koncentrációi indukálták, hozzájárulva a megnövekedett MIC-értékekhez. Az *acrR* gén az *acrAB-toIC* multidrug efflux komplex represszoraként működik. Az *acrR* mutációi magas szintű antibiotikum-rezisztenciához vezethetnek, mivel ez a gén represszorként szolgál az *acrAB-toIC* multidrug efflux komplex szabályozásában. A mutációk következtében az *acrAB-toIC* komplex működése fokozódhat, ami növeli az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát. Emellett azonosításra kerültek a 100x és 1000x mintákban olyan pontmutációk, amelyek az ún. SOS box génekben (*ruvB*, *recJ*, *polB*, *umuC*) következtek be.

A florfenikol hatására bekövetkező fenotípusos MIC-érték növekedés más hatóanyagokra nézve feltételezésünk szerint olyan stressz hatására bekövetkező ARG aktiválódás következménye, amelyeket a genomban bekövetkező mutációk is alátámasztanak. Langsrud és mtsai. benzalkónium-klorid indukálta stressz hatására kialakuló keresztrezisztencia következtében 1,5-20x MIC-érték növekedést írtak le antibiotikum hatóanyagoknál [355]. Vizsgálataink során florfenikol 1000x koncentrációjának hatására más antibiotikumok hatóanyagok esetén 2-167x MIC-érték növekedést

tapasztaltunk. A legnagyobb mértékben az enrofloxacin MIC-értéke nőtt meg. Chueca és mtsai. 10 napon keresztül kezeltek illóolajokkal *E. coli* törzseket, amelynek következtében számos antibiotikum esetén megnövekedett MIC-értéket tapasztaltak [356]. A baktériumok esetén a törtdózisban alkalmazott antibiotikumok okozta DNS károsodás SOS stresszválaszt válthat ki [357], ami a mutációs ráta átmeneti emelkedését okozhatja [358]. Florfenikol esetén korábbi tanulmány azonban nem írta le annak többszörös adagolása következtében kialakuló más antibiotikumok MIC-érték növekedést indukáló hatását. A regulátor gének közül az *emrR* géneben bekövetkező mutáció a 10x és 100x mintákban volt kimutatható, amely az *emrAB-toIC* multidrug efflux pumpa szabályozásában játszik szerepet. Az *emrA* és *emrB* gén különösen az enrofloxacin, a *toIC* gén pedig szinte az összes többi hatóanyag kipumpálásáért felelős efflux pumpa meghatározásáért felel, továbbá magyarázatot adhat a magas florfenikol koncentrációk hatására bekövetkező más hatóanyagok MIC-értékének növekedésére. Az *acrAB-toIC* pumparendszer részét képező *acrB* génben, és a pumparendszer szabályozó *acrR* és *robA* gének esetén szintén megfigyeltünk mutációkat. Az *acrR* mutációi magas szintű antibiotikum-rezisztenciát eredményeznek [329], mutációját az 1000x minta esetén figyeltük meg. A *robA* gén szintén egy pozitív szabályozó [25, 340], mutációját szintén az 1000x mintában figyeltük meg. Az *acrB* egy heterotrimerként működik, amely a belső membránkomponenst alkotja, és elsősorban a szubsztrát felismerésért és az energia transzdukcióért felelős, mivel gyógyszer-proton antiporterként működik [330, 331, 338, 339], mutációját a 100x és 1000x mintákban figyeltük meg. Egy harmadik pumparendszert alkotó génben, az *mdtC* génben is megfigyeltünk pontmutációt, ami az *mdtABC-toIC* efflux-komplex része. Az *mdtN* gén mutációja a referencia törzshöz képest az összes mintában kimutatható volt, szerepe az *mdtABC-toIC* komplex működésének szabályozásában van [335–337], mutációja hozzájárulhatott, hogy egyes hatóanyagok esetén magas volt a kiindulási MIC érték.

A fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia kialakulásának szempontjából kiemelt jelentősége van a *parC* gén esetén megfigyelt komplex mutációnak, ez a gén a topozomeráz IV alegysége, amely dekaténálja és lazítja a DNS-t, ezáltal lehetővé teszi a transzkripciót és a translációt. A *parC* mutációi megakadályozzák, hogy a fluorokinolonok gátolják a DNS-szintézist, ami általában kisebb mértékű rezisztenciát eredményez. A nagyobb mértékű rezisztencia a *gyrA* és a *parC* együttes mutációiból ered [180]. Ezért kiemelt jelentőségű, hogy a *gyrA* génben is megfigyeltünk pontmutációt a 10x, 100x és 1000x koncentrációkkal kezelt mintákban. A gén mutációja a fluorokinolon hatóanyagok kötődésének kisebb affinitását eredményezi, ami a DNS-szintézis gátló hatás csökkenéséhez vezet [174]. A *parC* és a *gyrA* mutáció magyarázhatják az enrofloxacin hatóanyaggal szemben megfigyelt nagymértékű MIC-érték növekedést. A többi hatóanyag

fenotípusosan megfigyelt érzékenység csökkenését számos egyéb rezisztencia génben bekövetkező mutációk magyarázhatják. Az *acrR* gén esetén deléció és inzerció is bekövetkezett, ez a gén az *acrAB-toIC* multidrug efflux pumparendszer represszora. Mutációi magas szintű antibiotikum-rezisztenciát eredményeznek béta-laktámokkal, tetraciklinekkel, fenikolokkal és fluorokinolonokkal szemben [329]. Az antibiotikum nagy koncentrációjának való kitétség olyan stressz folyamatokat indukál, ami túlexpresszálja a *marR* regulátor gént, amiben szintén mutációt figyeltünk meg. Ez a *marA* fehérje expresszióját váltja ki, az pedig az *acrAB* multidrug efflux pumpa indukálása mellett az *ompF* porin szintézisét is szabályozza [134, 328]. A *robA* gén szintén az *acrAB* efflux pumparendszer pozitív szabályozója [25, 340], pontmutációját a 10x koncentráció esetén figyeltük meg. A pumparendszer egyik fő egységében, az *acrA* génben bekövetkező pontmutációk a hatóanyag 10x, 100x és 1000x koncentrációval kezelt mintáiban jelentek meg. Ez a gén az *acrAB-toIC* multidrug efflux pumparendszer transzportfehérje periplazmatikus részét fejezi ki [125]. Az *emrR* gén esetén csak az 1000x koncentráció hatására figyeltük meg pontmutációt, ami egy másik multidrug efflux pumparendszer, az *emrAB-toIC* komplex kifejeződését szabályozó gén [28]. Enrofloxacin esetén az 1000x mintában sikerült az *uvrY* génben pontmutációkat azonosítani, ami az ún. SOS box gének szabályozásáért lehet felelős.

Kolisztin esetén a genetikai vizsgálatok alátámasztották a fenotípusan tapasztaltakat, összesen két olyan génben azonosítottunk mutációt, amely a hatóanyag MIC-értékének növekedését magyarázhatja. Az *ftsI* gén deléció következtében a kolisztin MIC-értékének növekedésében nyilvánul meg [341], a vizsgálataink során kolisztin hatására egy SNP mutációt figyeltünk meg a 100x és 1000x minták esetében. Antibiotikum jelenlétében stresszhatás következtében az *ompC* gén mutációját az 1x mintában figyeltünk meg, ami általában downregulációhoz vezet és a sejtmembrán áteresztő képessége csökken, ami a béta-laktámokkal szembeni rezisztencia kialakulásához vezethet, továbbá leírták, hogy ennek következtében a tetraciklinel szembeni effluxpumpa gének upregulálódnak [342]. Vizsgálataim során azonban sem a béta-laktámokkal, sem a tetraciklinekkel szemben nem tapasztaltunk MIC-érték növekedést, azonban ez magyarázható azzal, hogy a kolisztin nagyobb koncentrációival kezelt mintákban ez a mutáció nem jelent meg.

A potenciált szulfonamid kezelés hatására bekövetkező genetikai változások közül a legfontosabb a 10x, a 100x és az 1000x minták esetén a *folP* génben és az 1000x minta esetén a *folP* génben bekövetkező mutáció. A *folA* gén a dihidrofolát-reduktáz termelés szabályozásáért felel, segítségével történik a tetrahydrofolsav nevű koenzim szintézise, amely a DNS-nukleotid timidin *de novo* szintézisének fontos előanyaga. A baktériumok egyik védekezési módja ennek az enzimnek a túltermelése, a *folA* génben bekövetkezett

mutáció feltételezhetően csökkentette a diaminopirimidin komponenssel szembeni érzékenységet [346]. A *folP* gén felelős a dihidropteroát-szintáz enzim termelésének szabályozásáért, pontmutációi megakadályozzák, hogy a szulfonamid antibiotikumok gátolják a folsavsintézist, és így szulfonamid rezisztenciát eredményeznek [347]. A *folA* és a *folP* gének együttes mutációja magyarázhatja a potenciált szulfonamid esetén megfigyelt magas MIC-értékek kialakulását. A többi hatóanyag megnövekedett MIC-értéért szintén efflux pumparendszerek lehetnek felelősek. Az *emrR* gén deléciós mutációja az 1000x mintában volt megfigyelhető, ami az *emrAB-toIC* multidrug efflux pumparendszer kifejeződéséhez vezethet [28]. Az *mdtM* gén az *acrAB-toIC* pumparendszer működésének regulációjában vesz részt. Ennek a génnek a delécióját az 1000x mintában figyeltük meg. Egy olyan transzmembrán gyógyszer/H⁺ antiporterről van szó, ami több hatóanyaggal szembeni rezisztencia kialakulásához vezet [343]. Az *acrF* gén invezíója az 1000x mintában következett be, ami az *acrB* génhez hasonló belső membrán transzporter, ami az *acrEF-toIC* komplex működését befolyásolja [27]. Az *acrR* gén az *acrAB-toIC* pumparendszer represszora, aminek mutációja magas szintű antibiotikum-rezisztenciát eredményez [329]. A *marR* gén mutációját a 100x mintában figyeltük meg, ami a *marA* represszor fehérje expresszióját váltja ki, az pedig az *acrAB-toIC* efflux pumparendszer fokozott aktiválódásához vezet [134, 328]. Az *mdtF* gén delécióját és pontmutációját a 100x mintában figyeltük meg, pontmutációja pedig a 1000x is megfigyelhető volt. Az *mdtEF-toIC* multidrug efflux pumparendszer belső membrán transzporterét határozza meg [345]. Az *mdtB* gén az *mdtABC-toIC* efflux pumparendszer része. Mutációja, amennyiben az az expresszió hiányához vezet, az *mdtC* gén expressziójának kiváltásán keresztül pedig egy működő efflux pumparendszert eredményez [30]. SNP-je a 100x mintában volt megfigyelhető. Az SOS box gének vonatkozásában a 100x és 1000x mintákban kimutattuk a *recN*, a *recQ* és az *uvrB* génekben bekövetkező pontmutációkat.

E. coli esetén az ún. SOS box rendszerek közel 30 különböző gén javításáért felelősek, amelyek feladata a DNS-javítási feladatokban résztvevő fehérjék meghatározása [359]. A DNS-károsodása vagy a DNS-replikáció leállása következtében a baktériumok mutációs rátája megnő [360], ezzel magyarázható az antibiotikum hatóanyagok növekvő koncentrációjának kitett környezetben megfigyelhető mutációs ráta növekedése. Ezen SOS mechanizmusok biztosítják az *E. coli* hosszútávú túlélését, egyfajta evolúciós fitneszt biztosítva [361]. A fluorokinolon hatóanyagok esetében [362] és a β -laktám antibiotikumok esetében [363] korábban kimutatták az SOS rendszert indukáló hatásukat, ezáltal a mutációs gyakoriság növelő hatásukat. Az antibiotikumok több évtizedes használata jelentős hatással volt a rezisztens törzsek szelekciójára és terjedésére, amely változások előbb vagy utóbb rögzülnek a populációban [364], azonban egyes vizsgálatok arra utalnak,

hogy a baktériumok nem passzív résztvevői ezeknek az evolúciós folyamatoknak [365]. Az antibiotikum-stressz megnövekedett mutációs rátához (hipermutáció) vezet, ami szelekciós nyomást eredményez [366]. Eredményeink alapján a cefotaxim és a potenciált szulfonamid hatóanyagok vizsgálati eredményei arra utalnak, hogy ezek a hatóanyagok hipermutációt váltanak ki, hiszen a kezeletlen törzshöz képest a cefotaxim esetén a 100x koncentráció 191, az 1000x koncentráció 190 mutációt indukált, potenciált szulfonamidnál ez a 100x koncentráció esetén 95, az 1000x koncentráció esetén 136 mutáció volt, szemben az amoxicillin 6 és 7 mutációs rátájával vagy a florfenikol 6 és 5 mutációs rátájával. Ezeknél az ún. hipermutátor hatóanyagoknál számos komplex mutációt, deléciót és inzerciót figyeltünk meg és több ún. SOS box génben is kialakult pontmutációs változás, szemben a többi hatóanyaggal. A pontmutációk és rekombinációk jelentősége sokkal nagyobb [367], mint a *de novo* mutációké [368]. Figyelembe kell venni, hogy a szervezetben az antibiotikum-koncentrációk eltérő térbeli és időbeli változatosságot mutatnak [369], koncentráció gradiensük pedig a kommenzalista mikrobiom rekombinációjára lehet hatással [370]. Bizonyított tény, hogy a rezisztencia gének megszerzése és fenntartása egy energiaköltséges folyamat. A multirezisztens törzsek szelekció hiányában az *in vitro* vizsgálatok során nem maradnak fenn sokáig, azonban *in vivo* körülmények között megfigyelték, hogy sikeresen túlélnek és hosszútávon képesek fennmaradni [274]. Ki kell emelni azt is, hogy többszöri megismétlés hatására nagy valószínűséggel nem kapnánk ugyanazt az eredményt [242], ami a baktériumok fitnessének és sztochasztikus növekedésének tudható be.

A legtöbb vizsgált hatóanyaggal szemben megnövekedett MIC-érték mögött multidrug efflux pumparendszer aktiválódás állhat. Ma és mtsai. leírták, hogy az *acrAB* gén által meghatározott komplex pumparendszer reagál a különféle környezeti terhelésekre [371], a pumparendszert szabályozó *marR* gén mutációját a florfenikol, az enrofloxacin és a potenciált szulfonamid minták esetén figyeltük meg, az *acrAB* operont a *marR* gén mutációk bizonyítottan felülszabályozzák [371], ami egy többszörös antibiotikum rezisztencia transzkripció regulátor gén [372]. Pourahmad és mtsai. szintén az *acrAB-tolC* efflux pumpa komplex túlműködésével magyarázzák *E. coli* esetén a csökkent antibiotikum hatékonyságot [373]. Yaqoob és mtsai. a pumparendszer regulátoraként írják le az *acrR* és *robA* géneket [374], mely gének mutációját a cefotaxim, a florfenikol és az enrofloxacin minták esetén figyeltük meg. A pumparendszer fokozott működését szintetikus antibiotikumok alkalmazása esetén tapasztalták, csökkent oxidatív stressz mellett *E. coli* törzs esetén [373]. Maslowska és mtsai. leírták, hogy az SOS stressz válasz szabályozásában két fő génnek, a *lexA* és *recA* géneknek van kulcsszerepe, melyek további legalább 50 gén fokozott expresszióját vonják maguk után [375], vizsgálataink

során mindkét gén jelenlétét azonosítottuk az összes mintában, valamint a legtöbb általuk szabályozott SOS-box gének is megtalálhatók voltak a genomban. Az *acrAB-tolC* efflux pumparendszer működésének lényege, hogy az *acrR* represszor gén alap esetben elnyomja azt [376, 377]. A génben bekövetkező pontmutációk és ezáltal hibás változat létrejötte azonban a represszor gén működésének hiányához vezet, ami aktiválja a pumparendszert. A pumparendszer az összes mintában megtalálható volt és cefotaxim, florfenikol, valamint enrofloxacin esetén az *acrR* represszor gén mutációját ki is tudtuk mutatni. Amoxicillin hatóanyag esetén az *acrB* komponens mutációja vezethetett feltételezhetően a rendszer aktiválódásához. Cefotaxim esetén a bekövetkező MIC-érték növekedések háttérében összetettebb folyamatok állhatnak, amelyek egyrészt a β -laktám hatóanyagokkal szemben rezisztenciát enzimatikus úton biztosító *ampC* gén promóter szakaszának komplex, többszörös aminosavcserékkel járó mutációja állhat, másrészt az *ampC* gént értintő pontmutáció. Ezen kívül az *emrAB-tolC*, az *mdtABC-tolC* pumparendszerek esetén is megfigyeltünk mutációkat a cefotaxim, a florfenikol és a potenciált szulfonamid és enrofloxacin hatóanyagok esetén. Az ezeket szabályozó *emrR* és *mdtM* represszor gének mutációja is bekövetkezett. Több esetben tapasztaltuk a neomicin hatóanyag változatlan MIC-értékét. Babosan és mtsai. kimutatták, hogy az aminoglikozidok által kiváltott SOS stressz aktiválódásáért a *qnr* gének jelenléte és a *recB* gén deléciója felelős [378], vizsgálataink során csak a *recB* gént sikerült kimutatni az *E. coli* törzsből, azonban ennek a génnek a mutációját nem tapasztaltuk. Az egyes hatóanyagcsoportokra specifikus mutációt sikerült azonosítanunk cefotaxim esetén (*ampC*), kolisztin esetén (*ftsI*, *ompC*), potenciált szulfonamid esetén (*folA*, *folP*) és enrofloxacin esetén (*parC*, *parA* és *gyrA*).

Összességében tehát elmondhatjuk, hogy az egyes hatóanyagok indukálta más hatóanyag esetén bekövetkező MIC-érték növekedés oka feltételezhetően a mutációk következtében háromféle multidrug efflux pumparendszer fokozott expressziója, ezeket az *acrAB-tolC*, az *mdtABC-tolC* és az *emrAB-tolC* gének határozzák meg. Az ezeket szabályozó *acrR*, *emrR*, *marR*, *mdtM*, és *rpbA* represszor génekben bekövetkező mutációk pedig fokozták ezen pumparendszerek működését. Ezek igazolása érdekében a későbbiekben transzkriptomikai vizsgálatok szükségesek, amivel a gének fenotípusos kifejeződésére lehet következtetni. Az antibiotikum indukálta SOS mechanizmusok evolúciós és szelekciós nyomásának vizsgálata, annak mélyebb megértése érdekében eredményeink alapján indokolt. Bizonyítani kell, hogy a β -laktám hatóanyagokkal és a potenciált szulfonamidokkal történő kezelések, különös tekintettel a cefalosporinokra nagyobb mértékben idézik elő a mutáció gyakoriságát, illetve, hogy ez összefüggést mutathat a környezetben széles körben megfigyelhető rezisztens törzsek gyakoriságával

és terjedésével. Eredményeink aggodalomra adhatnak okot a cefalosporinok tekintetében, amelyek nemcsak állategészségügyi felhasználása és jelentősége kiemelkedő, hanem a közegészségügyben betöltött szerepe is. Fennáll az a paradox lehetőség, hogy bizonyos antibiotikum hatóanyagok hipermutátorként növelhetik az antibiotikum-rezisztencia megszerzésének valószínűségét [379]. Az egyes hatóanyagok közötti keresztrezisztencia mélyebb feltárása, az összefüggéseinek tisztázása a gyakorlati terápia megválasztása során kiemelt jelentőséggel bír.

Az *E. coli* országos érzékenységi felmérése során összesen 411 háziyúkból izolált törzsnek vizsgáltuk meg az érzékenységét. Az állat- és közegészségügy számára kritikusan fontos hatóanyagok közül ceftriaxon hatóanyagra 24%-os rezisztenciát tapasztaltunk, Kaushik és mtsai. 28,2%-os [380], Mandal és mtsai. ugyanakkor cefotaximra 78,1%-os rezisztenciát írtak le [381]. Enrofloxacin esetében a törzsek 53%-a bizonyult rezisztensnek, ehhez képest Majewski és mtsai. 34,6%-os [382], Hassan és mtsai. 32%-os [383], rezisztenciát írtak le, ciprofloxacinra végzett vizsgálatok során Kaushik és mtsai. 6,5%-os [380], Much és mtsai. ökológiai tartásban 33,3%-os, hagyományos tartásban 69,1%-os [384], De Jong és mtsai. 7,3-21,3% közötti [385] rezisztenciát mutattak ki. Kolisztin hatóanyagra 27%-os rezisztenciát figyeltünk meg, ugyanakkor Adelowo és mtsai. nem mutattak ki rezisztens törzset [386], Kempf és mtsai. pedig 0,6%-os rezisztenciát írtak le [196]. Amoxicillin esetén 56%-os rezisztenciát tapasztaltunk, Hassan és mtsai. ampicillinre 32%-os [383], Kaushik és mtsai. penicillinre 89,4%-os, ampicillinre 80,4%-os [380], Much és mtsai. ampicillinre ökológiai tartásban 19%-os, hagyományos tartásban 33,8%-os [384], De Jong és mtsai. ampicillinre 32,7-65,3% közötti [385], Rivera-Gomis és mtsai. ampicillinre 30,8%-os [387] rezisztenciát állapítottak meg. Amoxicillin-klavulánsav esetén 22%-os volt a rezisztencia, ami alátámasztja, hogy a törzsek egy része β -laktamáz termelő. Majewski és mtsai. ugyanakkor 84,6%-os [382] rezisztenciát mutattak ki. Imipenem esetén 15%-os volt a rezisztencia, azonban a hatóanyag stabilitási problémája miatt ezek az eredmények csupán tájékoztató jellegűek. Shaib és mtsai. nem mutattak ki rezisztenciát [388], Moffo és mtsai. ugyanakkor kb. 20%-os rezisztenciát írtak le [389]. Neomicinnél 72%-os volt a rezisztencia, hozzánk hasonló módon Majewski és mtsai. 84,6%-os [382], ugyanakkor Kaushik és mtsai. gentamicinre 13%-os [380], De Jong és mtsai. gentamicinre 0,9-7% közötti [385], Rivera-Gomis és mtsai. gentamicinre 12,3%-os [387] rezisztenciát figyeltek meg. Spektinomycinre a törzsek 62%-os rezisztenciát mutattak, Adelowo és mtsai. 47%-os rezisztenciát állapítottak meg [386]. Doxiciklinnél 45%-os volt a rezisztencia, Hassan és mtsai. 44%-os [383], Majewski és mtsai. 36%-os [382], Mandal és mtsai. már 78,1%-os [381], Kaushik és mtsai. tetraciklinre 17,4%-os [380], Much és mtsai. tetraciklinre ökológiai tartásban 27,6%-os, hagyományos tartásban 25,9%-os [384], De Jong és mtsai.

tetraciklinre 41,3-67,5% közötti [385], Rivera-Gomis és mtsai. tetraciklinre 62,1%-os [387] rezisztenciát figyeltek meg. Florfenikolra a rezisztencia mértéke elérte a 63%-ot, ugyanakkor Adelowo és mtsai. nem mutattak ki rezisztenciát [386], Wang és mtsai. 0,9%-os rezisztenciát írtak le [390]. Potenciált szulfonamidra a törzsek 43%-a rezisztensnek bizonyult, Hassan és mtsai. viszont csak 38%-os [383], De Jong és mtsai. 27,5-49,7% közötti [385], Majewski és mtsai. 53,5%-os [382] rezisztenciát írtak le.

Ugyanezt a felmérést 470 pulykából izolált törzsön is elvégeztük. Ceftriaxon esetén 24%-os rezisztenciát tapasztaltunk, ezzel szemben Cook és mtsai. nem mutattak ki rezisztenciát [391], Boulianne és mtsai. viszont 33,1%-os rezisztenciát figyeltek meg [392], Agunos és mtsai. 1-10% közötti értékeket figyeltek meg egy 2013-2017 közötti felmérés során [393]. Enrofloxacinra 63%-os rezisztenciát tapasztaltunk, ellenben Boulianne és mtsai. nem mutattak ki rezisztenciát [392], ahogy Cook és mtsai. sem [391], ciprofloxacin esetén azonban Grobbel és mtsai. 35%-os rezisztenciát írtak le [394], Suwono és mtsai. pedig 28%-os rezisztenciát tapasztaltak [395]. Kolisztin esetén 27%-os rezisztenciát tapasztaltunk, Nobili és mtsai. vágóhídi pulykaminták esetén 3,2%-os rezisztenciát figyeltek meg [396], Mesa-Varona és mtsai. német pulykatelepeken 2014-ben nem mutattak ki rezisztenciát, azonban 2017-ben már 9,5%-os rezisztenciát tapasztaltak [397].

Amoxicillinre 61%-os rezisztenciát tapasztaltunk. Shrestha és mtsai. viszont csak 31,2%-os rezisztenciát figyelt meg [398], de ampicillinre Suwono és mtsai. 67,6%-os rezisztenciát mutattak ki [395]. Agunos és mtsai. 2013-2017 között viszont 50%-ról 70%-ra történő növekedését figyelték meg a rezisztencia mértékének [393]. Amoxicillin-klavulánsav esetén 19%-os rezisztenciát mutattunk ki, Boulianne és mtsai. 34,5%-os rezisztenciát tapasztaltak [392]. Doxyciklinre 63%-os rezisztenciát mutattunk ki, amihez képest Shrestha és mtsai. 61,7%-os [398], Grobbel és mtsai. pedig 49%-os rezisztenciát írtak le [394]. Aminoglikozidok közül neomicin esetében 73%-os rezisztenciát kaptunk, Shrestha és mtsai. összevont vizsgálata (neomicin, gentamicin, sztreptomycin) 45%-os [398], Boulianne és mtsai. 61,1%-os, neomicinre 27,9%-os [392], viszont gentamicinre Grobbel és mtsai. 5%-os [394], Suwono és mtsai. pedig 11,8%-os rezisztenciát figyeltek meg [395]. Agunos és mtsai. 2013-2017 között folyamatos rezisztencia növekedést mutattak ki, 10%-ról indulva 30%-os mértékig [393]. Potenciált szulfonamidra (szulfametoxazol és trimetoprim) 52%-os rezisztenciát tapasztaltunk, ellenben Shrestha és mtsai. 30,4%-os rezisztenciát állapítottak meg [398], de Boulianne és mtsai. 82,7%-os rezisztenciát mutattak ki [392].

Elvégeztük az izolált törzsek β -laktamáz és ESBL termelésre irányuló fenotípusos vizsgálatokat. A fenotípusosan β -laktamáz termelő törzsek aránya a 881 törzsre nézve 36% volt, ami az amoxicillin hatóanyag és annak klavulánsavas kombinációban használt

vizsgálat során a legalább 3x MIC-érték csökkenést mutató törzsek arányát mutatja. Az ESBL termelésre irányuló fenotípusos vizsgálat során cefotaxim hatóanyagra önmagában 23%-os rezisztenciát tapasztaltunk, Adorján és mtsai. 38%-os, egy évre rá már 100%-os [399], Wasyl és mtsai. viszont brojlercsirkénél csak 8,65%-os, tojtyúkknál 3,92%-os és pulykánál pedig 3,75%-os [400], Yassin és mtsai. hozzánk hasonló módon 21,3%-os [401], Martínez-Álvarez és mtsai. 1,14%-os [402], Kaesbohrer és mtsai. 3,2%-os [403], Grobbel és mtsai. 1,5%-os [404], Musu és mtsai. viszont 30,5%-os rezisztenciát írtak le [405]. A cefotaxim-klavulánsav kombináció esetén a rezisztencia 8%-os volt, összehasonlító irodalmi adat azonban nem áll rendelkezésre baromfiban. Az ESBL termelő törzsek arányát a 881 törzsre nézve fenotípusosan 6%-ra becsültük, Nahla és mtsai. a törzsek 2,2%-ban [406], Asai és mtsai. 10,1%-ban [407], Shrivastav és mtsai. viszont 33,5%-ban [408], Martínez-Álvarez és mtsai. pedig 20,7%-ban határozták [402]. Overdevest és mtsai. a vizsgált törzseknek 76,8%-át azonosították ESBL termelőként [409], Doi és mtsai. Sevilában 67%-ban, Pittsburghben 85%-ban állapították meg ez ESBL termelő törzsek arányát [410]. Musu és mtsai. ugyanakkor csak 27,9%-os arányról számoltak be [405].

A vizsgált multirezisztens törzsek 0,7%-a legalább 16-féle hatóanyaggal szemben, 2,4%-a 15-féle hatóanyaggal, 3,1%-a 14-féle hatóanyaggal, 6,4%-a 13-féle hatóanyaggal, 13,3%-a 12-féle hatóanyaggal, 18,1%-a 11-féle hatóanyaggal és 13,6%-a 10-féle hatóanyaggal szemben mutatott rezisztenciát. Összességében a fenotípusos vizsgálati eredmények alapján a törzsek 26,7%-a esetén feltételeztük, hogy az XDR törzs; Lu és mtsai. vizsgálataik során a törzsek 10,34%-a esetén azonosította azokat XDR-ként [411], Al-Mustapha és mtsai. pedig a törzsek 35,6%-a esetén állapította meg ugyanezt [412], Hess és mtsai. vizsgálatában a törzsek 36,8%-a volt XDR [413]. A törzsek 2,9%-a esetén tapasztaltuk azt, hogy azok PDR törzsek voltak, ezzel ellentétben Hess és mtsai. nem találtak PDR törzset tojtyúkokban [413].

A 253 új generációs szekvenálással vizsgált törzs esetén összesen 416 olyan ARG-t azonosítottunk, amelyek β -laktamáz termelésért, illetve ESBL termelésért felelősek. A fenotípusos vizsgálatok során ESBL termelőnek bizonyult törzsek 81,6%-a esetén tudtunk biztosan genetikailag mögötte álló ARG-t azonosítani. A szekvenálással vizsgált leválogatott törzsek 9,1%-a hordozott CTX-M típusú ESBL gént, 62,8%-a TEM típusú ESBL gént és mindössze 1,6%-a SHV típusú és 1,6%-a OXA típusú ESBL gént. A β -laktamáz túltermelésért felelős *ampC* gén gyakorisága 8,3% volt, emellett az EC típusú β -laktamáz termelésért felelős gének 81%-os gyakorisággal fordultak elő. Menck-Costa és mtsai. az általuk vizsgált törzsek 80%-át azonosították MDR-ként és 51% esetén igazolták genetikailag a CTX-M-1 gén hordozását [414], ami jóval gyakoribb előfordulás, mint az

általunk erre a génre megfigyelt 7,5%-os gyakoriság. A *CTX-M-14* és *CTX-M-15* változatok széles körben való elterjedése ismert a közegészségügyben [415] és az általtegeszségügyben [102]. Belmahdi és mtsai. csirkékben 1%-os, pulykákban pedig 5%-os *CTX-M* típusú géngyakoriságot írtak le [416], szemben vizsgálataink során mi 9,1%-os gyakoriságot figyeltünk meg. Ferreira és mtsai. extenzív tartásban 51,9%-os, intenzív tartásban 68,8%-os MDR arányt mutattak ki, az ESBL termelésért felelős gének jelenléte előbbi esetén 82,4%-os, utóbbi esetén 90,5%-os volt [417], ami közel áll az általunk szekvenált törzsekben megfigyelt 75,1%-os előfordulási gyakorisághoz. Ewers és mtsai. kommenzalista törzseket vizsgálva azok 97%-át MDR-ként azonosították, az ESBL termelő gének közül a leggyakoribb az *SHV-12* volt, a *CTX-M-1* gén gyakorisága pedig 22,5% volt [418], vizsgálataink során *SHV-12* gént nem mutattunk ki, a *CTX-M-1* gén pedig 12,1%-os gyakorisággal fordult elő az ESBL gének között. Clemente és mtsai. a vizsgálatba bevont baromfi eredetű *E. coli* törzsek 42,2%-a esetén azonosítottak genetikailag ESBL termelésért felelős gént, az *ampC* gén jelenléte pedig 11,9%-os volt [419], vizsgálatainkban az ESBL termelésért felelős gének 75,1%-os gyakorisággal, az *ampC* gén pedig 8,3%-os gyakorisággal fordult elő.

Összességében elmondhatjuk, hogy a baromfiágazatban, különösen az *E. coli* esetén az antimikrobiális rezisztencia mértéke igen aggasztó, ami összefüggésbe hozható azzal, hogy a baromfiágazat rendelkezik a sertéságazat után a második legnagyobb antibiotikum felhasználással. Eredményeink alátámasztják a rendszeres felmérések és monitorozások szükségszerűségét, a többlépcsős szűrés segítségével hatékonyan szűkíthető a törzsek száma, a fenotípusos eredmények alapján meg tudjuk határozni azon törzseket, amelyek esetében indokolt lehet a genetikai vizsgálatok elvégzése, hogy a multirezisztencia pontos genetikai hátterét feltárjuk. Az ESBL törzsek jelenléte a baromfiágazatban aggasztó, hiszen komoly közegészségügyi kockázatot hordoznak. A későbbiekben a vizsgálatok időben történő országos megismétlése a rezisztencia változásának időbeni folyamatait teszi lehetővé, ún. időbeli trendek feltérképezésével, kiegészítve azt genetikai módszerekkel azonosított közegészségügyi jelentőséggel bíró rezisztencia gének regionális térképének elkészítésével. Az eredményeink összehasonlítása a humán adatokkal megteremti az állategészségügy és a közegészségügy közötti Egy Egészség (*One Health*) koncepciót.

7. Új tudományos eredmények

Elsőként valósítottuk meg Magyarországon az antimikrobiális rezisztencia evolúciós és koszelekciós vizsgálatára alkalmas MEGA-plate módszertant. Elsőként alkalmaztuk a rendszert hatféle, baromfifélékben engedélyezett és közegészségügyi szempontból fontos hatóanyag vizsgálatára, ATCC *Escherichia coli* törzs $\frac{1}{4}$ MIC-értékének 1x, 10x, 100x és 1000x koncentrációjában alkalmazva. Az új módszertan alkalmas az antimikrobiális rezisztencia kialakulásának, az egyes hatóanyagok közötti keresztrezisztencia összefüggéseinek vizsgálatára.

Elsőként végeztük el Magyarországon nagylétszámú házityúk és pulyka állományok széleskörű antimikrobiális rezisztencia helyzetének felmérését, azt összehasonlítva közegészségügyi érzékenységi adatokkal, ezzel megteremtve az „Egy Egészség” elvet, majd ezt kiegészítettük fenotípusos és genotípusos ESBL termelésre irányuló vizsgálatokkal.

A főbb tudományos eredmények:

1. A MEGA-plate módszertan magyarországi adaptációja és a laboratóriumi rutinba való bevezetése.
2. Számos állat- és humán gyógyászatban használt hatóanyag mutációs szelekciós nyomásának genetikai feltérképezése, efflux-pumpák aktiválódásának és a SOS stressz-válaszok megfigyelése.
3. Az *Escherichia coli* törzsek állat- és közegészségügyi szempontból jelentős antibiotikumokkal szembeni érzékenységének felmérése Magyarországon 2022-2023 között
4. Az *Escherichia coli* törzsek β -laktamáz és ESBL termelésének fenotípusos vizsgálata és ezek genetikai hátterének feltérképezése, Magyarországon 2022-2023 között izolált törzseken.

8. Irodalomjegyzék

1. Lupo A, Coyne S, Berendonk TU (2012) Origin and Evolution of Antibiotic Resistance: The Common Mechanisms of Emergence and Spread in Water Bodies. *Front Microbiol* 3:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00018>
2. Maiden MCJ (1998) Horizontal Genetic Exchange, Evolution, and Spread of Antibiotic Resistance in Bacteria. *Clinical Infectious Diseases* 27:S12–S20. <https://doi.org/10.1086/514917>
3. Aminov RI (2011) Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front Microbiol* 2:158. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00158>
4. Cox G, Wright GD (2013) Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* 303:287–292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
5. Recacha E, Machuca J, Díaz-Díaz S, García-Duque A, Ramos-Guelfo M, Docobo-Pérez F, Blázquez J, Pascual A, Rodríguez-Martínez JM (2019) Suppression of the SOS response modifies spatiotemporal evolution, post-antibiotic effect, bacterial fitness and biofilm formation in quinolone-resistant *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 74:66–73. <https://doi.org/10.1093/jac/dky407>
6. Fajardo A, Martínez-Martín N, Mercadillo M, Galán JC, Ghysels B, Matthijs S, Cornelis P, Wiehlmann L, Tümmler B, Baquero F, Martínez JL (2008) The neglected intrinsic resistance of bacterial pathogens. *PLoS One* 3:e1619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001619>
7. Gomes C, Martínez-Puchol S, Palma N, Horna G, Ruiz-Roldán L, Pons MJ, Ruiz J (2017) Macrolide resistance mechanisms in Enterobacteriaceae: Focus on azithromycin. *Crit Rev Microbiol* 43:1–30. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1136261>
8. Davies J, Davies D (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
9. Reygaert W (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): molecular aspects of antimicrobial resistance and virulence. *Clin Lab Sci* 22:115–119
10. De Pascale G, Wright GD (2010) Antibiotic resistance by enzyme inactivation: from mechanisms to solutions. *Chembiochem* 11:1325–1334. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000067>
11. Delcour AH (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* 1794:808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
12. Li X-Z, Nikaido H (2009) Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69:1555–1623. <https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000>
13. Christaki E, Marcou M, Tofarides A (2020) Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *J Mol Evol* 88:26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
14. Wilson DN, Haurlyuk V, Atkinson GC, O'Neill AJ (2020) Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nature Reviews Microbiology*
15. Munita JM, Arias CA (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 4:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016–2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
16. Sánchez-Osuna M, Barbé J, Erill I (2023) Systematic In Silico Assessment of Antimicrobial Resistance Dissemination across the Global Plasmidome. *Antibiotics (Basel)* 12:281. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020281>
17. Ojkc N, Serbanescu D, Banerjee S (2022) Antibiotic Resistance via Bacterial Cell Shape-Shifting. *mBio* 13:e0065922. <https://doi.org/10.1128/mbio.00659-22>
18. Rodrigo MKD, Saiganesh A, Hayes AJ, Wilson AM, Anstey J, Pickering JL, Iwasaki J, Hillas J, Winslow S, Woodman T, Nitschke P, Lacey JA, Breese KJ, van der Linden MPG, Giffard PM, Tong SYC, Gray N, Stubbs KA, Carapetis JR, Bowen AC, Davies MR, Barnett TC (2022) Host-dependent resistance of Group A *Streptococcus* to sulfamethoxazole mediated by a horizontally-acquired reduced folate transporter. *Nat Commun* 13:6557. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34243-3>
19. Opposing effects of target overexpression reveal drug mechanisms | *Nature Communications*. <https://www.nature.com/articles/ncomms5296>. Accessed 23 Oct 2023
20. European Medicines Agency (2020) Categorisation of antibiotics in the European Union. *EMA/CVMP/CHMP/682198/2017* 73
21. Li X-Z, Nikaido H (2004) Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 64:159–204. <https://doi.org/10.2165/00003495-200464020-00004>
22. Yu EW, Aires JR, Nikaido H (2003) AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J Bacteriol* 185:5657–5664. <https://doi.org/10.1128/JB.185.19.5657-5664.2003>
23. Rahmati S, Yang S, Davidson AL, Zechiedrich EL (2002) Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Mol Microbiol* 43:677–685. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02773.x>

24. White DG, Goldman JD, Demple B, Levy SB (1997) Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:6122–6126. <https://doi.org/10.1128/jb.179.19.6122-6126.1997>
25. Rosenberg EY, Bertenthal D, Nilles ML, Bertrand KP, Nikaido H (2003) Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol Microbiol* 48:1609–1619. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03531.x>
26. Randall LP, Woodward MJ (2002) The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res Vet Sci* 72:87–93. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2001.0537>
27. Lau SY, Zgurskaya HI (2005) Cell division defects in *Escherichia coli* deficient in the multidrug efflux transporter AcrEF-TolC. *J Bacteriol* 187:7815–7825. <https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7815-7825.2005>
28. Lomovskaya O, Lewis K, Matin A (1995) EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J Bacteriol* 177:2328–2334. <https://doi.org/10.1128/jb.177.9.2328-2334.1995>
29. Tanabe H, Yamasak K, Furue M, Yamamoto K, Katoh A, Yamamoto M, Yoshioka S, Tagami H, Aiba HA, Utsumi R (1997) Growth phase-dependent transcription of *emrKY*, a homolog of multidrug efflux *emrAB* genes of *Escherichia coli*, is induced by tetracycline. *J Gen Appl Microbiol* 43:257–263. <https://doi.org/10.2323/jgam.43.257>
30. Nagakubo S, Nishino K, Hirata T, Yamaguchi A (2002) The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of *Escherichia coli* via a novel multidrug exporter system, MdtABC. *J Bacteriol* 184:4161–4167. <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4161-4167.2002>
31. Srikumar R, Kon T, Gotoh N, Poole K (1998) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Efflux Pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a Multidrug-Sensitive *Escherichia coli* Strain. *Antimicrob Agents Chemother* 42:65–71
32. Pamp SJ, Gjermansen M, Johansen HK, Tolker-Nielsen T (2008) Tolerance to the antimicrobial peptide colistin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is linked to metabolically active cells, and depends on the *pmr* and *mexAB-oprM* genes. *Mol Microbiol* 68:223–240. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06152.x>
33. Poole K (2004) Resistance to β -lactam antibiotics. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 61:2200–2223. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4060-9>
34. Massova I, Mobashery S (1998) Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1–17. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.1>
35. Sykes RB, Matthew M (1976) The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2:115–157. <https://doi.org/10.1093/jac/2.2.115>
36. Livermore DM (1995) beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8:557–584. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.4.557>
37. Abraham EP, Chain E (1940) An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* 146:837–837. <https://doi.org/10.1038/146837a0>
38. Rawat D, Nair D (2010) Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis* 2:263–274. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.68531>
39. Allen HK, Moe LA, Rodbumrer J, Gaarder A, Handelsman J (2009) Functional metagenomics reveals diverse beta-lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME J* 3:243–251. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.86>
40. Barlow M, Hall BG (2002) Phylogenetic analysis shows that the OXA beta-lactamase genes have been on plasmids for millions of years. *J Mol Evol* 55:314–321. <https://doi.org/10.1007/s00239-002-2328-y>
41. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 59:165–174. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl483>
42. Bush K (1989) Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 33:259–263
43. Bush K (1989) Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother* 33:264–270. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.3.264>
44. Bush K (1989) Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrob Agents Chemother* 33:271–276. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.3.271>
45. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1211–1233. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211>
46. Esterly JS, Richardson CL, Eltoukhy NS, Qi C, Scheetz MH (2011) Genetic Mechanisms of Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii*. *Ann Pharmacother* 45:218–228. <https://doi.org/10.1345/aph.1P084>
47. Bergström S, Normark S (1979) Beta-lactam resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* caused by elevated production of the *ampC*-mediated chromosomal beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 16:427–433. <https://doi.org/10.1128/AAC.16.4.427>

48. 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>
49. Hopkins KL, Batchelor MJ, Liebana E, Deheer-Graham AP, Threlfall EJ (2006) Characterisation of CTX-M and AmpC genes in human isolates of *Escherichia coli* identified between 1995 and 2003 in England and Wales. *Int J Antimicrob Agents* 28:180–192. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.03.027>
50. Crossman LC, Chaudhuri RR, Beatson SA, Wells TJ, Desvaux M, Cunningham AF, Petty NK, Mahon V, Brinkley C, Hobman JL, Savarino SJ, Turner SM, Pallen MJ, Penn CW, Parkhill J, Turner AK, Johnson TJ, Thomson NR, Smith SGJ, Henderson IR (2010) A commensal gone bad: complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. *J Bacteriol* 192:5822–5831. <https://doi.org/10.1128/JB.00710-10>
51. da Silva Dias RC, Borges-Neto AA, D’Almeida Ferraiuoli GI, de-Oliveira MP, Riley LW, Moreira BM (2008) Prevalence of AmpC and other beta-lactamases in enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 60:79–87. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.018>
52. Potz NAC, Hope R, Warner M, Johnson AP, Livermore DM, London & South East ESBL Project Group (2006) Prevalence and mechanisms of cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae in London and South-East England. *J Antimicrob Chemother* 58:320–326. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl217>
53. Darphorn TS, Hu Y, Koenders-van Sintanneland BB, Brul S, Ter Kuile BH (2021) Multiplication of ampC upon Exposure to a Beta-Lactam Antibiotic Results in a Transferable Transposon in *Escherichia coli*. *Int J Mol Sci* 22:9230. <https://doi.org/10.3390/ijms22179230>
54. Jamborova I, Dolejska M, Zurek L, Townsend AK, Clark AB, Ellis JC, Papousek I, Cizek A, Literak I (2017) Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and quinolones in *Escherichia coli* from American crows in the USA. *Environ Microbiol* 19:2025–2036. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13722>
55. Horii T, Arakawa Y, Ohta M, Sugiyama T, Wacharotayankun R, Ito H, Kato N (1994) Characterization of a plasmid-borne and constitutively expressed blaMOX-1 gene encoding AmpC-type beta-lactamase. *Gene* 139:93–98. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90529-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90529-0)
56. Barnaud G, Arlet G, Verdet C, Gaillot O, Lagrange PH, Philippon A (1998) *Salmonella enteritidis*: AmpC plasmid-mediated inducible beta-lactamase (DHA-1) with an ampR gene from *Morganella morganii*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:2352–2358. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.9.2352>
57. Gonzalez Leiza M, Perez-Diaz JC, Ayala J, Casellas JM, Martinez-Beltran J, Bush K, Baquero F (1994) Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. *Antimicrob Agents Chemother* 38:2150–2157. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.9.2150>
58. Chirindze LM, Zimba TF, Sekyere JO, Govinden U, Chenia HY, Sundsfjord A, Essack SY, Simonsen GS (2018) Faecal colonization of *E. coli* and *Klebsiella* spp. producing extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC in Mozambican university students. *BMC Infect Dis* 18:244. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3154-1>
59. Bradford PA (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 14:933–951, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
60. Bradford PA, Urban C, Jaiswal A, Mariano N, Rasmussen BA, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K (1995) SHV-7, a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase, identified in *Escherichia coli* isolates from hospitalized nursing home patients. *Antimicrob Agents Chemother* 39:899–905. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.4.899>
61. Rasheed JK, Jay C, Metchock B, Berkowitz F, Weigel L, Crellin J, Steward C, Hill B, Medeiros AA, Tenover FC (1997) Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 41:647–653. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.3.647>
62. Sabaté M, Tarragó R, Navarro F, Miró E, Vergés C, Barbé J, Prats G (2000) Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1970–1973. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1970-1973.2000>
63. Aleem M, Azeem AR, Rahmatullah S, Vohra S, Nasir S, Andleeb S (2021) Prevalence of Bacteria and Antimicrobial Resistance Genes in Hospital Water and Surfaces. *Cureus* 13:e18738. <https://doi.org/10.7759/cureus.18738>
64. de Been M, Lanza VF, de Toro M, Scharringa J, Dohmen W, Du Y, Hu J, Lei Y, Li N, Tooming-Klunderud A, Heederik DJJ, Fluit AC, Bonten MJM, Willems RJL, de la Cruz F, van Schaik W (2014) Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLoS Genet* 10:e1004776. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004776>
65. Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouveleki LS (2004) Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 234:209–213. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.03.028>

66. Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y (2006) Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3098–3101. <https://doi.org/10.1128/AAC.00438-06>
67. Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P (1999) Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother* 43:573–581. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.3.573>
68. Silva J, Aguilar C, Ayala G, Estrada MA, Garza-Ramos U, Lara-Lemus R, Ledezma L (2000) TLA-1: a new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:997–1003. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.4.997-1003.2000>
69. Ortiz de la Rosa J-M, Nordmann P, Poirel L (2019) ESBLs and resistance to ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam combinations in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 74:1934–1939. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz149>
70. Adegoke AA, Madu CE, Aiyegoro OA, Stenström TA, Okoh AI (2020) Antibiogram and beta-lactamase genes among cefotaxime resistant *E. coli* from wastewater treatment plant. *Antimicrob Resist Infect Control* 9:46. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-0702-4>
71. Salverda MLM, De Visser JAGM, Barlow M (2010) Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS Microbiol Rev* 34:1015–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00222.x>
72. Athanasakopoulou Z, Reinicke M, Diezel C, Sofia M, Chatzopoulos DC, Braun SD, Reissig A, Spyrou V, Monecke S, Ehrlich R, Tsilipounidaki K, Giannakopoulos A, Petinaki E, Billinis C (2021) Antimicrobial Resistance Genes in ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolates from Animals in Greece. *Antibiotics (Basel)* 10:389. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040389>
73. Aguirre L, Vidal A, Seminati C, Tello M, Redondo N, Darwich L, Martín M (2020) Antimicrobial resistance profile and prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), AmpC beta-lactamases and colistin resistance (*mcr*) genes in *Escherichia coli* from swine between 1999 and 2018. *Porcine Health Manag* 6:8. <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00146-2>
74. Carvalho I, Carvalho JA, Martínez-Álvarez S, Sadi M, Capita R, Alonso-Calleja C, Rabbi F, Dapkevicius M de LNE, Igrejas G, Torres C, Poeta P (2021) Characterization of ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Samples in a Northern Portuguese Hospital: Predominance of CTX-M-15 and High Genetic Diversity. *Microorganisms* 9:1914. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091914>
75. Kim S, Kim H, Kim Y, Kim M, Kwak H, Ryu S (2020) Whole-Genome Sequencing-Based Characteristics in Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Retail Meats in Korea. *Microorganisms* 8:E508. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040508>
76. Page MGP (2008) Extended-spectrum beta-lactamases: structure and kinetic mechanism. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 1:63–74. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01863.x>
77. Evans BA, Amyes SGB (2014) OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 27:241–263. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>
78. Couture F, Lachapelle J, Levesque RC (1992) Phylogeny of LCR-1 and OXA-5 with class A and class D beta-lactamases. *Mol Microbiol* 6:1693–1705. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb00894.x>
79. Walther-Rasmussen J, Høiby N (2006) OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 57:373–383. <https://doi.org/10.1093/jac/dki482>
80. Hall LM, Livermore DM, Gur D, Akova M, Akalin HE (1993) OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1637–1644. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.8.1637>
81. Philippon LN, Naas T, Bouthors AT, Barakett V, Nordmann P (1997) OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2188–2195. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.10.2188>
82. Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR (2003) Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2859–2863. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2859-2863.2003>
83. Shin KS, Son BR, Hong SB, Kim J (2008) Dipicolinic acid-based disk methods for detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis* 62:102–105. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.015>
84. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y (2002) Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 40:3798–3801. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.10.3798-3801.2002>
85. Carfi A, Pares S, Duée E, Galleni M, Duez C, Frère JM, Dideberg O (1995) The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *EMBO J* 14:4914–4921

86. Lee M-F, Peng C-F, Hsu H-J, Chen Y-H (2008) Molecular characterisation of the metallo-beta-lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 32:475–480. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.07.009>
87. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y (2003) PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 41:5407–5413. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5407-5413.2003>
88. Liénard BMR, Garau G, Horsfall L, Karsisiotis AI, Damblon C, Lassaux P, Papamichael C, Roberts GCK, Galleni M, Dideberg O, Frère J-M, Schofield CJ (2008) Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo-beta-lactamases by thiols. *Org Biomol Chem* 6:2282–2294. <https://doi.org/10.1039/b802311e>
89. Paget JT, Burge TS (2014) Keeping New Delhi metallo-β-lactamase-1 at the door. *J Burn Care Res* 35:e125-127. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e3182920d41>
90. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR (2011) Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother* 66:689–692. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq520>
91. Hornsey M, Phee L, Wareham DW (2011) A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo-β-lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5952–5954. <https://doi.org/10.1128/AAC.05108-11>
92. Zhang H, Hao Q (2011) Crystal structure of NDM-1 reveals a common β-lactam hydrolysis mechanism. *FASEB J* 25:2574–2582. <https://doi.org/10.1096/fj.11-184036>
93. Kopotsa K, Osei Sekyere J, Mbelle NM (2019) Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. *Ann N Y Acad Sci* 1457:61–91. <https://doi.org/10.1111/nyas.14223>
94. Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouveleki LS (2003) *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother* 47:395–397. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.395-397.2003>
95. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N (1994) Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 38:71–78. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.1.71>
96. Yang Y, Rasmussen BA, Bush K (1992) Biochemical characterization of the metallo-beta-lactamase CcrA from *Bacteroides fragilis* TAL3636. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1155–1157. <https://doi.org/10.1128/AAC.36.5.1155>
97. Leflon-Guibout V, Speldooren V, Heym B, Nicolas-Chanoine M (2000) Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: new genetic features of bla(TEM) genes. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2709–2714. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.10.2709-2714.2000>
98. Prinarakis EE, Miriagou V, Tzelepi E, Gazouli M, Tzouveleki LS (1997) Emergence of an inhibitor-resistant beta-lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother* 41:838–840. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.4.838>
99. Shurina BA, Page RC (2021) Structural Comparisons of Cefotaximase (CTX-M-ase) Sub Family 1. *Front Microbiol* 12:688509. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.688509>
100. Karim A, Poirel L, Nagarajan S, Nordmann P (2001) Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. *FEMS Microbiol Lett* 201:237–241. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10762.x>
101. Castanheira M, Simmer PJ, Bradford PA (2021) Extended-spectrum β-lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance* 3:dlab092. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>
102. 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>
103. 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 β-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>
104. Tsang KK, Maguire F, Zubyk HL, Chou S, Edalatmand A, Wright GD, Beiko RG, McArthur AG (2021) Identifying novel β-lactamase substrate activity through in silico prediction of antimicrobial resistance. *Microb Genom* 7. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000500>
105. 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 β-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>
106. 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>
 107. 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>
 108. LI J, JI X, DENG X, ZHOU Y, NI X, LIU X (2015) Detection of the SHV genotype polymorphism of the extended-spectrum β -lactamase-producing Gram-negative bacterium. *Biomed Rep* 3:261–265. <https://doi.org/10.3892/br.2015.416>
 109. Datta N, Kontomichalou P (1965) Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. *Nature* 208:239–241. <https://doi.org/10.1038/208239a0>
 110. Mena A, Plasencia V, García L, Hidalgo O, Ayestarán JI, Alberti S, Borrell N, Pérez JL, Oliver A (2006) Characterization of a Large Outbreak by CTX-M-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* and Mechanisms Leading to In Vivo Carbapenem Resistance Development. *J Clin Microbiol* 44:2831–2837. <https://doi.org/10.1128/JCM.00418-06>
 111. Bonnet R (2004) Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1–14. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>
 112. Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J (2000) A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 44:1936–1942. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1936-1942.2000>
 113. Chanawong A, M'Zali FH, Heritage J, Xiong J-H, Hawkey PM (2002) Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among Enterobacteriaceae in the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 46:630–637. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.630-637.2002>
 114. Munday CJ, Boyd DA, Brenwald N, Miller M, Andrews JM, Wise R, Mulvey MR, Hawkey PM (2004) Molecular and kinetic comparison of the novel extended-spectrum beta-lactamases CTX-M-25 and CTX-M-26. *Antimicrob Agents Chemother* 48:4829–4834. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4829-4834.2004>
 115. Nordmann P, Naas T (1994) Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 38:104–114. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.1.104>
 116. 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>
 117. 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>
 118. 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>
 119. 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>
 120. 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>
 121. 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>
 122. 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>
 123. Poole K (2007) Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* 39:162–176. <https://doi.org/10.1080/07853890701195262>
 124. 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>

125. Poole K (2004) Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* 10:12–26. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00763.x>
126. Kaczmarek FS, Gootz TD, Dib-Hajj F, Shang W, Hallowell S, Cronan M (2004) Genetic and Molecular Characterization of β -Lactamase-Negative Ampicillin-Resistant *Haemophilus influenzae* with Unusually High Resistance to Ampicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.5.1630-1639.2004>
127. Nikaido H, Zgurskaya HI (2001) AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:215–218
128. Okusu H, Ma D, Nikaido H (1996) AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol* 178:306–308. <https://doi.org/10.1128/jb.178.1.306-308.1996>
129. Tikhonova EB, Yamada Y, Zgurskaya HI (2011) Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Chem Biol* 18:454–463. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.02.011>
130. Li B, Yao Q, Pan X-C, Wang N, Zhang R, Li J, Ding G, Liu X, Wu C, Ran D, Zheng J, Zhou H (2011) Artesunate enhances the antibacterial effect of β -lactam antibiotics against *Escherichia coli* by increasing antibiotic accumulation via inhibition of the multidrug efflux pump system AcrAB-TolC. *J Antimicrob Chemother* 66:769–777. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr017>
131. Chetri S, Bhowmik D, Paul D, Pandey P, Chanda DD, Chakravarty A, Bora D, Bhattacharjee A (2019) AcrAB-TolC efflux pump system plays a role in carbapenem non-susceptibility in *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* 19:210. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1589-1>
132. Bohnert JA, Schuster S, Kern WV, Karcz T, Olejarz A, Kaczor A, Handzlik J, Kieć-Kononowicz K (2016) Novel Piperazine Arylideneimidazolones Inhibit the AcrAB-TolC Pump in *Escherichia coli* and Simultaneously Act as Fluorescent Membrane Probes in a Combined Real-Time Influx and Efflux Assay. *Antimicrob Agents Chemother* 60:1974–1983. <https://doi.org/10.1128/AAC.01995-15>
133. Cohen SP, McMurry LM, Levy SB (1988) marA locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170:5416–5422. <https://doi.org/10.1128/jb.170.12.5416-5422.1988>
134. Delcour AH (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* 1794:808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
135. Alekshun MN, Levy SB (1997) Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2067–2075. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.10.2067>
136. Simonet V, Malléa M, Pagès JM (2000) Substitutions in the eyelet region disrupt cefepime diffusion through the *Escherichia coli* OmpF channel. *Antimicrob Agents Chemother* 44:311–315. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.2.311-315.2000>
137. Miller PF, Gambino LF, Sulavik MC, Gracheck SJ (1994) Genetic relationship between soxRS and mar loci in promoting multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 38:1773–1779. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.8.1773>
138. Ma D, Alberti M, Lynch C, Nikaido H, Hearst JE (1996) The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of acrAB genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol* 19:101–112. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.357881.x>
139. George AM, Hall RM, Stokes HW (1995) Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: a novel gene, ramA, confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading)* 141 (Pt 8):1909–1920. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-8-1909>
140. Viveiros M, Dupont M, Rodrigues L, Couto I, Davin-Regli A, Martins M, Pagès J-M, Amaral L (2007) Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. *PLoS One* 2:e365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000365>
141. Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard A-S, Garin B, Le Hello S, Arlet G, Nicolas-Chanoine M-H, Decré D, Brisse S (2014) Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis* 20:1812–1820. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140206>
142. Paterson GK, Larsen AR, Robb A, Edwards GE, Pennycott TW, Foster G, Mot D, Hermans K, Baert K, Peacock SJ, Parkhill J, Zadoks RN, Holmes MA (2012) The newly described mecA homologue, mecALGA251, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *J Antimicrob Chemother* 67:2809–2813. <https://doi.org/10.1093/jac/dks329>
143. Hartman BJ, Tomasz A (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 158:513–516. <https://doi.org/10.1128/jb.158.2.513-516.1984>
144. Ubukata K, Nonoguchi R, Matsuhashi M, Konno M (1989) Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the mecA gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J Bacteriol* 171:2882–2885. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2882-2885.1989>

145. Fuda C, Suvorov M, Vakulenko SB, Mobashery S (2004) The Basis for Resistance to β -Lactam Antibiotics by Penicillin-binding Protein 2a of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry* 279:40802–40806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403589200>
146. Lim D, Strynadka NCJ (2002) Structural basis for the beta lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Nat Struct Biol* 9:870–876. <https://doi.org/10.1038/nsb858>
147. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA (2011) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases* 11:595–603. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70126-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70126-8)
148. Lange F, Pfennigwerth N, Höfken L-M, Gatermann SG, Kaase M (2019) Characterization of mutations in Escherichia coli PBP2 leading to increased carbapenem MICs. *J Antimicrob Chemother* 74:571–576. <https://doi.org/10.1093/jac/dky476>
149. Ranjitkar S, Reck F, Ke X, Zhu Q, McEnroe G, Lopez SL, Dean CR (2019) Identification of Mutations in the mrdA Gene Encoding PBP2 That Reduce Carbapenem and Diazabicyclooctane Susceptibility of Escherichia coli Clinical Isolates with Mutations inftsI (PBP3) and Which Carry bla NDM-1. *mSphere* 4:e00074-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00074-19>
150. Misawa K, Tarumoto N, Tamura S, Osa M, Hamamoto T, Yuki A, Kouzaki Y, Imai K, Ronald RL, Yamaguchi T, Murakami T, Maesaki S, Suzuki Y, Kawana A, Maeda T (2018) Single nucleotide polymorphisms in genes encoding penicillin-binding proteins in β -lactamase-negative ampicillin-resistant Haemophilus influenzae in Japan. *BMC Res Notes* 11:53. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3169-0>
151. Bellini D, Koekemoer L, Newman H, Dowson CG (2019) Novel and Improved Crystal Structures of H. influenzae, E. coli and P. aeruginosa Penicillin-Binding Protein 3 (PBP3) and N. gonorrhoeae PBP2: Toward a Better Understanding of β -Lactam Target-Mediated Resistance. *Journal of Molecular Biology* 431:3501–3519. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.07.010>
152. Alm RA, Johnstone MR, Lahiri SD (2015) Characterization of Escherichia coli NDM isolates with decreased susceptibility to aztreonam/avibactam: role of a novel insertion in PBP3. *J Antimicrob Chemother* 70:1420–1428. <https://doi.org/10.1093/jac/dku568>
153. Correia S, Poeta P, Hébraud M, Capelo JL, Igrejas G (2017) Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *Journal of Medical Microbiology* 66:551–559. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000475>
154. Qin T-T, Kang H-Q, Ma P, Li P-P, Huang L-Y, Gu B (2015) SOS response and its regulation on the fluoroquinolone resistance. *Ann Transl Med* 3:358. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.12.09>
155. Kristiansson E, Fick J, Janzon A, Grabic R, Rutgersson C, Weijdegård B, Söderström H, Larsson DGJ (2011) Pyrosequencing of Antibiotic-Contaminated River Sediments Reveals High Levels of Resistance and Gene Transfer Elements. *PLOS ONE* 6:e17038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017038>
156. Nordmann P, Poirel L (2005) Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 56:463–469. <https://doi.org/10.1093/jac/dki245>
157. Piddock LJV (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 19:382–402. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>
158. Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E, Courvalin P (2007) Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin Microbiol Rev* 20:79–114. <https://doi.org/10.1128/CMR.00015-06>
159. Azimi A, Rezaei F, Yaseri M, Jafari S, Rahbar M, Douraghi M (2021) Emergence of fluoroquinolone resistance and possible mechanisms in clinical isolates of Stenotrophomonas maltophilia from Iran. *Sci Rep* 11:9582. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88977-z>
160. Neuhauser MM, Weinstein RA, Rydman R, Danziger LH, Karam G, Quinn JP (2003) Antibiotic Resistance among Gram-Negative Bacilli in US Intensive Care Units: Implications for Fluoroquinolone Use. *JAMA* 289:885–888. <https://doi.org/10.1001/jama.289.7.885>
161. Fick J, Söderström H, Lindberg RH, Phan C, Tysklind M, Larsson DGJ (2009) Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ Toxicol Chem* 28:2522–2527. <https://doi.org/10.1897/09-073.1>
162. Ruiz J (2003) Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51:1109–1117. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg222>
163. Dobbyn D, Zeggil T, Kudrowich B, Beahm NP (2022) Ciprofloxacin resistances rates in Escherichia coli across Canada (CREAC): a longitudinal analysis 2015–2019. *International Journal of Antimicrobial Agents* 59:. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106532>
164. Jones-Dias D, Manageiro V, Graça R, Sampaio DA, Albuquerque T, Themudo P, Vieira L, Ferreira E, Clemente L, Caniça M (2016) QnrS1- and Aac(6′)-Ib-cr-Producing Escherichia coli among Isolates from Animals of Different Sources: Susceptibility and Genomic Characterization. *Front Microbiol* 7:671. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00671>

165. Alsharapy SA, Yanat B, Lopez-Cerero L, Nasher SS, Díaz-De-Alba P, Pascual Á, Rodríguez-Martínez J-M, Touati A (2018) Prevalence of ST131 Clone Producing Both ESBL CTX-M-15 and AAC(6')Ib-cr Among Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Yemen. *Microb Drug Resist* 24:1537–1542. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0024>
166. Machuca J, Ortiz M, Recacha E, Díaz-De-Alba P, Docobo-Perez F, Rodríguez-Martínez J-M, Pascual Á (2016) Impact of AAC(6')-Ib-cr in combination with chromosomal-mediated mechanisms on clinical quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 71:3066–3071. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw258>
167. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC (2006) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12:83–88. <https://doi.org/10.1038/nm1347>
168. Yang S, Clayton SR, Zechiedrich EL (2003) Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 51:545–556. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg126>
169. Klein G, Raina S (2015) Regulated Control of the Assembly and Diversity of LPS by Noncoding sRNAs. *BioMed Research International* 2015:e153561. <https://doi.org/10.1155/2015/153561>
170. Umeda K, Hase A, Fukuda A, Matsuo M, Horimoto T, Ogasawara J (2020) Prevalence and mechanisms of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* among sheltered companion animals. *Access Microbiol* 2:acmi000077. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000077>
171. Reece RJ, Maxwell A (1991) DNA gyrase: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26:335–375. <https://doi.org/10.3109/10409239109114072>
172. Zhao Q, Shen Y, Chen G, Luo Y, Cui S, Tian Y (2021) Prevalence and Molecular Characterization of Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* in Healthy Children. *Front Cell Infect Microbiol* 11:743390. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.743390>
173. Cheng P, Yang Y, Li F, Li X, Liu H, Fazilani SA, Guo W, Xu G, Zhang X (2020) The prevalence and mechanism of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from swine farms in China. *BMC Vet Res* 16:258. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02483-4>
174. Nawaz M, Sung K, Kweon O, Khan S, Nawaz S, Steele R (2015) Characterisation of novel mutations involved in quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from imported shrimp. *Int J Antimicrob Agents* 45:471–476. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.11.010>
175. Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S (1990) Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 34:1271–1272. <https://doi.org/10.1128/AAC.34.6.1271>
176. Heisig P, Schedletzky H, Falkenstein-Paul H (1993) Mutations in the *gyrA* gene of a highly fluoroquinolone-resistant clinical isolate of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 37:696–701. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.4.696>
177. Vila J, Ruiz J, Marco F, Barcelo A, Goñi P, Giralt E, Jimenez de Anta T (1994) Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and MICs. *Antimicrob Agents Chemother* 38:2477–2479. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.10.2477>
178. Kim J-H, Lee H-J, Jeong O-M, Kim D-W, Jeong J-Y, Kwon Y-K, Kang M-S (2021) High prevalence and variable fitness of fluoroquinolone-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from chickens in Korea. *Avian Pathol* 50:151–160. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1855322>
179. Oram M, Fisher LM (1991) 4-Quinolone resistance mutations in the DNA gyrase of *Escherichia coli* clinical isolates identified by using the polymerase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother* 35:387–389. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.2.387>
180. Drlica K, Zhao X (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:377–392. <https://doi.org/10.1128/mmbr.61.3.377-392.1997>
181. Cullen ME, Wyke AW, Kuroda R, Fisher LM (1989) Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 33:886–894. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.6.886>
182. Dasgupta N, Paul D, Chanda DD, Chetri S, Chakravarty A, Bhattacharjee A (2018) Observation of a new pattern of mutations in *gyrA* and *parC* within *Escherichia coli* exhibiting fluoroquinolone resistance. *Indian J Med Microbiol* 36:131–135. https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_17_181
183. Gulyás D, Kocsis B, Szabó D (2019) Plasmid copy number and *qnr* gene expression in selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. *Acta Microbiol Immunol Hung* 66:169–178. <https://doi.org/10.1556/030.65.2018.049>
184. Vila J (2005) Fluoroquinolone Resistance. In: *Frontiers in Antimicrobial Resistance*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 41–52
185. Tran JH, Jacoby GA (2002) Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5638–5642. <https://doi.org/10.1073/pnas.082092899>

186. Juraschek K, Deneke C, Schmogger S, Grobber M, Malorny B, Käsbohrer A, Schwarz S, Meemken D, Hammerl JA (2021) Phenotypic and Genotypic Properties of Fluoroquinolone-Resistant, qnr-Carrying *Escherichia coli* Isolated from the German Food Chain in 2017. *Microorganisms* 9:1308. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061308>
187. Mirzaii M, Jamshidi S, Zamanzadeh M, Marashifard M, Malek Hosseini SAA, Haeili M, Jahanbin F, Mansouri F, Darban-Sarokhalil D, Khoramrooz SS (2018) Determination of *gyrA* and *parC* mutations and prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with urinary tract infection in Iran. *J Glob Antimicrob Resist* 13:197–200. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.04.017>
188. Holloway WJ, Scott EG (1963) Colistimethate Sodium: A Clinical Study. *The Journal of Urology* 89:264–266. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)64542-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)64542-7)
189. Dijkmans AC, Wilms EB, Kamerling IMC, Birkhoff W, Ortiz-Zacarias NV, van Nieuwkoop C, Verbrugh HA, Touw DJ (2015) Colistin: Revival of an Old Polymyxin Antibiotic. *Ther Drug Monit* 37:419–427. <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000172>
190. Wanty C, Anandan A, Piek S, Walshe J, Ganguly J, Carlson RW, Stubbs KA, Kahler CM, Vrielink A (2013) The structure of the neisserial lipooligosaccharide phosphoethanolamine transferase A (LptA) required for resistance to polymyxin. *J Mol Biol* 425:3389–3402. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.06.029>
191. Kaye KS, Pogue JM, Tran TB, Nation RL, Li J (2016) Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. *Infect Dis Clin North Am* 30:391–414. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.005>
192. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J (2013) Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics. *Future Microbiol* 8:711–724. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.39>
193. 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>
194. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK (2010) Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat* 13:132–138. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.05.002>
195. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG, Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America (2006) Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 42:657–668. <https://doi.org/10.1086/499819>
196. Kempf I, Jouy E, Chauvin C (2016) Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int J Antimicrob Agents* 48:598–606. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016>
197. Falagas ME, Kasiakou SK (2005) Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 40:1333–1341. <https://doi.org/10.1086/429323>
198. Carroll LM, Gaballa A, Guldimann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M (2019) Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio* 10:e00853-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19>
199. Osei Sekyere J (2019) *Mcr* colistin resistance gene: a systematic review of current diagnostics and detection methods. *MicrobiologyOpen* 8:e00682. <https://doi.org/10.1002/mbo3.682>
200. McPhee JB, Lewenza S, Hancock REW (2003) Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, *PmrA-PmrB*, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 50:205–217. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03673.x>
201. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu L-F, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu J-H, Shen J (2016) Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 16:161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
202. Hussein NH, AL-Kadmy IMS, Taha BM, Hussein JD (2021) Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Mol Biol Rep* 48:2897–2907. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06307-y>
203. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S (2016) Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill* 21:. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280>
204. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y (2017) Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *mBio* 8:e00543-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00543-17>
205. Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, Pezzotti G, Magistrali CF (2017) Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill* 22:30589. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>
206. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B (2017) Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-

- tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother* 72:3317–3324. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>
207. AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, Randall LP, Lemma F, Crook DW, Teale C, Smith RP, Anjum MF (2017) *mcr-1* and *mcr-2* (*mcr-6.1*) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72:2745–2749. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx286>
 208. Yang Y-Q, Li Y-X, Lei C-W, Zhang A-Y, Wang H-N (2018) Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 73:1791–1795. <https://doi.org/10.1093/jac/dky111>
 209. Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, Zhang S, Shen J, Shen Z, Wang Y (2018) Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect* 7:122. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z>
 210. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z (2020) Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerg Microbes Infect* 9:508–516. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1732231>
 211. Lima T, Domingues S, Da Silva GJ (2019) Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Salmonella enterica*: A Review. *Microorganisms* 7:55. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020055>
 212. Sun J, Zhang H, Liu Y-H, Feng Y (2018) Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends in Microbiology* 26:794–808. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.006>
 213. Poirel L, Jayol A, Nordmann P (2017) Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews* 30:557–596. <https://doi.org/10.1128/cmr.00064-16>
 214. El Ghachi M, Derbise A, Bouhss A, Mengin-Lecreux D (2005) Identification of multiple genes encoding membrane proteins with undecaprenyl pyrophosphate phosphatase (UppP) activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280:18689–18695. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412277200>
 215. Tatar LD, Marolda CL, Polischuk AN, van Leeuwen D, Valvano MA (2007) An *Escherichia coli* undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase implicated in undecaprenyl phosphate recycling. *Microbiology (Reading)* 153:2518–2529. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/006312-0>
 216. Grabowicz M, Andres D, Lebar MD, Malođić G, Kahne D, Silhavy TJ (2014) A mutant *Escherichia coli* that attaches peptidoglycan to lipopolysaccharide and displays cell wall on its surface. *Elife* 3:e05334. <https://doi.org/10.7554/eLife.05334>
 217. Han W, Wu B, Li L, Zhao G, Woodward R, Pettit N, Cai L, Thon V, Wang PG (2012) Defining function of lipopolysaccharide O-antigen ligase WaaL using chemoenzymatically synthesized substrates. *J Biol Chem* 287:5357–5365. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.308486>
 218. Ruan X, Loyola DE, Marolda CL, Perez-Donoso JM, Valvano MA (2012) The WaaL O-antigen lipopolysaccharide ligase has features in common with metal ion-independent inverting glycosyltransferases. *Glycobiology* 22:288–299. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr150>
 219. 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>
 220. Lee H, Hsu F-F, Turk J, Groisman EA (2004) The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 186:4124–4133. <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4124-4133.2004>
 221. Sun J, Xu Y, Gao R, Lin J, Wei W, Srinivas S, Li D, Yang R-S, Li X-P, Liao X-P, Liu Y-H, Feng Y (2017) Deciphering MCR-2 Colistin Resistance. *mBio* 8:e00625-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00625-17>
 222. Hui C-Y, Guo Y, He Q-S, Peng L, Wu S-C, Cao H, Huang S-H (2010) *Escherichia coli* outer membrane protease OmpT confers resistance to urinary cationic peptides. *Microbiol Immunol* 54:452–459. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00238.x>
 223. Mišić D, Kiskaroly F, Szostak MP, Cabal A, Ruppitsch W, Bernreiter-Hofer T, Milovanovic V, Feßler AT, Allerberger F, Sperser J, Müller E, Schwarz S, Braun SD, Monecke S, Ehrlich R, Korus M, Benković D, Korzeniowska M, Lončarić I (2021) The First Report of *mcr-1*-Carrying *Escherichia coli* Originating from Animals in Serbia. *Antibiotics (Basel)* 10:1063. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091063>
 224. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M (2014) Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol* 5:643. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
 225. Trimble MJ, Mlynářčik P, Kolář M, Hancock REW (2016) Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6:a025288. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025288>
 226. 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>
 227. Srinivas P, Rivard K (2017) Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. *Curr Infect Dis Rep* 19:38. <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0596-3>

228. Antonic V, Stojadinovic A, Zhang B, Izadjoo MJ, Alavi M (2013) *Pseudomonas aeruginosa* induces pigment production and enhances virulence in a white phenotypic variant of *Staphylococcus aureus*. *Infect Drug Resist* 6:175–186. <https://doi.org/10.2147/IDR.S49039>
229. Mlynarcik P, Kolar M (2019) Molecular mechanisms of polymyxin resistance and detection of *mcr* genes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 163:28–38. <https://doi.org/10.5507/bp.2018.070>
230. Abachin E, Poyart C, Pellegrini E, Milohanic E, Fiedler F, Berche P, Trieu-Cuot P (2002) Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 43:1–14. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02723.x>
231. Gehring R, Mochel JP, Schmerold I (2023) Understanding the background and clinical significance of the WHO, WOA, and EMA classifications of antimicrobials to mitigate antimicrobial resistance. *Frontiers in Veterinary Science* 10:
232. Schmerold I, van Geijlswijk I, Gehring R (2023) European regulations on the use of antibiotics in veterinary medicine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 189:106473. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106473>
233. Hao H, Sander P, Iqbal Z, Wang Y, Cheng G, Yuan Z (2016) The Risk of Some Veterinary Antimicrobial Agents on Public Health Associated with Antimicrobial Resistance and their Molecular Basis. *Front Microbiol* 7:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01626>
234. Antimicrobial Resistance – Veterinary and Public Health Concerns in Europe. <https://www.thepoultrysite.com/articles/antimicrobial-resistance-veterinary-and-public-health-concerns-in-europe>. Accessed 12 May 2024
235. Hornish RE, Kotarski SF (2002) Cephalosporins in veterinary medicine - ceftiofur use in food animals. *Curr Top Med Chem* 2:717–731. <https://doi.org/10.2174/1568026023393679>
236. Rusu A, Hancu G, Uivarosi V (2015) Fluoroquinolone pollution of food, water and soil, and bacterial resistance. *Environ Chem Lett* 13:21–36. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0481-3>
237. Andreu V, Blasco C, Picó Y (2007) Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26:534–556. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.010>
238. Sukul P, Spiteller M (2007) Fluoroquinolone Antibiotics in the Environment. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, NY, pp 131–162
239. Frade VMF, Dias M, Teixeira ACSC, Palma MSA (2014) Environmental contamination by fluoroquinolones. *Braz J Pharm Sci* 50:41–54. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100004>
240. 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>
241. 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>
242. 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>
243. 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>
244. Ebert D (1998) Experimental Evolution of Parasites. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.282.5393.1432>
245. 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>
246. 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>
247. 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>
248. 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>
249. 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>
250. 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)
251. 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>

252. Bryson V, Szybalski W (1952) Microbial Selection. *Science* 116:45–51. <https://doi.org/10.1126/science.116.3003.45>
253. 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>
254. 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>
255. 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>
256. 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>
257. 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>
258. 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>
259. Liu B, Pop M (2009) ARDB—Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res* 37:D443–D447. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn656>
260. Cantón R, Ruiz-Garbajosa P (2011) Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current Opinion in Pharmacology* 11:477–485. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.07.007>
261. Scott J, Marusyk A (2017) Somatic clonal evolution: A selection-centric perspective. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1867:139–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.01.006>
262. Phillips PC (2008) Epistasis—the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat Rev Genet* 9:855–867. <https://doi.org/10.1038/nrg2452>
263. Weinreich DM, Delaney NF, Depristo MA, Hartl DL (2006) Darwinian evolution can follow only very few mutational paths to fitter proteins. *Science* 312:111–114. <https://doi.org/10.1126/science.1123539>
264. Poelwijk FJ, Kiviet DJ, Weinreich DM, Tans SJ (2007) Empirical fitness landscapes reveal accessible evolutionary paths. *Nature* 445:383–386. <https://doi.org/10.1038/nature05451>
265. Tan L, Serene S, Chao HX, Gore J (2011) Hidden randomness between fitness landscapes limits reverse evolution. *Phys Rev Lett* 106:198102. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.106.198102>
266. Imamovic L, Sommer MOA (2013) Use of collateral sensitivity networks to design drug cycling protocols that avoid resistance development. *Sci Transl Med* 5:204ra132. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006609>
267. Kim S, Lieberman TD, Kishony R (2014) Alternating antibiotic treatments constrain evolutionary paths to multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:14494–14499. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409800111>
268. Nichol D, Jeavons P, Fletcher AG, Bonomo RA, Maini PK, Paul JL, Gatenby RA, Anderson ARA, Scott JG (2015) Steering Evolution with Sequential Therapy to Prevent the Emergence of Bacterial Antibiotic Resistance. *PLoS Comput Biol* 11:e1004493. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004493>
269. Toprak E, Veres A, Michel J-B, Chait R, Hartl DL, Kishony R (2011) Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat Genet* 44:101–105. <https://doi.org/10.1038/ng.1034>
270. Rodriguez de Evgrafov M, Gumpert H, Munck C, Thomsen TT, Sommer MOA (2015) Collateral Resistance and Sensitivity Modulate Evolution of High-Level Resistance to Drug Combination Treatment in *Staphylococcus aureus*. *Mol Biol Evol* 32:1175–1185. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv006>
271. Nichol D, Rutter J, Bryant C, Hujer AM, Lek S, Adams MD, Jeavons P, Anderson ARA, Bonomo RA, Scott JG (2019) Antibiotic collateral sensitivity is contingent on the repeatability of evolution. *Nat Commun* 10:334. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08098-6>
272. 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>
273. Kerek Á, Török B, Jerzsele Á (2022) MEGA-plate - New evolutionary and coselection microbiological method. *Hungarian Veterinary Journal* 144:429–439
274. Andersson DI (2006) The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr Opin Microbiol* 9:461–465. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.07.002>
275. Sørensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N, Wuertz S (2005) Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat Rev Microbiol* 3:700–710. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1232>
276. Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA (2001) Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl Environ Microbiol* 67:561–568. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.561-568.2001>

277. Couce A, Blázquez J (2009) Side effects of antibiotics on genetic variability. *FEMS Microbiol Rev* 33:531–538. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00165.x>
278. Guérin E, Cambray G, Da Re S, Mazel D, Ploy M-C (2010) [The SOS response controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons]. *Med Sci (Paris)* 26:28–30. <https://doi.org/10.1051/medsci/201026128>
279. Davies J, Spiegelman GB, Yim G (2006) The world of subinhibitory antibiotic concentrations. *Curr Opin Microbiol* 9:445–453. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.006>
280. Stokes HW, Hall RM (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 3:1669–1683. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00153.x>
281. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW (2007) Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol* 15:301–309. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.05.004>
282. Recchia GD, Hall RM (1995) Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology (Reading)* 141 (Pt 12):3015–3027. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-12-3015>
283. McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* 40:349–379. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>
284. Labrie SJ, Mosterd C, Loignon S, Dupuis M-È, Desjardins P, Rousseau GM, Tremblay DM, Romero DA, Horvath P, Fremaux C, Moineau S (2019) A mutation in the methionine aminopeptidase gene provides phage resistance in *Streptococcus thermophilus*. *Sci Rep* 9:13816. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49975-4>
285. Zhang W, Guo H, Cao C, Li L, Kwok L-Y, Zhang H, Sun Z (2017) Adaptation of *Lactobacillus casei* Zhang to Gentamycin Involves an Alkaline Shock Protein. *Front Microbiol* 8:2316. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02316>
286. Zhang W, Cao C, Zhang J, Kwok L-Y, Zhang H, Chen Y (2018) *Lactobacillus casei* asp23 gene contributes to gentamycin resistance via regulating specific membrane-associated proteins. *J Dairy Sci* 101:1915–1920. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13961>
287. Dong Y, Zhang F, Wang B, Gao J, Zhang J, Shao Y (2019) Laboratory Evolution Assays and Whole-Genome Sequencing for the Development and Safety Evaluation of *Lactobacillus plantarum* With Stable Resistance to Gentamicin. *Front Microbiol* 10:1235. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01235>
288. Van Rossum T, Ferretti P, Maistrenko OM, Bork P (2020) Diversity within species: interpreting strains in microbiomes. *Nat Rev Microbiol* 18:491–506. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0368-1>
289. Haudiquet M, de Sousa JM, Touchon M, Rocha EPC (2022) Selfish, promiscuous and sometimes useful: how mobile genetic elements drive horizontal gene transfer in microbial populations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 377:20210234. <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0234>
290. Arevalo P, VanInsberghe D, Elsherbini J, Gore J, Polz MF (2019) A Reverse Ecology Approach Based on a Biological Definition of Microbial Populations. *Cell* 178:820–834.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.033>
291. Liu M, Siezen RJ, Nauta A (2009) In silico prediction of horizontal gene transfer events in *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* reveals proto-cooperation in yogurt manufacturing. *Appl Environ Microbiol* 75:4120–4129. <https://doi.org/10.1128/AEM.02898-08>
292. Li W, Wu Q, Kwok L, Zhang H, Gan R, Sun Z (2024) Population and functional genomics of lactic acid bacteria, an important group of food microorganism: Current knowledge, challenges, and perspectives. *Food Frontiers* 5:3–23. <https://doi.org/10.1002/fft2.321>
293. Clinical and Laboratory Standards Institute (2018) CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11. th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
294. 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>
295. Mihály Z, Györfy B (2011) Következő generációs szekvenálási technológiák kifejlődése és alkalmazásai = Next generation sequencing technologies (NGST) development and applications. *Orvosi Hetilap* 152:55–62
296. 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
297. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J (2018) fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* 34:i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
298. Benoit G, Lavenier D, Lemaitre C, Rizk G (2014) Bloocoo, a memory efficient read corrector
299. Krueger F (2022) Trim Galore
300. 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

301. Vasilinetc I, Prijbelski AD, Gurevich A, Korobeynikov A, Pevzner PA (2015) Assembling short reads from jumping libraries with large insert sizes. *Bioinformatics* 31:3262–3268. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv337>
302. Vicedomini R, Vezzi F, Scalabrin S, Arvestad L, Policriti A (2013) GAM-NGS: genomic assemblies merger for next generation sequencing. *BMC Bioinformatics* 14 Suppl 7:S6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-S7-S6>
303. 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>
304. Manni M, Berkeley MR, Seppey M, Simao FA, Zdobnov EM (2021) BUSCO update: novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes
305. Vurture GW, Sedlazeck FJ, Nattestad M, Underwood CJ, Fang H, Gurtowski J, Schatz MC (2017) GenomeScope: fast reference-free genome profiling from short reads. *Bioinformatics* 33:2202–2204. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx153>
306. 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>
307. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, Prasad AB, Slotta DJ, Tolstoy I, Tyson GH, Zhao S, Hsu C-H, McDermott PF, Tadesse DA, Morales C, Simmons M, Tillman G, Wasilenko J, Folster JP, Klimke W (2019) Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e00483-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00483-19>
308. 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>
309. 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>
310. 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>
311. 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>
312. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW (2015) CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res* 25:1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
313. Wood DE, Salzberg SL (2014) Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology* 15:R46. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46>
314. 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>
315. 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>
316. 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>
317. Bessonov K, Laing C, Robertson J, Yong I, Ziebell K, Gannon VPJ, Nichani A, Arya G, Nash JHE, Christianson S (2021) ECTyper: in silico *Escherichia coli* serotype and species prediction from raw and assembled whole-genome sequence data. *Microb Genom* 7:000728. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000728>
318. 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>
319. Clausen PTLC, 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>

320. Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S (2018) High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nat Commun* 9:5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
321. *Escherichia coli* genome assembly ASM2099549v1. In: NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/assembly/GCF_020995495.1/. Accessed 13 Nov 2023
322. Rodriguez-R LM, Konstantinidis KT (2016) The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. *PeerJ Inc.*
323. El Ghachi M, Bouhss A, Blanot D, Mengin-Lecreux D (2004) The *bacA* gene of *Escherichia coli* encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *J Biol Chem* 279:30106–30113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401701200>
324. Hirakawa H, Takita A, Sato Y, Hiramoto S, Hashimoto Y, Ohshima N, Minamishima YA, Murakami M, Tomita H (2023) Inactivation of *ackA* and *pta* Genes Reduces GltT Expression and Susceptibility to Fosfomycin in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 11:e0506922. <https://doi.org/10.1128/spectrum.05069-22>
325. Zhang S, Shao Y, Zhao X, Li C, Guo M, Lv Z, Zhang W (2020) Indole contributes to tetracycline resistance via the outer membrane protein *OmpN* in *Vibrio splendidus*. *World J Microbiol Biotechnol* 36:36. <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02813-6>
326. Jacoby GA (2009) AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22:161–182, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
327. Randall LP, Woodward MJ (2002) The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res Vet Sci* 72:87–93. <https://doi.org/10.1053/rvsc.2001.0537>
328. Alekshun MN, Levy SB (1997) Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2067–2075. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.10.2067>
329. Pradel E, Pagès J-M (2002) The *AcrAB-TolC* efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2640–2643. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2640-2643.2002>
330. Pos KM (2009) Drug transport mechanism of the *AcrB* efflux pump. *Biochim Biophys Acta* 1794:782–793. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.12.015>
331. Eicher T, Brandstätter L, Pos KM (2009) Structural and functional aspects of the multidrug efflux pump *AcrB*. *Biol Chem* 390:693–699. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.090>
332. Ikehata Y, Doukyu N (2022) Improving the organic solvent tolerance of *Escherichia coli* with vanillin, and the involvement of an *AcrAB-TolC* efflux pump in vanillin tolerance. *J Biosci Bioeng* 133:347–352. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.12.015>
333. Mirbagheri VS, Alishahi A, Ahmadian G, Petroudi SHH, Ojagh SM, Romanazzi G (2023) Recent findings in molecular reactions of *E. coli* as exposed to alkylated, nano- and ordinary chitosans. *Int J Biol Macromol* 253:127006. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127006>
334. Sun F, Sun Y, Wang Y, Yuan Q, Xiong L, Feng W, Xia P (2022) Role of Penicillin-Binding Protein 1b in the Biofilm Inhibitory Efficacy of Ceftazidime Against *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 79:271. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02966-7>
335. Sulavik MC, Houseweart C, Cramer C, Jiwani N, Murgolo N, Greene J, DiDomenico B, Shaw KJ, Miller GH, Hare R, Shimer G (2001) Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1126–1136. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1126-1136.2001>
336. Dinh T, Paulsen IT, Saier MH (1994) A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 176:3825–3831. <https://doi.org/10.1128/jb.176.13.3825-3831.1994>
337. Shimada T, Yamamoto K, Ishihama A (2009) Involvement of the leucine response transcription factor *LeuO* in regulation of the genes for sulfa drug efflux. *J Bacteriol* 191:4562–4571. <https://doi.org/10.1128/JB.00108-09>
338. Törnroth-Horsefield S, Gourdon P, Horsefield R, Brive L, Yamamoto N, Mori H, Snijder A, Neutze R (2007) Crystal structure of *AcrB* in complex with a single transmembrane subunit reveals another twist. *Structure* 15:1663–1673. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.09.023>
339. Das D, Xu QS, Lee JY, Ankoudinova I, Huang C, Lou Y, DeGiovanni A, Kim R, Kim S-H (2007) Crystal structure of the multidrug efflux transporter *AcrB* at 3.1 Å resolution reveals the N-terminal region with conserved amino acids. *J Struct Biol* 158:494–502. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.12.004>
340. White DG, Goldman JD, Demple B, Levy SB (1997) Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:6122–6126. <https://doi.org/10.1128/jb.179.19.6122-6126.1997>
341. Zhang Y, Wang X, Wang S, Sun S, Li H, Chen H, Wang Q, Wang H (2021) Emergence of Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Under the Pressure of Tigecycline. *Front Microbiol* 12:756580. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.756580>

342. Fernández L, Hancock REW (2012) Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 25:661–681. <https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12>
343. Holdsworth SR, Law CJ (2013) The major facilitator superfamily transporter MdtM contributes to the intrinsic resistance of *Escherichia coli* to quaternary ammonium compounds. *J Antimicrob Chemother* 68:831–839. <https://doi.org/10.1093/jac/dks491>
344. Malone JG, Jaeger T, Spangler C, Ritz D, Spang A, Arrieumerlou C, Kaever V, Landmann R, Jenal U (2010) YfiBNR mediates cyclic di-GMP dependent small colony variant formation and persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 6:e1000804. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000804>
345. Nishino K, Yamaguchi A (2002) EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the yhiUV multidrug transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184:2319–2323. <https://doi.org/10.1128/JB.184.8.2319-2323.2002>
346. Myllykallio H, Leduc D, Filee J, Liebl U (2003) Life without dihydrofolate reductase FoaA. *Trends Microbiol* 11:220–223. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(03\)00101-x](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(03)00101-x)
347. Vedantam G, Guay GG, Austria NE, Doktor SZ, Nichols BP (1998) Characterization of mutations contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:88–93. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.88>
348. Toprak E, Veres A, Yildiz S, Pedraza JM, Chait R, Paulsson J, Kishony R (2013) Building a morbidostat: an automated continuous-culture device for studying bacterial drug resistance under dynamically sustained drug inhibition. *Nat Protoc* 8:555–567. <https://doi.org/10.1038/nprot.nprot.2013.021>
349. 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>
350. Dhawan A, Nichol D, Kinose F, Abazeed ME, Marusyk A, Haura EB, Scott JG (2017) Collateral sensitivity networks reveal evolutionary instability and novel treatment strategies in ALK mutated non-small cell lung cancer. *Sci Rep* 7:1232. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00791-8>
351. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V (2008) Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect* 14 Suppl 1:90–103. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x>
352. Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Stürenburg E, Seifert H (2007) Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *J Clin Microbiol* 45:1167–1174. <https://doi.org/10.1128/JCM.01988-06>
353. Wang S, You C, Memon FQ, Zhang G, Sun Y, Si H (2021) BaeR participates in cephalosporins susceptibility by regulating the expression level of outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *J Biochem* 169:101–108. <https://doi.org/10.1093/jb/mvaa100>
354. Puértolas-Balint F, Warsi O, Linkevicius M, Tang P-C, Andersson DI (2020) Mutations that increase expression of the EmrAB-TolC efflux pump confer increased resistance to nitroloxline in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 75:300–308. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz434>
355. Langsrud S, Sundheim G, Holck AL (2004) Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers. *J Appl Microbiol* 96:201–208. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02140.x>
356. Chueca B, Renzoni A, Berdejo D, Pagán R, Kelley WL, García-Gonzalo D (2018) Whole-Genome Sequencing and Genetic Analysis Reveal Novel Stress Responses to Individual Constituents of Essential Oils in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 84:e02538-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02538-17>
357. Baharoglu Z, Mazel D (2014) SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev* 38:1126–1145. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>
358. Matic I (2019) Mutation Rate Heterogeneity Increases Odds of Survival in Unpredictable Environments. *Mol Cell* 75:421–425. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.029>
359. Fernández De Henestrosa AR, Ogi T, Aoyagi S, Chafin D, Hayes JJ, Ohmori H, Woodgate R (2000) Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 35:1560–1572. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01826.x>
360. Radman M, Taddei F, Matic I (2000) Evolution-driving genes. *Res Microbiol* 151:91–95. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(00\)00122-4](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(00)00122-4)
361. Yeiser B, Pepper ED, Goodman MF, Finkel SE (2002) SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:8737–8741. <https://doi.org/10.1073/pnas.092269199>
362. Phillips I, Culebras E, Moreno F, Baquero F (1987) Induction of the SOS response by new 4-quinolones. *J Antimicrob Chemother* 20:631–638. <https://doi.org/10.1093/jac/20.5.631>
363. Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN (2004) SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* 305:1629–1631. <https://doi.org/10.1126/science.1101630>

364. Lederberg J, Lederberg EM (1952) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J Bacteriol* 63:399–406. <https://doi.org/10.1128/jb.63.3.399-406.1952>
365. Caporale LH (2003) Natural selection and the emergence of a mutation phenotype: an update of the evolutionary synthesis considering mechanisms that affect genome variation. *Annu Rev Microbiol* 57:467–485. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090855>
366. Mao EF, Lane L, Lee J, Miller JH (1997) Proliferation of mutators in A cell population. *J Bacteriol* 179:417–422. <https://doi.org/10.1128/jb.179.2.417-422.1997>
367. Spratt BG, Hanage WP, Feil EJ (2001) The relative contributions of recombination and point mutation to the diversification of bacterial clones. *Curr Opin Microbiol* 4:602–606. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00257-5](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00257-5)
368. Guttman DS, Dykhuizen DE (1994) Clonal divergence in *Escherichia coli* as a result of recombination, not mutation. *Science* 266:1380–1383. <https://doi.org/10.1126/science.7973728>
369. Baquero F, Negri MC, Morosini MI, Blázquez J (1998) Antibiotic-selective environments. *Clin Infect Dis* 27 Suppl 1:S5-11. <https://doi.org/10.1086/514916>
370. Andremont A (2003) Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. *ASM News* 69:601–607
371. Ma D, Cook DN, Alberti M, Pon NG, Nikaido H, Hearst JE (1995) Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 16:45–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02390.x>
372. Alekshun MN, Levy SB (1997) Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2067–2075. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.10.2067>
373. Pourahmad Jaktaji R, Ghalamfarsa F (2021) Antibacterial activity of honeys and potential synergism of honeys with antibiotics and alkaloid extract of *Sophora alopecuroides* plant against antibiotic-resistant *Escherichia coli* mutant. *Iran J Basic Med Sci* 24:623–628. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2021.54224.12179>
374. Yaqoob M, Wang LP, Kashif J, Memon J, Umar S, Iqbal MF, Fiaz M, Lu C-P (2018) Genetic characterization of phenicol-resistant *Escherichia coli* and role of wild-type repressor/regulator gene (*acrR*) on phenicol resistance. *Folia Microbiol (Praha)* 63:443–449. <https://doi.org/10.1007/s12223-017-0579-7>
375. Maslowska KH, Makiela-Dzbenka K, Fijalkowska IJ (2019) The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environ Mol Mutagen* 60:368–384. <https://doi.org/10.1002/em.22267>
376. Blair JMA, Piddock LJV (2009) Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr Opin Microbiol* 12:512–519. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.07.003>
377. Deng W, Li C, Xie J (2013) The underlying mechanism of bacterial TetR/AcrR family transcriptional repressors. *Cell Signal* 25:1608–1613. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.04.003>
378. Babosan A, Skurnik D, Muggeo A, Pier GB, Baharoglu Z, Jové T, Ploy M-C, Griveau S, Bedioui F, Vergnolle S, Moussalih S, de Champs C, Mazel D, Guillard T (2022) A *qnr*-plasmid allows aminoglycosides to induce SOS in *Escherichia coli*. *Elife* 11:e69511. <https://doi.org/10.7554/eLife.69511>
379. Blázquez J (2003) Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis* 37:1201–1209. <https://doi.org/10.1086/378810>
380. Kaushik P, Anjay A, Kumari S, Dayal S, Kumar S (2018) Antimicrobial resistance and molecular characterisation of *E. coli* from poultry in Eastern India. *Vet Ital* 54:197–204. <https://doi.org/10.12834/VetIt.330.1382.2>
381. Mandal AK, Talukder S, Hasan MdM, Tasmim ST, Parvin MstS, Ali MdY, Islam MdT (2021) Epidemiology and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in broiler chickens, farmworkers, and farm sewage in Bangladesh. *Vet Med Sci* 8:187–199. <https://doi.org/10.1002/vms3.664>
382. Majewski M, Józefiak A, Kimsa-Furdzik M, Dziubdziela L, Hudak-Nowak M, Wilczyński J, Anusz K (2021) Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. conventionally sampled from factory-farmed chickens – clinical submissions. *Ann Agric Environ Med* 28:271–276. <https://doi.org/10.26444/aaem/120927>
383. Hassan IZ, Wandrag B, Gouws JJ, Qekwana DN, Naidoo V (2021) Antimicrobial resistance and *mcr-1* gene in *Escherichia coli* isolated from poultry samples submitted to a bacteriology laboratory in South Africa. *Vet World* 14:2662–2669. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2021.2662-2669>
384. Much P, Sun H, Lassnig H, Koeberl-Jelovcan S, Schliessnig H, Stueger HP (2019) Differences in antimicrobial resistance of commensal *Escherichia coli* isolated from caecal contents of organically and conventionally raised broilers in Austria, 2010–2014 and 2016. *Preventive Veterinary Medicine* 171:104755. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104755>
385. De Jong A, El Garch F, Hocquet D, Prenger-Berninghoff E, Dewulf J, Migura-Garcia L, Perrin-Guyomard A, Veldman KT, Janosi S, Skarzynska M, Simjee S, Moyaert H, Rose M, EASSA Study Group (2022) European-wide antimicrobial resistance monitoring in commensal *Escherichia coli* isolated from healthy

- food animals between 2004 and 2018. *J Antimicrob Chemother* 77:3301–3311. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac318>
386. Adelowo OO, Fagade OE, Agersø Y (2014) Antibiotic resistance and resistance genes in *Escherichia coli* from poultry farms, southwest Nigeria. *J Infect Dev Ctries* 8:1103–1112. <https://doi.org/10.3855/jidc.4222>
 387. Rivera-Gomis J, Marín P, Otal J, Galecio JS, Martínez-Conesa C, Cubero MJ (2021) Resistance patterns to C and D antibiotic categories for veterinary use of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. commensal isolates from laying hen farms in Spain during 2018. *Prev Vet Med* 186:105222. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105222>
 388. Shaib H, Aoun P, Ghaddar A, Al Labadi H, Obeid Y (2023) Multidrug Resistance and Plasmid Profiles of *Escherichia coli* Isolated from Lebanese Broiler Farms. *Int J Microbiol* 2023:8811675. <https://doi.org/10.1155/2023/8811675>
 389. Moffo F, Mouiche MMM, Djomgang HK, Tombe P, Wade A, Kochivi FL, Dongmo JB, Mbah CK, Mapiefou NP, Mingoas J-PK, Awah-Ndukum J (2022) Associations between antimicrobial use and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry litter under field conditions in Cameroon. *Prev Vet Med* 204:105668. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105668>
 390. Wang M, Chen S-Y, Zhang J-X, He X-X, Xiong W-G, Sun Y-X (2018) Variations of antibiotic resistance profiles in chickens during administration of amoxicillin, chlortetracycline and florfenicol. *J Appl Microbiol*. <https://doi.org/10.1111/jam.14065>
 391. Cook A, Reid-Smith R, Irwin R, McEwen SA, Valdivieso-Garcia A, Ribble C (2009) Antimicrobial resistance in *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* isolated from retail turkey meat from southern Ontario, Canada. *J Food Prot* 72:473–481. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-72.3.473>
 392. Boulianne M, Arsenaault J, Daignault D, Archambault M, Letellier A, Dutil L (2016) Drug use and antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolates from chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. *Can J Vet Res* 80:49–59
 393. Agunos A, Gow SP, Léger DF, Carson CA, Deckert AE, Bosman AL, Loest D, Irwin RJ, Reid-Smith RJ (2019) Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance Indicators-Integration of Farm-Level Surveillance Data From Broiler Chickens and Turkeys in British Columbia, Canada. *Front Vet Sci* 6:131. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00131>
 394. Grobbel M, Hammerl JA, Alt K, Irrgang A, Kaesbohrer A, Tenhagen B-A (2022) Comparison of Antimicrobial Resistances in *Escherichia coli* from Conventionally and Organic Farmed Poultry from Germany. *Antibiotics (Basel)* 11:1282. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101282>
 395. Suwono B, Eckmanns T, Kaspar H, Merle R, Zacher B, Kollas C, Weiser AA, Noll I, Feig M, Tenhagen B-A (2021) Cluster analysis of resistance combinations in *Escherichia coli* from different human and animal populations in Germany 2014–2017. *PLoS One* 16:e0244413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244413>
 396. Nobili G, La Bella G, Basanisi MG, Damato AM, Coppola R, Migliorelli R, Rondinone V, Leekitcharoenphon P, Bortolaia V, La Salandra G (2022) Occurrence and Characterisation of Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Raw Meat in Southern Italy in 2018–2020. *Microorganisms* 10:1805. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10091805>
 397. Mesa-Varona O, Kaspar H, Grobbel M, Tenhagen B-A (2020) Phenotypical antimicrobial resistance data of clinical and non-clinical *Escherichia coli* from poultry in Germany between 2014 and 2017. *PLoS One* 15:e0243772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243772>
 398. Shrestha RD, Agunos A, Gow SP, Deckert AE, Varga C (2022) Associations between antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolates and antimicrobial use in Canadian turkey flocks. *Front Microbiol* 13:954123. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.954123>
 399. Adorján A, Makrai L, Mag T, Jánosi S, Könyves L, Tóth I (2020) High Frequency of Multidrug-Resistant (MDR) Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) in Broilers in Hungary. *Frontiers in Veterinary Science* 7:
 400. Wasyl D, Hoszowski A, Szulowski K, Zajac M (2013) Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. *Frontiers in Microbiology* 4:
 401. Yassin AK, Gong J, Kelly P, Lu G, Guardabassi L, Wei L, Han X, Qiu H, Price S, Cheng D, Wang C (2017) Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. *PLOS ONE* 12:e0185326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185326>
 402. Martínez-Álvarez S, Sanz S, Olarte C, Hidalgo-Sanz R, Carvalho I, Fernández-Fernández R, Campaña-Burguet A, Latorre-Fernández J, Zarazaga M, Torres C (2022) Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from the Broiler Farm Environment, with Detection of SHV-12-Producing Isolates. *Antibiotics* 11:444. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040444>
 403. Kaesbohrer A, Schroeter A, Tenhagen B-A, Alt K, Guerra B, Appel B (2012) Emerging Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia coli* with Public Health Relevance. *Zoonoses and Public Health* 59:158–165. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2011.01451.x>

404. Grobbel M, Hammerl JA, Alt K, Irrgang A, Kaesbohrer A, Tenhagen B-A (2022) Comparison of Antimicrobial Resistances in *Escherichia coli* from Conventionally and Organic Farmed Poultry from Germany. *Antibiotics* 11:1282. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101282>
405. Musa L, Casagrande Proietti P, Branciaro R, Menchetti L, Bellucci S, Ranucci D, Marenzoni ML, Franciosini MP (2020) Antimicrobial Susceptibility of *Escherichia coli* and ESBL-Producing *Escherichia coli* Diffusion in Conventional, Organic and Antibiotic-Free Meat Chickens at Slaughter. *Animals (Basel)* 10:1215. <https://doi.org/10.3390/ani10071215>
406. Eltai NO, Abdfarag EA, Al-Romaihi H, Wehedy E, Mahmoud MH, Alawad OK, Al-Hajri MM, Al Thani AA, Yassine HM (2018) Antibiotic Resistance Profile of Commensal *Escherichia coli* Isolated from Broiler Chickens in Qatar. *Journal of Food Protection* 81:302–307. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-191>
407. Asai T, Masani K, Sato C, Hiki M, Usui M, Baba K, Ozawa M, Harada K, Aoki H, Sawada T (2011) Phylogenetic groups and cephalosporin resistance genes of *Escherichia coli* from diseased food-producing animals in Japan. *Acta Vet Scand* 53:52. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-53-52>
408. Shrivastav A, Sharma RK, Sahni YP, Shrivastav N, Gautam V, Jain S (2016) Study of antimicrobial resistance due to extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in healthy broilers of Jabalpur. *Vet World* 9:1259–1263. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1259-1263>
409. Overdeest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey P, Heck M, Savelkoul P, Vandenbroucke-Grauls C, van der Zwaluw K, Huijsdens X, Kluytmans J (2011) Extended-Spectrum β -Lactamase Genes of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 17:1216–1222. <https://doi.org/10.3201/eid1707.110209>
410. Doi Y, Paterson DL, Egea P, Pascual A, López-Cerero L, Navarro MD, Adams-Haduch JM, Qureshi ZA, Sidjabat HE, Rodríguez-Baño J (2010) Extended-spectrum and CMY-type β -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clinical Microbiology and Infection* 16:33–38. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03001.x>
411. Lu Q, Zhang W, Luo L, Wang H, Shao H, Zhang T, Luo Q (2022) Genetic diversity and multidrug resistance of phylogenetic groups B2 and D in InPEC and ExPEC isolated from chickens in Central China. *BMC Microbiol* 22:60. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02469-2>
412. Al-Mustapha AI, Alada SA, Raufu IA, Lawal AN, Eskola K, Brouwer MS, Adetunji V, Heikinheimo A (2022) Co-occurrence of antibiotic and disinfectant resistance genes in extensively drug-resistant *Escherichia coli* isolated from broilers in Ilorin, North Central Nigeria. *J Glob Antimicrob Resist* 31:337–344. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.11.002>
413. Hess C, Troxler S, Jandreski-Cvetkovic D, Zloch A, Hess M (2022) *Escherichia coli* Isolated from Organic Laying Hens Reveal a High Level of Antimicrobial Resistance despite No Antimicrobial Treatments. *Antibiotics (Basel)* 11:467. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040467>
414. Menck-Costa MF, Baptista AAS, Gazal LE de S, Justino L, Sanches MS, de Souza M, Nishio EK, Queiroz Dos Santos B, Cruz VD, Berbert JVM, Gonçalves BC, Andrade G, Vespero EC, Nakazato G, Kobayashi RKT (2022) High-Frequency Detection of *fosA3* and *bla* CTX-M-55 Genes in *Escherichia coli* From Longitudinal Monitoring in Broiler Chicken Farms. *Front Microbiol* 13:846116. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.846116>
415. Rehman N, Azam S, Ali A, Khan I, Asghar M, Ali M, Waqas M, Ullah F, Sehra GE (2021) Molecular epidemiology of antibiotic-resistant genes and potent inhibitors against TEM, CTX-M-14, CTX-M-15, and SHV-1 proteins of *Escherichia coli* in district Peshawar, Pakistan. *Saudi J Biol Sci* 28:6568–6581. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.028>
416. Belmahdi M, Chenouf NS, Ait Belkacem A, Martinez-Alvarez S, Pino-Hurtado MS, Benkhechiba Z, Lahrech S, Hakem A, Torres C (2022) Extended Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* from Poultry and Wild Birds (Sparrow) in Djelfa (Algeria), with Frequent Detection of CTX-M-14 in Sparrow. *Antibiotics (Basel)* 11:1814. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121814>
417. Ferreira M, Leão C, Clemente L, Albuquerque T, Amaro A (2022) Antibiotic Susceptibility Profiles and Resistance Mechanisms to β -Lactams and Polymyxins of *Escherichia coli* from Broilers Raised under Intensive and Extensive Production Systems. *Microorganisms* 10:2044. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102044>
418. Ewers C, de Jong A, Prenger-Berninghoff E, El Garch F, Leidner U, Tiwari SK, Semmler T (2021) Genomic Diversity and Virulence Potential of ESBL- and AmpC- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains From Healthy Food Animals Across Europe. *Front Microbiol* 12:626774. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.626774>
419. Clemente L, Leão C, Moura L, Albuquerque T, Amaro A (2021) Prevalence and Characterization of ESBL/AmpC Producing *Escherichia coli* from Fresh Meat in Portugal. *Antibiotics (Basel)* 10:1333. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10111333>

9. A doktori kutatás eredményeinek közzélése

9.1. Lektorált, impakt faktoral bírótudományos folyóiratban

Barnácz F., Kerek Á., Csirmaz B., Román I.L., Gál C., Hajduk E., Szabó Á., Jerzsele Á., Kovács L. (2024) Antimikrobiális rezisztencia hazai nagylétszámú háziállatokban, hasznosítási irányok alapján 2022-2023 között. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA* 146:339–356.

<https://doi.org/10.56385/magyallov.2024.06.339-356>

Kerek, Á.; Szabó, Á.; Bányai, K.; Kaszab, E.; Bali, K.; Papp, M.; Kovács, L.; Jerzsele, Á. (2024). Resistome Analysis of *Escherichia coli* Isolates from Layers in Hungary. *ACTA VETERINARIA HUNGARICA*, 72, 1–10, <http://doi:10.1556/004.2024.00988>.

Kerek, Á., Török, B., Laczkó, L., Somogyi, Z., Kardos, G., Bányai, K., Kaszab, E., Bali, K., Jerzsele, Á. (2024). *In Vitro* Microevolution and Co-selection Assessment of Amoxicillin and Cefotaxime Impact on *Escherichia coli* Resistance Development. *ANTIBIOTICS*, 13 (3), 247. <http://doi:10.3390/antibiotics13030247>

Kerek, Á., Török, B., Laczkó, L., Kardos, G., Bányai, K., Somogyi, Z., Kaszab, E., Bali, K., Jerzsele, Á. (2023). *In Vitro* Microevolution and Co-Selection Assessment of Florfenicol Impact on *Escherichia coli* Resistance Development. *ANTIBIOTICS*, 12(12), 1728. <http://doi.org/10.3390/antibiotics12121728>

Kerek, Á., Csanády, P., Tuska-Szalay, B., Kovács, L., & Jerzsele, Á. (2023). *In Vitro* Efficacy of Hungarian Propolis against Bacteria, Yeast, and *Trichomonas gallinae* Isolated from Pigeons — A Possible Antibiotic Alternative? *RESOURCES (BASEL)*, 12(9), 101. <http://doi.org/10.3390/resources12090101>

Kerek, Á., Sasvári, M., Jerzsele, Á., Somogyi, Z., Janovák, L., Abonyi-Tóth, Z., & Dékány, I. (2022). Photoreactive Coating Material as an Effective and Durable Antimicrobial Composite in Reducing Bacterial Load on Surfaces in Livestock. *BIOMEDICINES*, 10(9). <http://doi.org/10.3390/biomedicines10092312>

Kerek, Á., Török, B., & Jerzsele, Á. (2022). MEGA-plate – Új evolúciós és koszelekciós mikrobiológiai vizsgálati módszer. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA*, 144(7), 429–439.

Kerek, Á., Csanády, P., & Jerzsele, Á. (2022). A propolisz baktériumellenes hatékonysága – 1. rész. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA*, 144(5), 285–298.

Kerek, Á., Sterczler, Á., Somogyi, Z., Kovács, D., & Jerzsele, Á. (2020). Investigation of the environmental presence of multidrug-resistant bacteria at small animal hospitals in Hungary. *ACTA VETERINARIA HUNGARICA*, 68(4), 387–392. <http://doi.org/10.1556/004.2020.00055>

9.2. Lektorált, impact faktoral nem bír tudományos folyóiratban

Kerek, Á., Nagy, Z., & Jerzsele, Á. (2023). Egy egészség – a 21. század problémája az antimikrobiális rezisztencia: Van kiút? *SCIENTIA ET SECURITAS*, 3(3), 234–242. <http://doi.org/10.1556/112.2022.00115>

9.3. Konferencia prezentációk

Kerek, Á., Török B., Bányai K., Jerzsele Á.: *In vitro* evolúciós és koszelekciós antimikrobiális rezisztencia vizsgálatok MEGA-plate segítségével *Escherichia coli* baktériumon: florfenikol antibiotikum hatása. In *XXVII. Tavaszi Szél Konferencia 2024 - Absztraktkötet P. Hajdú, ed.*, Budapest: Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ). (pp. 689).

Kerek, Á., Szabó K., Mag P., Jerzsele Á.: Nagylétszámú baromfiállományokból izolált *Escherichia coli* törzsek kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) termelésének felmérése Magyarországon. II. Magyar Agrártudományi Doktoranduszok Szimpóziuma, Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ), Budapest, Magyarország, 2024.

Jerzsele Á., Kerek, Á.: Antimicrobial susceptibility testing of bacterial strains isolated from poultry in Hungary. AACTING Conference, Bécs, Ausztria, 2024.

Kerek, Á., Barnácz F., Csirmaz B., Somogyi Z., Jerzsele Á.: Az antimikrobiális rezisztencia helyzetképe a nagylétszámú baromfiállományokban, kritikusan fontos antibiotikumok tükrében. 39. Óvári Tudomány Nap Konferencia, Mosonmagyaróvár, Magyarország, 2023.

Kerek, A., Roman, I., & Jerzsele, A. (2023). Metagenomic analysis of veterinary probiotics in broiler chickens. *JOURNAL OF VETERINARY PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS*, 46, 92–93. <http://doi.org/10.1111/jvp.13295>

Kerek, A., Torok, B., & Jerzsele, A. (2023). Microbial evolution and growth arena (MEGA-plate), accelerated evolution and co-selection studies with *Escherichia coli* strains for extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production. *JOURNAL OF VETERINARY PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS*, 46, 91–91. <http://doi.org/10.1111/jvp.13292>

Kerek, Á., Török B., Jerzsele Á.: Microbial Evolution and Growth Arena (MEGA-plate), gyorsított evolúciós és koszelekciós vizsgálatok *Escherichia coli* törzssel, kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) termelésre. I. Magyar Agrártudományi Doktoranduszok Szimpóziuma, Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ), Debrecen, Magyarország, 2023.

Kerek Á., Szabó K., Bányai K, Jerzsele Á.: Nagylétszámú baromfiállományokból izolált *Escherichia coli* törzsek ESBL termelésének felmérése Magyarországon. MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Magyarország, 2023.

Jerzsele Á., Kerek Á., Török B.: MEGA-plate lemezen történő, gyorsított evolúciós antimikrobiális rezisztencia-koszelekciós vizsgálat. MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Magyarország, 2022.

Kerek Á., Bárány Z., Kiss D. S., Tóth I., Jócsák G., Bartha T., Sterczer Á.: Asztroglia sejtek szerepének vizsgálata a neuroinflammáció kialakulásában, valamint a teofillin erre gyakorolt hatása. MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Magyarország, 2020.

9.4. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények

Kerek, Á.; Ecsedi, B.G.; Szabó, Á.; Szimrók, Z.; Paliczné Kustán, B.; Jerzsele, Á.; Nagy, G. (2024). Stability Studies of the Dilution Series of Different Antibiotic Stock Solutions in Culture Medium Incubated at 37 °C. *ANTIBIOTICS*, 13, 549, <https://doi:10.3390/antibiotics13060549>

Kerek, Á.; Németh, V.; Szabó, Á.; Papp, M.; Bányai, K.; Kardos, G.; Kaszab, E.; Bali, K.; Nagy, Z.; Süth, M.; Jerzsele, Á. (2024). Monitoring Changes in the Antimicrobial-Resistance Gene Set (ARG) of Raw Milk and Dairy Products in a Cattle Farm, from Production to Consumption. *VETERINARY SCIENCES*, 11, 265, <https://doi:10.3390/vetsci11060265>

Kerek, Á.; Szabó, Á.; Jerzsele, Á. (2024) Antimicrobial Susceptibility Profiles of *Pasteurella multocida* Isolates from Clinical Cases of Waterfowl in Hungary between 2022 and 2023. *VETERINARY SCIENCES*, 11, 194, doi:10.3390/vetsci11050194.

van Niekerk A.A., Maluck S., Mag P., Kővágó C., Kerek Á., Jerzsele Á., Steinmetzer T., Pászti-Gere E. (2024). Antiviral Drug Candidate Repositioning for Streptococcus suis Infection in Non-Tumorigenic Cell Models. *BIOMEDICINES*, 12:783. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12040783>

Kerek, Á., Szabó, Á., Dobra, P. F., Bárdos, K., Ózsvári, L., Fehérvári, P., Bata, Zs., Molnár-Nagy, V., Jerzsele, Á. (2023). Determining the In Vivo Efficacy of Plant-Based and Probiotic-Based Antibiotic Alternatives against Mixed Infection with *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in Domestic Chickens. *VETERINARY SCIENCES*, 10(12). <http://doi.org/10.3390/vetsci10120706>

- Somogyi, Z., Mag, P., Simon, R., Kerek, A., Makrai, L., Biksi, I., & Jerzsele, A. (2023). Susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis* Isolated from Pigs in Hungary between 2018 and 2021. *ANTIBIOTICS*, 12(8). <http://doi.org/10.3390/antibiotics12081298>
- Olasz, Á., Jerzsele, Á., Balta, L., Dobra, P. F., & Kerek, Á. (2023). A propolisz különböző kivonatainak in vivo hatékonysága brojlercsirke szalmonellózisa esetén. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA*, 145(8), 461–475. <http://doi.org/10.56385/magyallorv.2023.08.461-475>
- Kovács, L., Nagy, D., Könyves, L., Jerzsele, Á., & Kerek, Á. (2023). Gyógynövényekből kivont illóolajok antimikrobiális spektruma – állategészségügyi vonatkozások. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA*, 145(8), 497–510. <http://doi.org/10.56385/magyallorv.2023.08.497-510>
- Somogyi, Z., Mag, P., Simon, R., Kerek, Á., Szabó, P., Albert, E., Biksi, I., Jerzsele, Á. (2023). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Florfenicol in Plasma and Synovial Fluid of Pigs at a Dose of 30 mg/kgbw Following Intramuscular Administration. *ANTIBIOTICS*, 12(4). <http://doi.org/10.3390/antibiotics12040758>
- Pintér, K., Kerek, Á., & Magyar, T. (2023). A *Pasteurella multocida* törzsek antibiotikumérzékenysége, az antimikrobiális rezisztencia genetikai háttere. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA*, 145(4), 239–256. <http://doi.org/10.56385/magyallorv.2023.04.239-256>
- Tuska-Szalay, B., Sipos, G., Takács, N., Kontschán, J., Sándor, A. D., Péter, Á., Berta, K., Kerek, Á., Jerzsele, Á., Votypka, J., Hornok, S. (2022). Molecular epidemiological study of *Trichomonas gallinae* focusing on central and southeastern Europe. *FRONTIERS IN VETERINARY SCIENCE*, 9. <http://doi.org/10.3389/fvets.2022.105>
- Kerek, Á., Csanády, P., & Jerzsele, Á. (2022). A propolisz protozoa- és gombaellenes hatékonysága: 2. rész: Irodalmi összefoglaló. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA*, 144(11), 691–704.
- Somogyi, Z., Mag, P., Kovács, D., Kerek, Á., Szabó, P., Makrai, L., & Jerzsele, Á. (2022). Synovial and Systemic Pharmacokinetics of Florfenicol and PK/PD Integration against *Streptococcus suis* in Pigs. *PHARMACEUTICS*, 14(1). <http://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010109>
- Kerek, Á., Bárány, Z., Sterczler, Á., & Jócsák, G. (2020). A neuroinflammáció kórfolyamata és egyes terápiás vonatkozásai: Irodalmi összefoglaló. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA*, 142(12), 755–767.

Rempert, Á., Mátis, G., Juhász, O., Kerek, Á., & Neogrády, Z. (2018). A xilitmérgezés kialakulásának mechanizmusa kutyában. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA*, 140(2), 109–117.

9.5. TDK és diplomamunka témavezetés

Füzi Vanessza: Házityúkban engedélyezett amoxicillin tartalmú készítmény *in vivo* hatása az antibiotikum rezisztencia kialakulására. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2024.

Sebő Hunor: Hazai nagylétszámú baromfiállományokból izolált *Staphylococcus* törzsek antibiotikum-érzékenységének vizsgálata. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2024.

Cseke Lilla: Hazai nagylétszámú házityúk állományokból izolált *Clostridium perfringens* törzsek toxintermelésért felelős génei és antibiotikum-érzékenységük közötti összefüggés. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2024.

Szabó Ábel: Növényi alapú antibiotikum alternatívát tartalmazó takarmánykiegészítő *in vivo* dózis-válasz vizsgálata házityúk szalmonellózisa esetén. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2024.

Miletics Hunor: Hazai nagylétszámú baromfiállományokból izolált multirezisztens *Escherichia coli* törzsek kiterjedt spektrumú béta laktamáz (ESBL) termelésének genomikai vizsgálata. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2024.

Gál Csaba: Hazai nagylétszámú pulyka állományokból izolált *Escherichia coli* baktériumtörzsek ECOFF (*Epidemiological cut-off value*) értékének meghatározása. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2023.

Németh Virág Alexandra: Szarvasmarha állomány nyerstej és nyers tejtermékeinek antimikrobiális rezisztencia génkészlet (ARG) változásának nyomon követése a termelés helyétől a fogyasztóig. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2023.

Csiki Boglárka Bianka: *Trichomonas gallinae* nitroimidazol és protonpumpa-gátló hatóanyagokkal szembeni érzékenységének vizsgálata. TDK dolgozat. Témavezetők: Kerek Á., Mag P., Budapest, 2023.

Szabó Emese: Társállatokban használt probiotikum készítmények antimikrobiális rezisztencia génkészletének (ARG) felmérése. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2023.

Szabó Kinga: Nagylétszámú baromfiállományokból izolált *Escherichia coli* törzsek kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) termelésének felmérése Magyarországon. TDK dolgozat. Témavezetők: Kerek Á., Mag P., Budapest, 2023.

Pincés Tamara: Hazai galamb állományokból izolált *Escherichia coli* baktériumtörzsek ECOFF (*Epidemiological cut-off value*) értékének meghatározása. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2023.

Horváth Áron: Hazai nagylétszámú házityúk állományokból izolált *Enterococcus* baktériumtörzsek ECOFF (*Epidemiological cut-off value*) értékének meghatározása. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2023.

Román István László: Hazai nagylétszámú házityúk állományokból izolált *Escherichia coli* baktériumtörzsek ECOFF (*Epidemiological cut-off value*) értékének meghatározása. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2023.

Horváth Ákos: Baromfi eredetű multirezisztens *Enterococcus* baktériumtörzsek antibiotikum érzékenységi és metagenomikai vizsgálata. TDK dolgozat. Témavezetők: Kerek Á., Mag P., Budapest, 2023.

Ecsedi Bence Gergő: Különböző antibiotikum törzsoldatok hígítási sorának stabilitás vizsgálata táplevesben, 37 °C-on történő inkubálás mellett. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2023.

Szabó Ábel: Növényi alapú antibiotikum alternatívák *in vivo* hatékonyságának meghatározása házityúk szalmonellózisa esetén. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2023.

Nagy Dominika: Gyógynövénykivonatokat tartalmazó készítmény antimikrobiális hatékonyságának *in vitro* meghatározása. TDK dolgozat. Témavezetők: Kerek Á., Kovács L., Budapest, 2023.

Eszes Petra: Hazai víziszárnyasokból izolált baktériumtörzsek érzékenységi vizsgálata. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2023.

Barnácz Franciska Vera: Hazai házityúk állományokból izolált baktériumtörzsek érzékenységi vizsgálata. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2023.

Csirmaz Bence: Hazai pulyka állományokból izolált baktériumtörzsek érzékenységi vizsgálata. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2023.

Olasz Ákos: Propolisz különböző kivonatainak *in vivo* hatékonysága brojlercsirke szalmonellózisa esetén. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2022.

Kovács Beatrix Erika: Hazai galambokból izolált baktériumtörzsek érzékenységi vizsgálata. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2022.

Román István László: Állatgyógyászati probiotikumok metagenomikai vizsgálata brojlercsirkében. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2022.

Yurt Attila: Magyarországi eredetű propolisz és nitroimidazol hatóanyagok *in vitro* hatékonysága *Tritrichomonas foetus* esetén. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2022.

Török Bence: *Microbial Evolution and Growth Arena* (MEGA-plate), gyorsított evolúciós és koszelekciós vizsgálatok *Escherichia coli* törzsszel, kiterjedt spektrumú béta-laktamáz (ESBL) termelésre. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2022.

Cathal McKenna: Literature and clinical study evaluating the efficacy of electrochemotherapy using bleomycin and cisplatin against canine mast cell tumours. Szakdolgozat. Témavezetők: Kerek Á., Juhász O., Budapest, 2021.

Bencsik Luca: Aktív HOCl tartalmú fertőtlenítő antimikrobiális és biofilmellenes hatása. TDK dolgozat. Témavezetők: Kerek Á., Veres A.M., Budapest, 2021.

Rónaszéki Regina Andrea: Bakteriofág tartalmú készítmény ártalmatlansági vizsgálata broiler csirkében. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2021.

Sasvári Mátyás: Felületkezelő polimer festék antimikrobiális hatékonyságának vizsgálata. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2021.

Csanády Péter: Magyarországi eredetű propolisz hatékonysága galambból izolált kórokozók esetében. TDK dolgozat. Témavezető: Kerek Á., Budapest, 2021.

10. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Jerzsele Ákos tudományos és innovációs rektorhelyettes, tanszékvezető egyetemi docens úrnak, valamint Dr. Bányai Krisztián tudományos főmunkatárs úrnak, hogy mindvégig motiváltak a doktori fokozat megszerzésének fontosságát hangsúlyozva. Iránymutatásuk és szakmai precizitásuk nélkül ez a kutatómunka nem valósulhatott volna meg.

Külön köszönetemet fejezem ki kollégáimnak, az Állatorvostudományi Egyetem Gyógyszertani és Méregtani Tanszékének munkatársainak: Dr. Somogyi Zoltánnak, Dr. Kovács Dórának, Dr. Farkas Orsolyának, Dr. Nemes-Terényi Melindának, Dr. Mag Patriknak, Dr. Palkovicsné Dr. Pézsa Nikolettának, hogy javaslataikkal és útmutatásukkal mindig mellettem álltak és támogattak utamon. Hálával tartozom Nagy Gergelynek, Paliczné Kustán Biankának, Péntes Imréné Tündének és Balogh Katalinnak, akik a technikai háttér biztosításában nyújtottak segítséget. A genetikai vizsgálatok és bioinformatikai elemzések során nyújtott nélkülözhetetlen segítséget Dr. Kaszab Eszter, Dr. Bali Krisztina, Dr. Papp Márton és Dr. Laczkó Levente.

Köszönettel Tartozom TDK hallgatóimnak, Dr. Török Bencének, Barnácz Franciskának, Csirmaz Bencének, Szabó Kingának, Román István Lászlónak akik tudományos érdeklődéssel kapcsolódtak be kutatásomba és segítették munkámat.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családomnak, hogy türelemmel és támogatásukkal mögöttem álltak és hittek abban, hogy elképzeléseimet megvalósítom.

A projekt az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-20-3-I-ÁTE-1 és ÚNKP-21-2-I-ÁTE-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával, az Állatorvostudományi Egyetem Normatív Kutatásfinanszírozási Bizottságának (NKB) támogatásával, valamint a TKP2020-NKA-01 számú projekt keretében a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a Tématerületi Kiválósági Program 2020 (2020-4.1.1-TKP2020) pályázati program finanszírozásában készült.

Az Innovációs és Technológiai Minisztérium Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

Az RRF-2.3.1-21-2022-00001 számú projekt a Helyreállítási és Ellenállóképességi Eszköz és Nemzeti Helyreállítási Alapból nyújtott támogatásával, az RRF-2.3.1-21 pályázati program finanszírozásában valósult meg.