

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2496.

DOMOKOS JUDIT

Mikroorganizmusok és anyagaik hatásainak molekuláris, celluláris és organizmus szintű vizsgálata

című program

Programvezető: Dr. Nagy Károly, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Szabó Dóra, egyetemi tanár

Fluorokinolon rezisztencia fenó- és genotípusos vizsgálata hemokultúrából izolált *Escherichia coli* és *Klebsiella* fajok esetén

Doktori (Ph.D.) értekezés

Domokos Judit

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Szabó Dóra, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Kónya József, D.Sc., egyetemi tanár

Dr. Zelles Tibor, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Törő Klára, Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Csire Márta, Ph.D., laborvezető

Dr. Ungvári Zoltán, Ph.D., egyetemi tanár

Budapest

2020

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	5
1. Bevezetés	8
1.1. Történeti áttekintés	8
1.2. Nozokomiális kórokozók az <i>Enterobacteriaceae</i> családban	10
1.2.1. Az <i>Escherichia coli</i> általános jellemzőinek áttekintése.....	11
1.2.2. A <i>Klebsiella</i> fajok általános jellemzőinek áttekintése	12
1.3. A fluorokinolonok evolúciója és hatásmechanizmusa.....	14
1.3.1. A kinolonoktól a fluorokinolonokig	14
1.3.2. A fluorokinolonok hatásmechanizmusa.....	17
1.4. Intrinsic rezisztencia az <i>Enterobacteriaceae</i> családban	20
1.4.1. A kinolon rezisztenciát meghatározó régiók mutációja.....	21
1.4.2. Porin és membrán permeabilitás	22
1.4.3. Efflux és membrán permeabilitás	22
1.5. Plazmidon kódolt kinolon rezisztencia determinánsok	23
1.5.1. A <i>qnr</i> gének	24
1.5.2. Az <i>aac(6')-Ib-cr</i> variáns	26
1.5.3. Az efflux pumpa gének (<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qepA</i>)	27
1.6. Génszabályozás: SOS válaszrendszer és AraC család.....	28
1.7. Nemzetközi magas kockázatú klónok.....	32
1.7.1. A <i>Klebsiella pneumoniae</i> magas kockázatú klónjai	33
1.7.2. A <i>Klebsiella pneumoniae</i> ST307, mint potenciális magas kockázatú nemzetközi klón.....	34
1.8. Rezisztencia plazmidok	35
2. Célkitűzések	37
3. Anyagok és módszerek	39
3.1. Baktériumtörzsek	39
3.2. A baktériumtörzsek fenotípusos vizsgálata	39

3.2.1.	A baktériumtörzsek identifikálása	39
3.2.2.	A kiterjedt spektrumú β -laktamáz termelésének vizsgálata.....	39
3.2.3.	Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok.....	39
3.3.	A baktériumtörzsek genotípusos vizsgálata.....	41
3.3.1.	A plazmid-mediálta kinolon rezisztencia gének vizsgálata polimeráz láncreakcióval	41
3.3.2.	A szekvenciatípus meghatározása multilókusz-szekvencia tipizálással	43
3.3.3.	Bakteriális genomszekvencia-tipizáló adatbázis	44
3.3.4.	A pulzotípus meghatározása pulzáltatott-mezejű gélelektroforézissel .	45
3.3.5.	Az izolátumok vizsgálata teljes genom szekvenálással	46
3.3.6.	Relatív génexpresszió vizsgálata kvantitatív polimeráz láncreakció módszerrel	47
4.	Eredmények.....	50
4.1.	A baktériumtörzsek fenotípusos vizsgálatának eredményei.....	50
4.1.1.	A baktériumtörzsek identifikálásának eredménye	50
4.1.2.	A kiterjedt spektrumú β -laktamáz termelés vizsgálatának eredménye .	50
4.1.3.	Az antibiotikum érzékenységi vizsgálat eredménye.....	51
4.2.	A baktériumtörzsek genotípusos vizsgálatának eredményei	52
4.2.1.	A plazmid-mediálta kinolon rezisztencia gének polimeráz láncreakcióval történő vizsgálatának eredménye	52
4.2.2.	A multilókusz-szekvencia tipizálás eredménye	54
4.2.3.	A bakteriális genomszekvencia-tipizálás eredménye	55
4.2.4.	A pulzáltatott-mezejű gélelektroforézis eredménye	56
4.2.5.	A teljes genom szekvenálás eredménye.....	57
4.2.6.	A kvantitatív polimeráz láncreakció eredménye	61
5.	Megbeszélés.....	63
5.1.	A vizsgálat törzsek fenotípusos rezisztenciája.....	63
5.2.	Fluorokinolon rezisztenciában szerepet játszó gének	65
5.3.	A fluorokinolon rezisztencia és a kiterjedt spektrumú β -laktamázok európai elterjedése	67

5.4. A vizsgált <i>Klebsiella pneumoniae</i> törzsek klonalitása és az ST307 klón térnyerése.....	72
6. Következtetések, új eredmények	79
7. Összefoglalás	81
8. Summary.....	81
9. Irodalomjegyzék	83
10. Saját publikációk jegyzéke	115
10.1. Az értekezés témájában megjelent publikációk	115
10.2. Egyéb témában megjelent publikációk	115
11. Köszönetnyilvánítás	116

Rövidítésjegyzék

AAC	Aminoglycoside acetyltransferase (Aminoglikozid-acetiltranszferáz)
AME	Aminoglycoside-modifying enzymes (Aminoglikozid-módosító enzimek)
ATCC	American Type Culture Collection (kontrolltörzs gyűjtemény)
AWaRe	Access-Watch-Reserved klasszifikáció
BacWGSTdb	Bacterial Whole Genome Sequence Typing database (Bakteriális genomszekvencia-tipizáló adatbázis)
BHI	Brain heart infusion broth
bp	Bázispár
CC	Clonal complex (Klonális komplex)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
C _T	Cycle threshold (Küszöbciklus)
DDST	Double-disk synergy test (Kettős-korong diffúziós teszt)
DNS	deoxiribonukleinsav
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (Európai Antibiotikum Rezisztencia Surveillance Hálózat)
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ESBL	Extended-spectrum β -lactamase (kiterjedt spektrumú β -laktamáz)
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter spp.</i>
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Antimikrobiális szerekekkel szembeni Érzékenységi Vizsgálatok Európai Bizottsága)
FDA	Food and Drug Administration (Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelet)
ICE	Integrative and conjugative elements (Integratív és konjugatív elemek)
ISCR	Insertion Sequence Common Region

ISE	Insertion sequence (Inszerációs szekvencia)
ITO	Intenzív Terápiás Osztály
LLQR	Low-level quinolone resistance (Alacsony szintű kinolon rezisztencia)
LPS	Lipopoliszacharid
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization (Mátrixasszisztált lézerdeszorpció-ionizációs tömegspektrométer)
MDR	Multidrog-rezisztencia
MGB	Minor groove binder
MH	Mueller-Hinton (tápleves)
MIC	Minimum inhibitory concentration (Minimális gátló koncentráció)
MLST	Multilocus-sequence typing (Multilókusz-szekvencia tipizálás)
MST	Minimum spanning tree („Minimális feszítőfa” módszer)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Nemzeti Biotechnológiai Információs Központ, U.S.)
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NGS	Next-generation sequencing (Újgenerációs szekvenálás)
NNK	Nemzeti Népegészségügyi Központ
NNSR	Nemzeti Nosocomialis Surveillance Rendszer
Omp	Outer membrane protein (Külső membránprotein)
PAI	Pathogenicity islands (Patogenitási szigetek)
pAmpC	Plazmidon kódolt AmpC-típusú β -laktamáz
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeráz lánreakció)
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis (Pulzáttatott-mezejű gélelektroforézis)
PMQR	Plasmid-mediated quinolone resistance (Plazmid-mediálta kinolon rezisztencia)
PRP	Pentapeptid-Repeat Protein family
PT	Pulso type (Pulzotípus)
qPCR	Quantitative PCR
QRDR	Quinolone resistance determining regions (Kinolon rezisztenciát meghatározó régiók)

RND	Resistance-nodulation-division family
SBS	Sequencing by Synthesis
SE LMI KMDL	Semmelweis Egyetem Labor Medicina Intézet, Központi Mikrobiológiai Diagnosztikai Laboratórium
SLV	Single locus variant (Egyetlen lókuszos variáns)
SNP	Single-nucleotide polymorphism (Egy pontos-nukleotid polimorfizmus)
SRA	Sequence Read Archive (Szekvenciaolvasási Archívum)
ST	Sequence type (Szekvenciatípus)
TCS	Two components system (Kétkomponensű rendszer)
TEA	Tris-EDTA- glacial acetic acid (jégecet) puffer
TMQR	Transferable mechanisms of quinolone resistance (Kinolon rezisztencia transzferálható mechanizmusai)
TOPRIM domén	Topoisomerase-primase domén
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic averages
VRE	Vankomicin rezisztens <i>Enterococcus</i>
WGS	Whole genome sequencing (Teljes genom szekvenálás)
WHO	World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

1. Bevezetés

1.1. Történeti áttekintés

Közel egy évszázad telt el Sir Alexander Fleming korszakalkotó felfedezése, a penicillin antimikrobiális hatásának leírása óta, mely mérföldkőnek számított a modern orvostudomány bakteriális fertőzésekkel szemben vívott harcában. Nem sokkal felfedezését követően igazolták a penicillin terápiás hatékonyságát, azonban még a klinikai gyakorlatba történő bevezetése előtt, 1940-ben azonosították *Escherichia coli*-ban az első antibiotikum rezisztencia mechanizmust is. Ekkor fedezték fel a penicillin β -laktám gyűrűjét hidrolizáló enzimet, a penicillinázt (1, 2). A II. világháborúban a katonák sérüléseit, sebfertőzéseit gyógyító „csodaszer” ígéretes kezelésnek bizonyult, azonban egyes közlemények leírása alapján a szer profilaktikus alkalmazása elterjedtebb volt ebben az időszakban (3). Jóllehet a rezisztencia terjedésének veszélyére már maga Fleming is figyelmeztetett az antibiotikum-éra kezdetén (4, 5).

A β -laktám rezisztens kórokozók megjelenésének problémája már több évtizede „pandémiássá” vált (6). A gyógyszeripar a 80-as évek végéig számos új antibiotikumot vezetett be a klinikai gyakorlatba a β -laktám antibiotikumokra rezisztens kórokozók ellen mivel a korábban rendkívül hatékony antibiotikumok sokasága hatástalanná vált (4). Különböző típusú, szintetikus és félszintetikus antibiotikumok váltak világszerte elérhetővé, melyek jórésze napjainkban számos országban vény nélkül kiválthatóak, különösen Romániában és Görögországban (7). A fluorokinolonokat 1960-as évek elején történt felfedezésük óta világszerte kiterjedten használják közösségekben szerzett, valamint súlyos kórházi fertőzések kezelésére (8). A gyógyszercsoport mai napig tartó népszerűségét kedvező farmakokinetikai tulajdonságainak és antimikrobiális spektrumának köszönheti, azonban széleskörű alkalmazása nemzetközi krízishelyzetet teremtett az antibiotikum rezisztencia vonatkozásában. A fluorokinolon rezisztencia kialakulására jellemző az *Enterobacteriaceae* család képviselői estén, hogy endogén mutáció-felhalmozódások, valamint plazmid-mediálta kinolon rezisztencia (plazmid-mediated quinolone resistance, PMQR) determinánsok horizontális géntranszferrel történő terjedése révén valósul meg (9-11). A plazmid által közvetített mechanizmusok csupán alacsony szintű fluorokinolon rezisztenciát (low-level quinolon resistance, LLQR) biztosítanak, amely önmagában nem haladja meg az érzékenység klinikai

határértékét. A PMQR gének jelenléte azonban elősegíti a bakteriális kromoszóma kinolon rezisztenciát meghatározó régiókban (quinolone resistance determining regions, QRDR) bekövetkező mutációk kialakulását. Ezzel magasabb szintű rezisztencia elérését teszi lehetővé, és megnehezíti a PMQR géneket hordozó patogének által okozott fertőzések kezelését (12-14).

A cefalosporinok több generációba sorolhatóak a kémia szerkezetük, antibakteriális spektrumuk alapján. A harmadik generációs cefalosporinokat az 1980-as évek elején kezdték alkalmazni a klinikai gyakorlatban. Erre az antibiotikum csoportra jellemző a kiváló hatékonyság a Gram-negatív baktériumokkal szemben, valamint a jó szöveti megoszlás. A különböző β -laktamázok termelésével azonban a legtöbb humán patogén Gram-negatív baktérium kialakított rezisztenciát a cefalosporinokkal szemben. A kiterjedt spektrumú β -laktamáz (extended-spectrum β -lactamase, ESBL) megjelenéséről először 1983-ban számoltak be, melyet elsősorban *Klebsiella spp.* által okozott kórházi fertőzések során azonosítottak (15-17). Azóta számos közlemény jelent meg a fluorokinolon rezisztencia, valamint az ESBL-termelés együttes jelenlétéről, mely korlátozott kezelési lehetőségeket, egyúttal a karbapenem antibiotikumok szükségszerű felhasználását eredményezte (17). A karbapenem rezisztencia a bélbaktériumok közül szintén a *Klebsiella* genusban jelentkezik a legdominánsabban (18).

Az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization, WHO) 2019 októberében kiadott, tudatos antibiotikum használatra ösztönző ún. „AWaRE” klasszifikációja három csoportba sorolja az antibiotikumokat. Az alacsonyabb rezisztencia potenciállal rendelkező Access (hozzáférhető) csoportba tartozó amoxicillin (önállóan, esetleg klavulánsavval kiegészített formában) máig a leggyakrabban használt antibiotikum. A Watch (odafigyeléssel alkalmazandó) csoport olyan antibiotikumokat (köztük negyven fluorokinolont) foglal magába, amelyek alkalmazása antibiotikum rezisztencia kialakulásának fokozottabb kockázatával társul. A Reserve (tartalék) csoportba olyan antibiotikum tartoznak, amelyeket a multirezisztens mikroorganizmusok által okozott (konfirmált vagy feltételezett) fertőzések kezelésére szükséges fenntartani, kitüntetett figyelmet szentelve a karbapenem rezisztens *Enterobacteriaceae* családnak. Az e csoportba tartozó antibiotikumokat utolsó lehetőségként tartják számon, melyekre a köznyelvben gyakran „páncélszekrény-antibiotikum” elnevezéssel hivatkoznak (19).

Az *Enterobacteriaceae* család fluorokinolonokkal szemben rezisztens izolátumainak aránya az elmúlt évtizedekben növekvő tendenciát mutatott, mely képességhez nem ritkán egyéb antimikrobiális rezisztencia is társul. A napjainkig detektált rezisztenciagének diverzitása, a rezisztens törzsek szelekciója, térhódítása sarkallta kutatócsoportunkat az *Enterobacteriaceae* család *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* és *Klebsiella oxytoca* fajainak rezisztenciájával kapcsolatos kutatások elvégzésére. Kutatásunk során kulcsszerepet kaptak a *K. pneumoniae* törzsekkel folytatott vizsgálatok, dolgozatomban ezért ez a faj részletesebben kerül bemutatásra.

1.2. Nozokomiális kórokozók az *Enterobacteriaceae* családban

Az Egészségügyi Minisztérium 20/2009 (VI.18) számú az egészségügyi ellátással összefüggő fertőzések megelőzéséről, e tevékenységek szakmai minimumfeltételeiről és felügyeletéről szóló rendelete értelmében, nozokomiális fertőzésnek tekintjük azt az egészségügyi ellátással összefüggő fertőzést, amelyet a beteg, az egészségügyi dolgozó, valamint az egészségügyi ellátással kapcsolatba kerülő más személy a fekvőbeteg-szakellátás során szerez, és amely az intézményi felvételnél lappangó formában sem volt jelen.

Az intenzív terápiás osztályokon (ITO) ápolts csökkenő immunitású betegek adekvát ellátása során gyakran nélkülözhetetlenek a különböző invazív beavatkozások. A fiziológiásan steril helyekre behatoló intravaszkuláris kanülök, húgyúti katéterek kiváló felszín biztosítanak a beteg, esetleg egyéb személy (egészségügyi személyzet, látogatók) bőrét kolonizáló baktériumok számára lehetőséget teremtve a véráramfertőzés kialakulására. E fertőzések az intenzív osztályokon meglehetősen gyakran, riasztóan magas halálozási arányt érnek el. A kórházi környezetben jelenlevő mikroorganizmusok, valamint a kontaminált étel, víz fogyasztása szintén infekcióforrás lehet (20-22). A kórházi fertőzések leggyakrabban légúti, húgyúti, műtéti és lágyszöveti fertőzések, gastroenteritis és meningitis formájában manifesztálódnak (23). A mechanikus lélegeztetéssel összefüggő tüdőgyulladás az egyik leggyakoribb kórházban szerzett fertőzés (24). Az eszközhasználaton túl számos egyéb predisponáló tényező teheti fogékonyabbá a pácienseket nozokomiális fertőzésekkel szemben, ezek között említhetjük a protéziseket, immunszuppresszív kezeléseket, a széles spektrumú antibiotikumok túlzott használatát. Mindezek következményeként multirezisztens

kórokozók jelennek meg, az általuk okozott fertőzések pedig jelentősen növelik a morbiditást és a mortalitást, illetve jelentősen meghosszabbítják a kórházban tartózkodás időtartamát (25, 26). A multirezisztens kórokozók által okozott fertőzések rendkívül rossz prognosztikai jelnek minősülnek (27). A WHO adatai azt mutatják, hogy Észak-Amerikában és Európában a kórházi ápolás 5–10% -a során történik nozokomiális fertőzés, míg ez az érték Latin-Amerikában, a Szaharától délre fekvő afrikai országokban és Ázsiában a 40% -ot is meghaladhatja (28).

Az *E. coli*, *Klebsiella spp.* és *Enterobacter spp.* a húgyúti fertőzések, véráramfertőzések, kórházi és egészségügyi ellátással összefüggő fertőzések legjelentősebb kórokozói közé tartoznak. Rezisztenciájuk egyrészt ESBL-termelő képességüknek, másrészt egyéb mechanizmusoknak köszönhető, melyek segítségével multirezisztenssé válhatnak. A *K. pneumoniae* és *Enterobacter* fajok az ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*) mozaikszóval jelölt csoportban is képviseltetik magukat, mely magában foglalja mindazon kórokozót, amelyek a legjelentősebb terápiás kihívással szembesítik a klinikumban dolgozókat (29, 30). A rezisztencia és multirezisztencia gyakoribbá válásának fő okaként a szakirodalom az antibiotikumok imprudens és túlzott mértékű használatát jelölte meg (6).

A nozokomiális fertőzés, mint növekvő globális közegészségügyi probléma jelentőségét érzékelteti a Nemzeti Népegészségügyi Központ (NNK) tájékoztatója is a Nemzeti Nozokomiális Surveillance Rendszer (NNSR) eredményeiről: 2017-ben ötvenegy fekvőbeteg ellátó intézmény 106 nozokomiális járványt jelentett, míg a 2018-as adatok alapján ötvenöt fekvőbeteg ellátó intézményben 131 nozokomiális járvány történt (31, 32)

1.2.1. Az *Escherichia coli* általános jellemzőinek áttekintése

Az emberek és melegvérű állatok gyomor-bél traktusát kolonizáló *E. coli* az egyik leggyakoribb, egészségügyi környezetben fertőzést okozó bélbaktérium (33, 34). Megbetegítő képessége meglehetősen széles skálán mozog. Az *E. coli* által okozott leggyakoribb extraintestinális fertőzés a húgyúti infekció, mely kialakulásához számos virulencia faktor jelenlétét társították (35, 36). *E. coli* törzsek felelősek a nem-komplikált húgyúti fertőzések 75–95%-ért és a komplikált húgyúti fertőzések 40–50%-áért, továbbá

egyéb extraintestinális fertőzéseket, véráramfertőzést, pneumoniát, spontán peritonitist, ascendáló cholangitist, osteomyelitist és meningitist is okozhatnak (37, 38).

A változatos kórképeket a virulenciagénekben fellelhető sokoldalúság magyarázza, melyek kromoszómán, patogénitási szigeteken (pathogenicity islands, PAIs) vagy plazmidokon helyezkedhetnek el (39). A genom jelentős plaszticitása elősegíti a különböző virulencia faktorok és antibiotikum rezisztencia gének terjedését és cseréjét az *E. coli* populációban (40). Az antibiotikum rezisztencia esetén kiemelendő a fluorokinolokkal szemben kialakult rezisztencia, amely a világ számos részén drámai méretet ölt: 20% feletti a közösségben szerzett nem komplikált húgyúti fertőzésből izolált fluorokinolon rezisztens törzsek aránya, míg a komplikált húgyúti infekció esetén ez az arány 50% feletti lehet (41). A fluorokinolon rezisztencia mellett az ESBL-termelés képessége szintén jellemző a fertőzést okozó *E. coli* törzsekre, a fertőzések incidenciája világszerte növekvő tendenciát mutat (26). Amint erre dolgozatomban már utaltam, a PMQR és ESBL gének gyakran egyidejűleg vannak jelen, sőt ugyanazon a transzferábilis plazmidon helyezkedhetnek el, amelyek horizontális génátvitel révén terjedhetnek a különböző *Enterobacteriaceae* fajok között (11, 42, 43).

Egyes *E. coli* klónok szelektív sikere, illetve klonális disszeminációja teljes egészében vagy részben a rezisztenciagént hordozó genetikai elemeknek tulajdonítható, amelyekről ismert, hogy adhéziót, virulenciát, bakteriocin immunitást és evolúciós fitnesszt biztosítanak (44).

1.2.2. A *Klebsiella* fajok általános jellemzőinek áttekintése

A *Klebsiella* genus tagjai a környezetben, emberi és állati szervezetekben (lovak, sertések) a nasopharynx és a gasztrointesztinális rendszer nyálkahártyáit kolonizálva egyaránt megtalálhatóak, valamint a bőrön a tranziens flóra tagjaiként. Adaptációs képességeiket illetően a *Klebsiella* fajok rokonságot mutatnak az *Enterobacter* és *Citrobacter* genusokkal, azonban különböznek az *Escherichia* vagy *Shigella* nemzetség képviselőitől (45, 46). A kimutatás aránya a székletmintákban 5–38%, míg az nasopharynx esetén 1–6%; ez az arány azonban nagymértékben megváltozhat a kórházi környezetben, ahol a kolonizációs arány növekszik a tartózkodás hosszának függvényében. Egy 1977-ben megjelent publikáció – mely az érintés általi terjedés jelentőségét vizsgálja – egyértelműen rávilágít, hogy rendszeres kézmosás mellett

csökken a kórházi fertőzések incidenciája. Ez alapján feltételezhető, hogy a direkt kontaktus a *Klebsiella spp.* fő terjedési útvonala (45, 47). Az antibiotikum-rezisztencia krízis és multidrog-rezisztencia (MDR) fogalmával összefonódott *K. pneumoniae* nem véletlenül vált a genus orvosi szempontból legjelentősebb tagjává, míg a *K. oxytoca* klinikai betegmintából történő izolálása lényegesen kevesebb esetben történik, ugyanakkor számos közlemény kétségbevonhatatlanul alátámasztja genetikai potenciálját, mivel ESBL és PMQR géneket egyaránt hordozhat (45, 48).

A fertőzés szempontjából legfontosabb kockázati csoportba azok a kórházban ápolott betegek tartoznak, akik súlyos alapbetegségben szenvednek (pl. diabetes mellitus vagy krónikus tüdő obstrukció) (45). A *Klebsiella* fajok az *E. coli*-hoz hasonlóan változatos klinikai kórképek kialakításáért felelősek; véráram-, tüdő-, seb-, húgyúti és intra-abdominális fertőzés létrehozásában egyaránt részt vehetnek (49). Az intravaszkuláris eszközök használata növeli a súlyos szövődmények, például trombophlebitis és katéter-asszociált véráramfertőzések kockázatát, mely összefüggést mutat a ténnyel, hogy az ESBL-termelő *K. pneumoniae* fertőzés miatti halálesetek szignifikánsan kapcsolódnak a húgyhólyag-katéterek használatához (27, 50). A teljes genom szekvenálással (WGS) végzett kutatások eredményei pedig mindinkább alátámasztják a *K. pneumoniae* genetikai plaszticitásának figyelemre méltó potenciálját (51).

A *Klebsiella spp.* legfontosabb virulenciagénjei között említhetjük a fimbriális géneket (*mrk* és *fim* operonok), amelyek „mediálják” a felületekhez és a gazdaszövetekhez való tapadást. A gazdaszervezet kolonizációjában a vasfelvételi rendszerek (aerobaktin enterobaktin, yersiniabaktin) génjeinek is fontos szerep jut (52). A cps lókuszt által kódolt poliszacharid tok azonban a *K. pneumoniae* legszélesebb körben vizsgált virulenciafaktora. Kimutatták, hogy a *K. pneumoniae* tokja hozzájárul az antimikrobiális peptidokkal, pl. β -defenzinokkal szembeni rezisztencia kialakulásához, antiphagocytos hatású, illetve szerepet játszik a biofilm képződésben is (51, 53, 54). A poliszacharid túltermelése fokozott mukoviszkozitással jár, és megkülönböztetett virulencia-fenotípust eredményez (51). A iatrogén fertőzések létrejöttében tehát e faj esetén is kardinális szerepet vállal a baktérium genetikai konstellációja, a virulencia- és rezisztenciagének kifejeződésének jól szabályozott szisztémája. Az *E. coli* mellett a *K. pneumoniae* szintén kiemelkedő jelentőséggel bír az *Enterobacteriaceae* több

antibiotikumcsoporttal szemben rezisztenciát mutató fajai között, mely az ESKAPE csoportba történő besorolásuknak alapját képezte.

A fluorokinolon rezisztencia kialakulása a QRDR-ban, a DNS-giráz és topoizomeráz IV génjeiben bekövetkező egyszeres vagy többszörös mutációkkal magyarázható, amihez hozzájárulnak az antibiotikum intracelluláris felhalmozódását befolyásoló egyéb genomi változások is. Általában több mutációra van szükség a klinikai szempontból jelentős rezisztenciaszint eléréséhez, mivel a vad típusú mikroorganizmusok nagyon érzékenyek. Mindezek mellett horizontális géntranszferrel mobilis genetikai elemekre, elsősorban plazmidokra tesznek szert, melyeken rezisztenciát biztosító gének helyezkednek el (9, 43, 55). A magas kockázatú *K. pneumoniae* klónokban jelen vannak ezek az antibiotikum rezisztencia determinánsok, amelyek lehetővé tették számukra patogenitásuk és túlélési képességük növelését. A rezisztencia determinánsok felhalmozása hozzájárul a globális MDR terjedéséhez (56). Következésképpen a plazmid által kódolt antimikrobiális rezisztencia gének fokozott diverzitása megkönnyíti ezen klónok terjedését, jelentős terápiás nehézséget okozva.

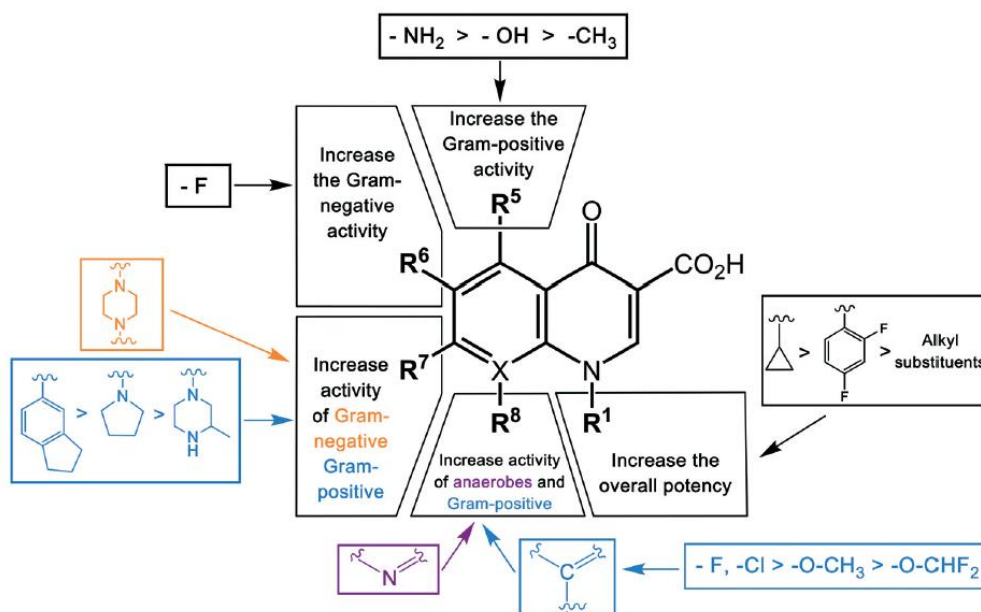
Az utóbbi években számos publikációban jelentették a karbapenem rezisztenciát biztosító gének megjelenését és térhódítását is, mely a fluorokinolon és más típusú β -laktám rezisztencia mellett aggasztó jövőt jósol a kórokozókkal szembeni terápiás harcban (18, 57).

1.3. A fluorokinolonok evolúciója és hatásmechanizmusa

1.3.1. A kinolonoktól a fluorokinolonokig

Az antibiotikumcsoport első prototípusának tekintett kinolont, a szűk spektrumú nalidixinsavat 1962-ben fedezték fel maláriaellenes kininvegyületek szintézisének melléktermékeként, melyet 1967-től Gram-negatív baktériumok által okozott húgyúti infekciók kezelésére alkalmaztak (58, 59). Néhány évvel később a kinolonok antimikrobiális spektrumát jelentősen kibővítette egy kulcsfontosságú módosítás: egy fluor atom hozzáadásával innovatív hatóanyagfejlesztés vette kezdetét, amit a nalidixsavval szemben rendkívül gyorsan kialakuló rezisztencia ténye is indokoltá tett (60, 61). Az újabb és újabb vegyületek az első generációs kinolonokhoz képest kedvezőbb farmakokinetikai profillal rendelkeztek, ami lehetővé tette a napi egyszeri adagolást,

illetve gyakran kiküszöbölte a parenterális kezelés szükségességét. A fluorokinolonok alkalmazása a pneumonia terápiás kudarcának megoldódását vetítette előre (62).

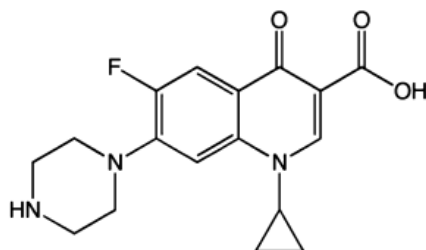


1. ábra. A kinolonok szerkezet-aktivitás összefüggései. A kinolonok antibakteriális aktivitása javul a különböző pozícióban lévő különböző szubsztituensek módosításával. A keretekben szereplő csoportok színe összefügg az antimikrobiális hatás típusával (9).

A fluorokinolonok aktivitási spektrum alapján négy generációra oszthatók, ahol a növekvő generációs szám a szélesedő antimikrobiális spektrumra utal (1. ábra) (9). Az első generációs kinolonok aktivitása csak Gram-negatív baktériumokra korlátozódik, a *Pseudomonas* fajok kivételével (63).

A második generációs fluorokinolonok már hordozták alapgyűrűjük 6-os pozíciójában (R6) a hatékonyságot fokozó fluor atomot. Első képviselőjük a flumequine volt, melyet számos egyéb szer követett, így pl. az enoxacin, a norfloxacin, a ciprofloxacin; ezeket az antibiotikumokat azonban a fluor-szubsztitúción kívül további kémiai változtatásnak vetették alá: alpmolekulájuk piperazin (R7) - és ciklopropil (R1) -gyűrűt is tartalmaz (9, 61, 64). A ciprofloxacint a csoport leghatékonyabb tagjaként tartják számon, mivel Gram-pozitív baktériumokkal szemben is hatásos, illetve azon kevés orális antibiotikumok közé tartozik, amelyek képesek a *P. aeruginosa* fertőzések kezelésére is (2. ábra) (9, 65). Meglepő, hogy az 1990-es években az fluorokinolonok felhasználása az Egyesült Államokban kb. 40%-kal nőtt, megduplázva a ciprofloxacinnal

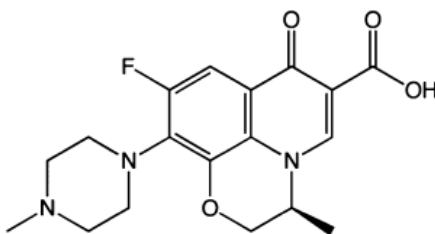
szembeni rezisztencia arányát a kórházak intenzív osztályából izolált Gram-negatív baktériumok között (66). 1997-1999 között a pekingi kórházban szerzett fertőzésekből izolált *E. coli* törzsek kb. 60% -a volt rezisztens a ciprofloxacin ellen (67).



Ciprofloxacin

2. ábra. A ciprofloxacin szerkezeti képlete (68).

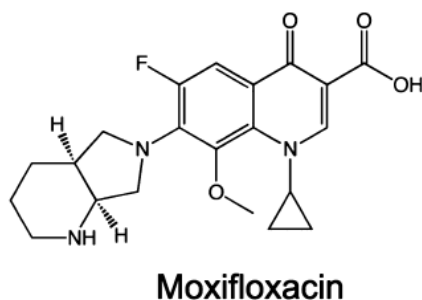
Újabb kémiai módosítások végrehajtásával megkezdődött a harmadik generációs fluorokinolonok szintézise, melyek molekulája jellemzően már alkilezett piperazin és pirrolidinil csoportokat (R7), $-NH_2$, $-OH$ és $-CH_3$ csoportokat (R5), és a fluor atomon kívül egy klóratomot (R8) tartalmaz. Ez a molekulaszervezet javított a Gram-pozitív baktériumokkal szembeni hatékonyságon, míg további módosítások révén növelni tudták az atípusos baktériumokkal szembeni hatékonyságot is. A harmadik generációs fluorokinolonok első tagja a fleroxacin volt, de ebbe a csoportba sorolhatjuk a korábban kiterjedten használt levofloxacint is (3. ábra) (9). A levofloxacin a második generációs ofloxacin L-izomerje, mely molekulája klóratomot nem tartalmaz. A fluorokinolon rezisztens törzsek kialakulásának csökkentése céljából az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyelet (Food and Drug Administration, FDA) a hatóanyag korlátozott alkalmazását javasolta.



Levofloxacin

3. ábra. A levofloxacin szerkezeti képlete (68).

A negyedik generációs fluorokinolonok hatásspektruma az anaerob baktériumokra is kiterjed, amiért egy nitrogénatom (R8) jelenléte felel, míg a 2,4-difluor-fenil-csoport a szer általános hatékonyságát javítja. A csoport legnevesebb képviselője a moxifloxacin (4. ábra) (9, 69, 70).



4. ábra. A moxifloxacin szerkezeti képlete (68).

Mivel a fluorokinolonok kinetikus profilja az eliminációs útvonalak és a metabolikus átalakulás mértékétől függ, dozírozását a kockázat és a haszon elve alapján kell megválasztani, különös tekintettel a krónikus veseelégtelenségben, illetve májfunkciós rendellenességben szenvedő betegekre. Utóbbiak esetében a gyógyszer-metabolitok felhalmozódása súlyos mellékhatások kialakulásához vezethet (71-73).

1.3.2. A fluorokinolonok hatásmechanizmusa

A különböző fluorokinolon vegyület terápiás sikerét idővel – megfontolatlan alkalmazásukból fakadó – terápiás „visszaesésük” kérdőjelezi meg. Az 1990-es évek óta megfigyelhető a fluorokinolon-, illetve multirezisztens kórokozók prevalenciájának drasztikus növekedése (43, 55, 68). Ez lényegében egy paradox helyzetet teremt, mivel pont a siker indukálja a megnövekedett, szinte már kontrollálatlan felhasználásukat. Mint más antibakteriális szerek esetében, a kinolon rezisztencia növekedése is veszélyezteti ennek a kezdetben párját ritkítóan sikeres gyógyszercsoportnak a klinikai alkalmazhatóságát (68).

A fluorokinolonok koncentrációfüggő baktericid hatást fejtenek ki a baktériumok DNS szintézisére, egyúttal gátolják a bakteriális replikációt (43). Hatásmechanizmusuk lényege, hogy a DNS-enzim komplexhez kötődve blokkolják a folyamatban résztvevő két enzim, a DNS-giráz (topoizomeráz II) és a topoizomeráz IV funkcióját, amelyek katalizálják a DNS szuperhelikális állapotának kialakulását, ezzel tehát leállítják a DNS

szintézis folyamatát. Ehhez a folyamathoz mindössze két kinolon molekula jelenléte szükséges. A kinolonok a DNS-girázt és a topoizomeráz IV-et lényegében toxikus enzimekké alakítják, amelyek a baktérium kromoszómáját fragmentálják, ami sejthalálhoz vezet (9, 68, 74, 75).

Mind a DNS-giráz, mind a topoizomeráz IV heterotetramer enzimek, két A és két B alegységgel rendelkeznek. Gram-negatív baktériumokban a DNS-girázt a *gyrA* és *gyrB* gének, a topoizomeráz IV-t a *parC* és *parE* gének kódolják (76).

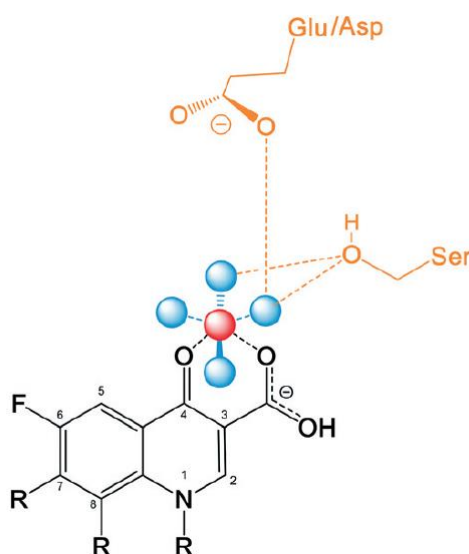
A DNS-szintézis során a kettős szálú DNS-nek egyszálú struktúrává kell válnia, ami templátként szolgál a transzkripció komplexek és a komplementer bázispárosodás folyamatához (9). A széttekeredés során fellépő torziós feszültséget a DNS-giráz enzim oldja fel (68). Az enzim köré tekeredett DNS szakasz szuperhelikalizációjához a DNS-giráz energiát használ fel ATP hidrolízise közben, hogy negatív szuperhélixeket juttasson a DNS szerkezetébe, ami végsősoron a kromoszómák kondenzációjához vezet. ATP hiányában a DNS relaxációját okozza, enyhítve ezzel a replikációs villák előtt felhalmozódott topológiai stresszt. Ezzel szemben a dekatenciáért felelős topoizomeráz IV nem képes a negatív szuperhélixek létrehozására (9, 43). A II-es típusú topoizomerázok további szerepe a DNS kettőslánc időnkénti hasításában, majd (a kettősszál átfűződése után) a láncvégek újbóli összekapcsolásában rejlik (74).

A GyrA és a ParC aktív tirozinmaradékot tartalmaz, amely részt vesz a DNS törésében/ újraegyesítésében. A GyrB és a ParE tartalmazzák az ATPáz domént és a TOPRIM (topoisomerase-primase) domént, amelyek részt vesznek a DNS hasítás és ligálás energiaátvitelében. A DNS-giráz és a topoizomeráz IV fiziológiás funkcióinak különbségei az enzimek C-terminális régióinak különbségeiből adódnak (76).

A kinolonok a humán enzimeket nem befolyásolják, aminek az az oka, hogy az emberi enzimek A és B alegységei fuzionáltak az evolúció során, így homodimerekként funkcionálnak (68).

A legújabb strukturális és funkcionális elemzések kimutatták, hogy a kinolonok a bakteriális topoizomeráz II típusú enzimekhez egy víz-fémion hídon keresztül kötődnek (5. ábra). Ebben az interakcióban egy nem-katalitikus Mg^{2+} -ion és négy vízmolekula vesz részt. Az ionhíd kialakulása során két vízmolekula olyan közel kerül a szerinhez és egy savas aminosav- maradékhoz (glutaminsav vagy aszparaginsav), hogy hidrogénkötéseket képezve ezáltal interakció jön létre a kinolon és az aminosavak között. Az elemzések

alapján az is kiderült, hogy akár a szerin, akár az aminosav-maradék cseréjét jelentő mutáció csökkenti a kinolon-enzim komplex affinitását a nemkatalitikus Mg^{2+} -ionokkal szemben. Ezenkívül bármelyik savmaradék mutációja jelentősen csökkenti a giráz vagy a topoizomeráz IV affinitását. Ezek az eredmények tehát bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy a víz-fémion híd az elsődleges kölcsönhatás a kinolonok és a II. típusú topoizomeráz enzimek között, illetve, hogy a szerin- és a savmaradékok az enzimhíd stabilizáló pontjaiként funkcionálnak (68, 77).



5. ábra. A víz-fémion híd egyszerűsített szerkezeti ábrája. A fluorokinolon (fekete) egy nemkatalitikus Mg^{2+} -ionon (piros) és négy vízmolekulán (kék) keresztül kölcsön-hatásba lép a szerin és a savas aminosav-maradék oldalláncaival (sárga) (9).

Ez a szerkezet megmagyarázza azt is, hogy a kinolonok miért nem befolyásolják a II. típusú humán topoizomeráz enzimeket: az emberi enzim nem tartalmaz szerint és savas aminosav maradékokat, amelyek viszont nélkülözhetetlenek a víz-fémion híd rögzítéséhez (78). Az a tény, hogy a giráz vagy a topoizomeráz IV specifikus mutációi kinolon rezisztenciát okoznak, egyértelműen arra utal, hogy az antibiotikum-fehérje kölcsönhatások fontos szerepet játszanak a hasítási komplexek stabilizálásában (68).

A kinolonok számára Gram-negatív baktériumok esetén a giráz, míg Gram-pozitív baktériumok esetén a topoizomeráz IV az elsődleges target. Léteznek azonban már kettős

hatású szerek is, pl. gemifloxacin és sitafloxacin, amelyek egyidejűleg mindkét fehérje működését gátolják (43, 79).

A kromoszóma fragmentáció következtében DNS repair útvonalak aktiválódnak, köztük az SOS rendszer. A RecA fehérje aktiválása elősegíti a LexA represszor önhasítását, ami derepresszálja az SOS válaszgének expresszióját. Az SOS válaszrendszer aktivációjának megakadályozása gátolja a DNS-repair mechanizmust. A DNS-törések növekedése a funkcióját veszített SOS-rendszerrel kombinálva növeli a kinolonok baktériumölő hatását (80).

1.4. Intrinsic rezisztencia az *Enterobacteriaceae* családban

Az antibiotikum-rezisztencia mechanizmusok vizsgálata során az intrinsic, azaz természetes rezisztencia, valamint az extrinsic, azaz szerzett rezisztencia együttes figyelembevétele szükséges. Az antibiotikum-rezisztencia alapvetően a természetes szelekció eredménye. A baktériumpopulációk genetikai variációi olyan mutációkat hordozhatnak, amelyek előnyösek a túléléshez antimikrobiális szerek jelenlétében. A kromoszómális gének mutációi az intrinsic rezisztencia fokozott kifejezését indukálhatják (81, 82).

A Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumok sejtfastruktúrája különbözik egymástól, ami eltéréseket eredményez a kémiai ágensek penetrációjának és retenciójának tekintetében. A Gram-pozitív baktériumok esetében hiányzik a külső membrán, aminek fő funkciója az, hogy permeabilitási gátként szolgáljon, kizárva ezzel egyes antibiotikumok behatolását a sejtbe. A Gram-negatívok ezen inherens sajátosága tehát eredendően hozzájárul az antibiotikumok széles skálájával (pl. egyes β -laktámok, vankomicin) szembeni rezisztenciához. A külső membrán bármilyen megváltozása csökkent érzékenységet eredményezhet (81, 83, 84).

A kinolonokkal szembeni rezisztenciát háromféle mechanizmussal lehet összekapcsolni: (i) kromoszómális mutációkkal, amelyek megváltoztatják a cél enzimeket és azok antibiotikum-kötő affinitását (QRDR mutációk); (ii) egyéb kromoszómális mutációkkal, amelyek csökkent effektív intracelluláris koncentrációt eredményeznek, akár csökkent felvétel (pl. porinok), akár fokozott kiáramlás (pl. AcrAB-TolC efflux pumpa) révén; és (iii) plazmidon kódolt rezisztenciagénekkel, amelyek speciális fehérjéket, antibiotikumot módosító enzimeket vagy efflux pumpákat termelnek

(6. ábra) (68, 85-88). Utóbbi mechanizmus extrinsic, míg a két előbbi mechanizmus intrinsic rezisztenciát eredményez. Az egyes mechanizmusokhoz kapcsolódó változások nem zárják ki egymást és felhalmozódhatnak, mely magas szintű kinolon rezisztencia elérését teszi lehetővé (88).

1.4.1. A kinolon rezisztenciát meghatározó régiók mutációja

Amint azt a hatásmechanizmusról szóló szakaszban tárgyaltuk, a kinolonok célenzimeit a DNS-giráz és a topoizomeráz IV. A fluorokinolon rezisztencia fő mechanizmusa azokat a mutációkat foglalja magába, amelyek ezen enzimek alegységeit kódoló gének QRDR-jában, azon belül is elsősorban a GyrA vagy ParC aminoterminális doménjeiben következnek be. Ezek leggyakrabban szerint és aszparaginsavat vagy glutaminsavat érintő mutációk; *E. coli* esetén a DNS-giráz 83-as pozíciójában lévő szerin és a 87-es pozíciójában elhelyezkedő savas aminosavmaradék tekinthető „forrópont” -nak, a mutációból fakadó aminosav szubsztitúció tekintetében. A Ser83 és az Asp87 mutációi a leggyakoribb rezisztencia mutációk az *E. coli gyrA* génjében (55). Megfigyelték, hogy a szerin mutációi a mutációkészlet több mint 90% -át teszik ki, amelyet a savmaradék mutációi követnek. A GyrB és ParE alegységek génjeiben bekövetkező mutációk is kinolon rezisztenciát eredményezhetnek, ezek azonban lényegesen ritkábban fordulnak elő (9, 87). Gram-negatív baktériumokban további *gyrB* vagy *parC* mutációk méginkább fokozhatják a kinolonokkal szembeni ellenállóképességet, bár ezek önmagukban hatástalanok vad-típusú GyrA mellett, mivel a legérzékenyebb célpont a legmeghatározóbb a rezisztencia kiváltásában (55, 89, 90). Tehát Gram-negatív baktériumok esetén a DNS-giráz érzékenyebb a kinolonokkal szemben, mint a topoizomeráz IV, míg a Gram-pozitív baktériumok esetén a topoizomeráz IV az elsődleges target (55). Fűzi és munkatársai – különböző kórokozók klonális dinamikáját vizsgálva – rávilágítottak arra az összefüggésre, hogy a világszerte elterjedt, magas kockázatú nagyklónok és a sporadikus elterjedésű, alacsonyabb kockázatú kisklónok közötti fő különbség abban rejlik, hogy az izolátumok képesek-e kedvező genetikai változások, mutációk létrehozására a DNS-girázban és az topoizomeráz IV-ben. Ez a kapacitás előfeltételnek tűnik: a széleskörű disszemináció érdekében egy klónnak képesnek kell lennie olyan kromoszóma mutációk kialakítására, amelyek magas szintű rezisztenciát biztosítanak a fluorokinolonokkal szemben anélkül,

hogy fitnesszüket veszélyeztetnék. A magas kockázatú ESBL-termelő *K. pneumoniae* klónok szekvenciájában gyakran kedvező feltételeket biztosító kettős-szerin (*gyrASer83Phe* vagy *Ser83Ile*; *parCSer80Ile*) mutáció észlelhető (91, 92).

1.4.2. Porin és membrán permeabilitás

A kinolonok intracelluláris koncentrációját a diffúzió általi beáramlás, és az efflux pumpa által történő kiáramlás együttes aktivitása határozza meg (68). A Gram-negatív baktériumok külső membránja permeabilitási barriert jelent a hidrofil vegyületek számára, amelyek a lipopoliszacharid (LPS) miatt nem képesek bediffundálni a sejtbe, azonban jellemzően a külső membrán porin csatornáin keresztül megvalósulhat a diffúzió. Ebből következik, hogy azok a mutációk, amelyek akár porin veszteséget, akár porin downregulációt, akár a porin csatorna méretének, vezetőképességének megváltoztatását eredményezik, a kinolonok és más hatóanyagok korlátozott, lényegesen lassabb diffúzióját eredményezik. Ez az antibiotikumokkal szembeni csökkent érzékenységhez vezet (68, 87, 88, 93, 94). Az OmpX fokozott expressziója – a porin expresszió mintegy downregulátoraként – csökkenti az OmpC, OmpD, OmpF, LamB és Tsx porinok kifejeződését, ami növeli a kinolonokkal szembeni rezisztenciát. Az OmpA-nak ismert szerkezeti szerepe van a sejtburrok integritásának fenntartásában; az antibiotikum-rezisztenciában betöltött pontos szerepe azonban még nem teljesen tisztázott (88, 93-96). Az *Enterobacter aerogenes* multirezisztens törzsei jellegzetes fenotípust mutattak a porinok megváltozott expressziójához kapcsolódóan. Az imipenemre érzékeny, de az ertapenemre rezisztens törzsek esetén az Omp35 porin vesztesége tapasztalható, de az Omp36 porin expressziója megmaradt. Ha azonban az imipenem kezelés folytatódik, mindkét porin expressziója abbamarad. Az Omp35 és az Omp36 konduktanciája és szelektivitása megegyezik az *E. coli* OmpC és OmpF tulajdonságaival (97, 98)

1.4.3. Efflux és membrán permeabilitás

A porin vagy LPS módosulása miatt bekövetkezett csökkent influx gyakran együtt jár az aktív efflux transzporterek alap vagy megnövekedett expressziójával, ami még inkább fokozza az intracelluláris kinolon koncentráció csökkentését, mely elősegítheti más típusú rezisztencia kialakulását és terjedését (68).

Az intrinsic rezisztencia egy jól karakterizált példája az *E. coli* AcrAB-TolC efflux pumpa mechanizmusa (99). Az RND (Resistance-nodulation-division) szupercsaládba tartozó AcrAB-TolC rendszer háromoldalú komplex, amely széles körben elterjedt a Gram-negatív baktériumok körében. A rendszer három alkotóeleme az AcrB, a belső membrán transzporter fehérje, az AcrA, a periplazmatikus adapter protein és a TolC, a külső membrán csatorna. Az *Enterobacteriaceae* család fajaiban széles szubsztrát specificitást mutatnak számos vegyülettel, pl. antibiotikumokkal, színezékekkel, mosó- és tisztítószerrel, valamint fertőtlenítőszerrel szemben (99-101). Egyes közlemények az AcrAB magasszintű expresszióját multirezisztens markerként tartják számon (102). Számos Gram-negatív baktérium, így a *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* és *Neisseria* esetén is kimutatták, hogy az AcrAB-TolC effluxrendszer hiánya a patogenitást, illetve a biológiai versenyképességet egyaránt befolyásolja (100). Az AcrAB-Tolc efflux pumpa energia-dependens működése során az intracelluláris norfloxacin akár 80-90%-át is képes exkretálni az első 10-15 percben (103). Az AcrAB efflux rendszer jelenléte és a ciprofloxacin rezisztencia közötti összefüggésről számos publikáció beszámol, de a kloramfenikollal, a tetraciklinnel, a trimetoprimmel és a β -laktámokkal szembeni érzékenység csökkentésében is szerepet játszik (99, 104, 105).

A megváltozott antibiotikum permeáció révén megszerzett kinolon-rezisztencia nagyrészt olyan szabályozó fehérjék génjeiben kialakult mutációk következménye, melyek az efflux pumpák vagy a porin gének transzkripcióját szabályozzák (106).

1.5. Plazmidon kódolt kinolon rezisztencia determinánsok

Míg bizonyos bakteriális szekvenciák eukarióta genomban történő felfedezése rávilágít a horizontális géntranszfer létezésére és evolúciós jelentőségére, addig orvosi aspektusból szemlélve tovább súlyosbítja az antibiotikum-rezisztencia krízis kérdéskörét. Napjainkban a plazmidon kódolt antibiotikum rezisztencia klinikai és gyakorlati jelentősége miatt is kiemelt területnek számít az orvostudomány frontvonalán (107).

Az elmúlt két évtizedben a PMQR gének megjelenését világszerte detektálták az *Enterobacteriaceae* családba tartozó fajok izolátumaiban. Ezek a (vertikálisan és horizontálisan egyaránt terjedni képes) plazmidok azonban a kinolon mellett általában egyéb antibiotikumcsoporttal szembeni rezisztenciagéneket is hordoznak (11, 43, 108-110). A PMQR gének gyakran ugyanazon a plazmidon vannak, mint az ESBL gének,

melyek konjugációval terjedhetnek a különböző *Enterobacteriaceae* fajok között. A különböző rezisztenciagének együttes jelenléte hozzájárul a klinikai szempontól releváns, magasszintű rezisztencia eléréséhez. Noha a PMQR-determinánsok önmagukban alacsony szintű rezisztenciát eredményeznek, azonban fokozhatják a *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *ompF*, *ompC*, vagy *marR* génekben a mutációk kialakulását és a fluorokinolon rezisztencia mértékét (11, 111, 112).

Habár a PMQR géneket legtöbbször *Enterobacteriaceae* fajokban írják le (*E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*), a bél mikrobiommal interakcióba lépve akár *Bacteroidetes* fajok is akvirálhatják (113, 114). Három mechanizmus kapcsolódik a plazmidon kódolt kinolon rezisztenciához:

- (i) a *qnr* gének által kódolt Qnr fehérjék a DNS-girázhoz és topoizomeráz IV.-hez való kötődésük révén megakadályozzák a fluorokinolonok kötődését (110),
- (ii) az aminoglikozid acetiltrenszeráz [*aac(6')-Ib*] egy változata, az *aac(6')-Ib-cr*, ami a ciprofloxacin módosítása révén csökkenti annak aktivitását (115),
- (iii) az *oqxA*, az *oqxB* és a *qepA* gének által kódolt efflux pumpák működésük révén exkretálják az intracelluláris antibiotikumot (116, 117).

1.5.1. A *qnr* gének

A *qnr* gének által kódolt, a Pentapeptid-Repeat fehérjecsaldhoz (PRP) tartozó ~200 aminosavból álló Qnr fehérjéről azt feltételezik, hogy világszerte a leggyakoribb PMQR gén. Antitoxin funkciót betöltve védelmet biztosítanak a DNS-giráz és topoizomeráz IV számára, mivel megakadályozzák a fluorokinolon és a cél enzim közötti kölcsönhatásokat (11, 109, 110, 118). Ezek a fehérjék nagymértékű homológiát mutatnak az McbG és MfpA fehérjékkel (PRP analógok), amelyek szintén védelmet biztosítanak a kinolonokkal szemben azáltal, hogy csökkentik a rendelkezésre álló kromoszomális targetek számát. Ezen kívül kötődnek a girázhoz és a topoizomeráz IV-hez, és gátolják a hasítási komplex stabilizálását (11, 118, 119). A Qnr fehérje önmagában ugyan csak alacsony szintű rezisztenciát biztosít, a *qnr* gén jelenléte kiszélesíti a mutációs szelekciós ablakot, megkönnyítve a további (rezisztenciát biztosító) mutációk szelekcióját (120).

A PMQR létezése 1998-ban, a *qnrA* gén felfedezésével vált ismertté, melyet az alabamai egyetemen egy vizeletből izolált multirezisztens *K. pneumoniae* törzs FOX-5 β -

laktamázt kódoló plazmidjának (pMG252) tanulmányozása közben fedeztek fel. Kimutatták, hogy a *qnr*-t hordozó plazmid megkönnyítette a magasabb szintű kinolon rezisztencia elérését (110). Egy sanghaji publikáció szintén beszámol a *qnr* gén azonosításáról, melyet *E. coli* izolátumokban mutattak ki a város egy olyan tartományában, ahol az izolátumok rendkívül magasszintű rezisztenciát mutattak a ciprofloxacinnal szemben. A gén gyakorlatilag azonos volt az alabamaival, csupán egyetlen nukleotidnyi különbség volt azonosítható, ami azonban nem változtatta meg a fehérje aminosav-szekvenciáját (121). A QnrA1-nek elnevezett fehérje felfedezését követő években különböző klinikai izolátumokban a fehérjecsalád számos további variánsát identifikálták (122).

A 2003-as japán enterocolitis járványt okozó *Shigella flexneri* 2b klón vizsgálati eredményei hamar fényt derítettek az izolátumok fluorokinolon-rezisztenciájának okára: kimutattak egy konjugatív plazmidot, ami kódolt egy olyan fehérjét, amelynek aminosavszekvenciája a QnrA1 fehérjével csaknem 60%-os homológiát mutatott. Ezt követően további QnrS variánsokat azonosítottak (43, 123).

Indiából származó *K. pneumoniae* törzsek vizsgálata közben Jacoby és munkatársai megállapították, hogy több közülük képes volt átvinni más baktériumokba az alacsony szintű kinolon rezisztenciát annak ellenére, hogy a *qnrA* polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction, PCR) negatívnak bizonyult, ezért az ebben a munkában detektált determináns a nevezéktan alapján a *qnrB* nevet kapta. A QnrB1 43%-os aminosav azonosságot mutatott a QnrA-val és 44%-ot a QnrS-sel (124).

Egy Sanghajból származó *Proteus mirabilis* klinikai törzs PCR vizsgálata negatívnak bizonyult az addig ismert *qnr* génekre, azonban az antibiotikum érzékenységi tesztek során alacsony szintű kinolon rezisztenciát tapasztaltak. A törzs pHS9 plazmidja olyan gént hordozott, ami addig nem ismert Qnr fehérjét kódolt; és ami konjugációs kísérlettel MIC (minimális gátló koncentráció, minimum inhibitory concentration) érték növekedést eredményezett. Így fedezték fel a QnrC fehérjét, mely 64%-ban mutat aminosav sorrend azonosságot a QnrA1, 41%-ban a QnrB1 és 59 %-ban a QnrS1 fehérjével (125).

Szintén konjugációs kísérlet derített fényt a *qnrD* gén létezésére is: a kínai Henan tartományból származó, négy humán eredetű izolátum csökkent érzékenységet mutatott ciprofloxacinnal szemben, melyek plazmidját *E. coli* baktériumba konjugálva a MIC-

érték 32-szeres növekedését tapasztalták. A QnrD 48% -os hasonlóságot mutatott a QnrA1 fehérjével, míg a QnrB1 fehérjével 61%, a QnrS fehérjével pedig 32%-os a homológia (126).

A *qnrVC* gént először *V. cholerae*-ben írták le 2008-ban, és elsősorban a *Vibrionaceae* családban detektálják (127, 128).

A klinikai *K. pneumoniae* izolátumban található *qnrE1* a legújabb típusú *qnr*, melyről elsőként 2017-ben számoltak be. A *qnr* gének és fehérjék filogenetikus rekonstrukciói és a *qnrE1* génkörnyezetének elemzése igazolta, hogy ez a gén egy új *qnr* családhoz tartozik, és valószínűleg az ISEcp1 (insertion sequences, ISE) mobilizálta az *Enterobacter spp.* kromoszómájából a *K. pneumoniae* plazmidjaira (129).

A klinikai törzsekben izolált, *qnr* gént hordozó plazmidok környezeti baktériumokra visszavezethető eredetét Peterson és Kaur meggyőző bizonyítékokkal támasztják alá (130).

A cefalosporin és fluorokinolon rezisztencia kapcsolatára számos kutató felhívja a figyelmet(131). Ezek a rezisztenciagének gyakran ugyanazon a plazmidon helyezkednek el, melyek között figyelemreméltó a *qnr* és az ESBL vagy AmpC típusú β -laktamáz termelést kódoló gének együttes jelenléte. A *qnrA*-t legtöbbször a CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15, FOX-5, SHV-5, SHV-7, SHV-12, SHV-92 és VEB-1 géneket hordozó plazmidokon írják le, míg a *qnrB* a CTX-M-15, SHV-12 és SHV-30 génekkel együtt fordul elő ugyanazon plazmidon. A *qnrS* gén jellemzően a TEM-1 és az SHV-12 génekkel közösen jelenik meg (43, 124, 132).

1.5.2. Az *aac(6')-Ib-cr* variáns

A kinolon rezisztencia elérésében fontos szerepet játszik az enzimatisz modifikáció is, amennyiben a plazmid hordozza az *aac(6')-Ib-cr* variánst. Az aminoglikozid acetyl-transferáz variánsa két mutációt, ezzel együtt két aminosav szubsztitúciót (Trp102Arg és Asp179Tyr) tartalmaz a vad-típushoz képest. Az enzim az (R7) piperazinyűrű szubsztituátlan nitrogénatomját acetylálja, miáltal csökkenti a baktérium ciprofloxacin, a norfloxacin és az enoxacin szembeni érzékenységét (133). Míg a vad-típusú aminoglikozid-acetyltransferáz enzim képes a tobramicin, az amikacin és a kanamicin acetylálására, addig a kinolonok inaktiválása csak az

enzimvariáns által történhet meg. A specifikus enzimhatás eléréséhez azonban mindkét említett pontmutáció szükséges és elégséges feltétel (43).

Az *aac(6')-Ib-cr* allélt Robicsek és munkatársai azonosították Kínából származó klinikai *E. coli* izolátumokból. Önmagában az enzimvariáns csupán alacsony szintű rezisztenciát eredményez a fent említett fluorokinolonokkal szemben, azonban a gén jelenléte lehetővé teszi a túlélést azon baktériumok számára, amelyek kromoszomális QRDR mutációval rendelkeznek. Gyakran detektálható az *aac(6')-Ib-cr* egyéb plazmidon kódolt rezisztenciagénekkel, beleértve a *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* illetve *qepA* különböző alléljait, valamint a CTX-M-1, CTX-M-14, CTX-M-24, DHA-1, SHV-12 és KPC-2 géneket. Hatékonyságát a Qnr fehérjékkel összevetve alacsonyabb MIC érték növekedés tapasztalható. A 'cr' változat széles körben elterjedt az egész világon (43, 115, 134-136).

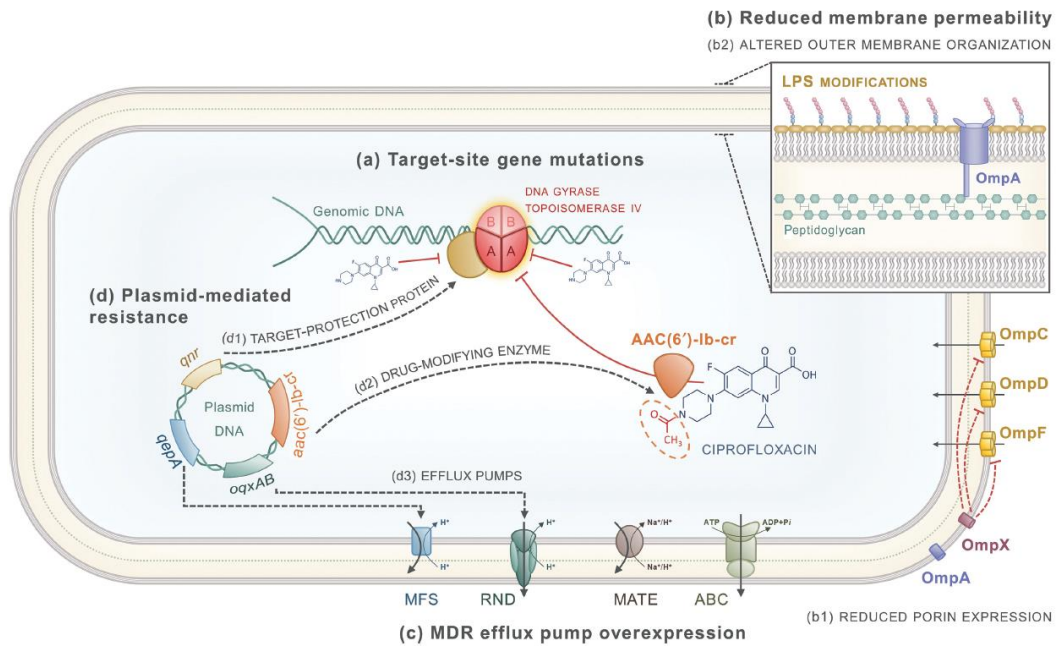
1.5.3. Az efflux pumpa gének (*oqxA*, *oqxB*, *qepA*)

Az intrinsic rezisztencia során tárgyalt többkomponensű effluxrendszer mellett plazmidon kódolt efflux pumpa gének is hozzájárulhatnak az antibiotikumok intracelluláris koncentrációjának csökkentéséhez. A plazmidon kódolt kinolon rezisztencia harmadik mechanizmusa tehát az *oqxAB* és *qepA* gének expresszióját jelentő effluxrendszer (116, 117).

Az *oqxAB* efflux pumpa gént elsőként sertésstrágyából izolált *E. coli* pOLA52 konjugációs plazmidján detektálták, ami csökkent érzékenységet mutatott a mezőgazdasági körülmények között hozamfokozóként használt olaquinox-szal szemben (137). Az *oqxA* és *oqxB* gének expressziója révén a baktérium nalidixsavval és ciprofloxacinnal szemben is rezisztenssé válhat; utóbbi esetén 16-szoros MIC érték növekedésről is beszámoltak. PMQR gén lévén alacsony szintű rezisztenciát biztosít, azonban elősegíti a baktériumok túlélését alacsony kinolon koncentráció mellett, ezáltal hozzájárulhat a magasabb szintű rezisztencia kialakulásához (9, 133, 137).

Japán vizeletmintából származó, szintén *E. coli* izolátumban detektálták először a pHPA plazmidon elhelyezkedő *qepA* efflux pumpa gént (138). Az általa kódolt QepA efflux pumpa széles rezisztenciaprofillal rendelkezik, különösen hatékonyak bizonyul aminoglikozidokkal, fluorokinolonokkal, illetve széles spektrumú β -laktámokkal szemben. Konjugációs kísérletek során a ciprofloxacinnal szemben 32-szeres növekedést eredményezett. Felfedezését követően a két aminosav szubsztitúcióval

rendelkező QepA variánst, a QepA2-t is leírták, míg az elsőként azonosított determináns a QepA1 nevet kapta (139).



6. ábra. A kinolon rezisztencia mechanizmusai. (a) A DNS-giráz és a topozimeráz IV alegységeit kódoló gének QRDR-jaiban bekövetkező kromoszóma mutációk. (b) Csökkent membrán permeabilitás (b1) csökkent porin expresszió vagy (b2) módosított külsőmembrán révén. (c) Az efflux pumpák fokozottabb expressziójához vezető kromoszóma mutációk. (d) A PMQR gének által kódolt Qnr fehérjék (d1), *aac(6')-Ib-cr* acetiltranszferáz variánsok (d2), valamint efflux pumpák (d3). MFS: major facilitator superfamily, MATE, multiple antibiotic and toxin extrusion; ABC, ATP-binding cassette (96).

1.6. Génszabályozás: SOS válaszrendszer és AraC család

A fluorokinolon-rezisztencia kialakulása minden kétséget kizáróan a Gram-negatív baktériumok „sikertörténete”, melyben az SOS válaszrendszer kulcsfontosságú szerepet vállal. Az SOS gének expresszióját a DNS sérülése, vagy a DNS replikáció gátlása során felhalmozódó egyszálú DNS (ssDNS) indukálja. Számos belső és külső faktor aktiválhatja az SOS-választ, amelyet először UV-sugárzásnak alávetett *E. coli* sejtekben azonosítottak, ezért a válaszrendszer indukcióját hamar összekapcsolták a különböző DNS-károsító ágensek alkalmazásával, mint pl. a mitomicin C, antibiotikumok, klasszikus DNS-károsító szerek, extrém pH-értékek (140).

Régóta ismert, hogy a különböző stresszkörülmények hozzájárulhatnak a horizontális géntranszfer fokozásához. Az UV sugárzás befolyásolja a transzpozonok és az ISE-k mobilitását, míg az integratív és konjugatív elemek (ICE, integrative and conjugative elements) horizontális átvitele - amelyek az antibiotikum-rezisztencián és virulencián túl számos egyéb tulajdonságot kódolhatnak - az SOS rendszer, a stressz és egyéb környezeti hatások révén is szabályozható (140-142).

A rendszert a LexA fehérje transzkripciós represszor, és az aktivátorként funkcionáló RecA fehérje irányítja. *E. coli*-ban a RecA serkenti a LexA represszor hasítását, több mint 40 gént aktiválva, amelyek az SOS globális szabályozó hálózatát alkotják. Az SOS válasz indukciója nem csupán az antibiotikum rezisztencia kialakulását és terjedését modulálja, de befolyásolja a virulenciagének szintézisét, szekréciónak és terjedését is (143). Kimutatták, hogy a ciprofloxacinnal való expozíció *E. coli*-ban mutagenizáló hatású, az SOS rendszer mutagén DNS-polimerázainak indukciója a mutációs frekvencia 10^6 -szoros növekedését idézi elő. (144). Czirz és Romesberg bebizonyította, hogy a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia kialakulásához *in vivo* és *in vitro* is szükséges a mutáció indukálása, melyet az SOS represszor LexA hasítása és a három DNS polimeráz derepressziója (Pol II, Pol IV és Pol V) mediál. Az SOS válaszrendszer tehát olyan speciális DNS-polimerázok derepresszióját eredményezi, amelyek mutációk révén elősegítik mind a plazmid által közvetített, mind a kromoszómáisan kódolt kinolon rezisztencia előfordulását (140, 145). A ciprofloxacinnal való expozíció magasabb *recA* transzkripcióhoz és transzlációhoz, valamint az SOS válasz aktiválódásához vezet, mely az *umuC* polimeráz upregulációja révén érhető tetten, és amely magasabb mutációs gyakoriságot eredményez (146). A 90-es évek eleje óta ismert, hogy a *gyrA* mutációk a fluorokinolon-rezisztencia fenotípusát a *recA* génben bekövetkezett változások befolyásolják: a *recA142* mutáció a fluorokinolon-rezisztencia drasztikus csökkenésével társul. (147). A *recA* deléciónak a levofloxacin MIC értékének négyszeres csökkenését eredményezi. A *qnrB2* expresszióját az SOS-válasz révén LexA / RecA-függő módon lehet szabályozni, és ezt a ciprofloxacinnal, mint az SOS-rendszer egyik ismert induktora váltja ki (140, 144).

A rezisztens fenotípus kialakulásával kapcsolatban számos közlemény beszámolt az AraC család regulátorairól (pl. MarA, SoxS, RamA) is, melyek a membrán-asszociált mechanizmus szabályozását végzik (7. ábra). E fehérjék az efflux pumpákat kódoló gének

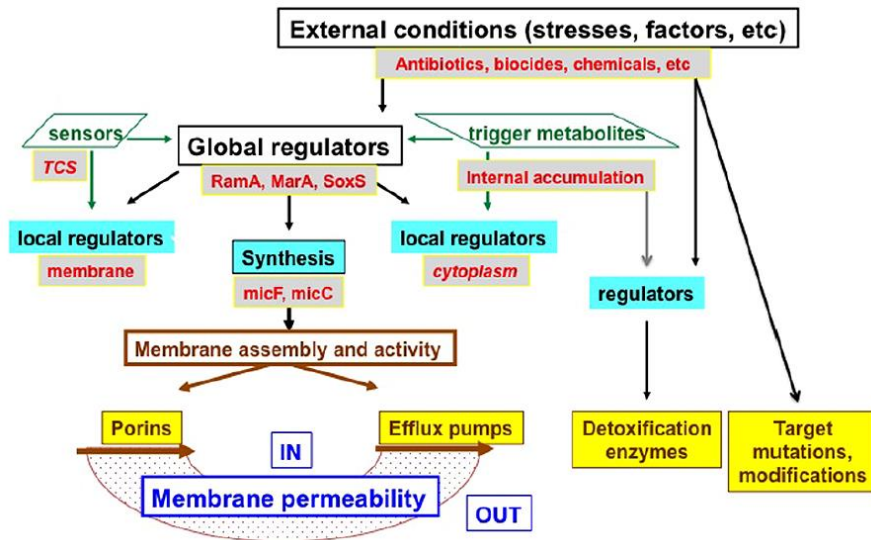
overexpressziója révén hozzájárulnak az antibiotikumokkal és biocidekkel szembeni csökkent érzékenység kialakításához. A MarA fehérje kulcsfontosságú szabályozó szerepet játszik a porin és *tolC* gének expressziójában az *Enterobacteriaceae* család esetén. A SoxS szintén nagy jelentőséggel bíró transzkripciós szabályozó, amelyet az oxidatív stressz aktivál, és kiválthatja a MarA expressziót (97, 105, 148). Néhány faj például az *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella* nemzetségekből további globális szabályozóval, a RamA-val rendelkezik, amely stratégiai szerepet játszik mind a porinok, mind az efflux expressziójának szabályozásában, közvetlenül vagy a MarA kaszkádon keresztül (97). A RamA-mediált változások csökkentik a colistin E-vel, a polymyxin B-vel és a humán kationos antimikrobiális peptiddel, az LL-37-tel szembeni érzékenységet (149). Érdekes, hogy a szabályozó gének mutációi (például a *mar* lokushoz kapcsolódó mutációk) egyidejűleg csökkentik a porin expresszióját és növelik az efflux pumpák aktivitását. Szinergista együttműködésük révén tehát fokozzák az antibiotikum rezisztencia mértékét (150). A MarR regulátor kinolon rezisztencia mutációi az *acrB* expresszió növekedését és az *ompF* expresszió csökkenését eredményezik, így tehát a porin csatornákon keresztüli csökkent kinolon beáramlás a megnövekedett efflux-szal együttesen kedvez a rezisztens fenotípus létrehozásának (14, 97). Bratu és munkatársai összefüggést figyeltek meg a *marA* és a *soxS* regulátorgének között, továbbá felismerték a *soxS* és az *acrAB* expresszió szignifikáns korrelációját is. Ennek az a jelentősége, hogy az *acrB* és a *marA* fokozott expressziója – a *gyrA*-ban lévő mutáció megléte mellett – hozzájárul a fluorokinolon-rezisztencia kialakulásához (151).

Egy 2013-as tanulmány szerint egy másik AraC-szabályozó, a *rara* expressziója szintén hozzájárul a multirezisztens fenotípus kialakulásához. A *ramA* fokozott expressziója az *E. cloacae* izolátumok között megnövekedett *rara* és *oqxA* expresszióval társítható, továbbá a tigeiklin rezisztencia kialakulásában is szerepet játszik (152).

Ezen felül kimutatták, hogy néhány olyan kétkomponensű rendszer (two components system, TCS), mint az OmpR-EnvZ, szintén kulcsszerepet játszik a porin expressziójának szabályozásában. A *micF* gén az *E. coli* és rokon baktériumokban található stresszválaszgén, amely poszttranszkripciós módon szabályozza az *ompF* külső membrán porin gén expresszióját (97, 153).

A beáramlás és az efflux összehangolt működése közvetlenül és hatékonyan szabályozza az antibakteriális szerek intracelluláris felhalmozódását. Fontos szempont,

hogy az antibakteriális molekulák felhalmozódása (a MIC értéknek megfelelő küszöb alatt) elősegítheti a rezisztencia további mechanizmusainak kialakulását és megszerzését; mivel targetmutációt, enzimtermelést (pl. β -laktamázok, acetiltranszferáz stb.) válthat ki, illetve hozzájárulhat az multirezisztens fenotípus kialakításához és fokozásához (154, 155).



7. **ábra.** A rezisztencia mechanizmus és reguláció sematikus ábrája. A szabályozás különböző szintjei. A transzkripciós és transzlációs szinteket különböző faktorok vezérik (i) [kétkomponensű rendszerek (TCS), pl. EnvZ / OmpR], globális szabályozók (RamA, MarA, SoxS) és lokális szabályozók (az AcrR az efflux pumpák és OmpX a porinok esetén). A trigger metabolitok akkumulációja intracellulárisan lokális vagy más regulátorok által szintén kiválthatja az expressziót (MicF, MicC: a porin mRNS stabilitását szabályozó kis interferáló RNS-ek) (ii) chaperonok és membránfaktorok (Omp35, Omp36: porinok; AcrAB – TolC család: efflux pumpák). IN: bakteriális citoplazma; OUT: külső közeg (97).

A környezeti feltételek befolyásolják a *qnr* gének expresszióját. Az alacsony hőmérsékleten alkalmazkodni képes *Shewanella algae qnrA* génjének expresszióját a hideg sokk akár nyolcszorosára növelheti, míg a *qnrB* allélek expressziója 9-szeresére fokozódik DNS-károsító szerek, például ciprofloxacín vagy mitomycin expozíció esetén. Az AcrAB-TolC komplex az epe sókkal szemben is rezisztenciát mutat, sőt expresszióját

a gyomor-bél traktusban epesók indukálják, ami arra utal, hogy ez a sajátság megnöveli az *E. coli* szaporodási képességét a természetes élőhelyén (14, 156).

1.7. Nemzetközi magas kockázatú klónok

Az antibiotikum rezisztencia mikrobiális evolúciójának két legfőbb mozgatórugója a genetikai variabilitás és az antibiotikum szelekciós hatása. A variabilitást a random mutációk biztosítják, változást idézve elő a populáció abundanciájában, míg a szelekciót az antibiotikum jelenléte váltja ki (157). A baktériumok bizonyos mértékben rugalmasak a mutációs „stratégia” megválasztásában. Ha a mutációs frekvencia túl magas, az a káros mutációk felhalmozódása révén az életképesség csökkentéséhez vezet. Sikeres génvariáció esetén multirezisztens klónok szelekciója valósul meg. A sikeres klónoknak tehát - ahogy azt az előbbiek is láttuk -, képesnek kell lenniük olyan mutációk kialakítására, amelyek magas szintű rezisztenciát biztosítanak bizonyos antibiotikumokkal szemben anélkül, hogy a fitnessüket nagymértékben veszélyeztetnék (55, 56, 92).

Az antibiotikumok észszerűtlen, túlzott mértékű használata mellett érdemes kiemelni az állatgyógyászat szerepét is a rezisztencia terjedésében, a magas kockázatú klónok szelekciójában, és az általuk okozott nozokomiális infekciók növekvő tendenciát mutató esetszámában. A gyakran preventív célzattal, esetleg hozamfokozóként használt antibiotikumok az állatok vizeletével, székletével kiválasztódnak, ami alapot teremt a környezetben (talajban, talajvízben, trágyában) való fennmaradásuknak, humánökológiai problémát eredményezve. Az antibiotikumok eltávolítják az érzékeny versenytársakat, és a természetes szelekció eredményeként teret engednek a rezisztens baktériumok szaporodásának (6, 158-160). Az antibiotikumok szelekciós nyomása végsősoron globális multirezisztenciához vezet. A multirezisztens magas kockázatú klónok között az *Enterobacteriaceae* család képviselői kiemelt jelentőséggel bírnak, ami az ESKAPE csoportba történő besorolásuk alapját is képezte. A magas kockázatú klónok bizonyos adaptív tulajdonságokat szereztek, amelyek növelik patogenitásukat és túlélési képességeiket, melyet az antibiotikumokkal szembeni rezisztencia determinánsok megszerzése kísér (30, 56, 161).

Baquero és munkatársai szerint egy klónt akkor minősíthetünk magas kockázatúnak, ha a következő kritériumrendszer pontjai igazak:

- (i) globális eloszlást mutat,
- (ii) különféle antimikrobiális rezisztenciagént hordoz
- (iii) tartós kolonizációs képességgel, perzisztenciával rendelkezik (> 6 hónap),
- (iv) rendelkezik a gazdaszervezetek közötti hatékony transzmisszió képességével,
- (v) kiemelt patogenitással és fitnesszel bír, valamint
- (vi) képes súlyos és / vagy ismétlődő fertőzések kiváltására (162).

Az *E. coli* és *K. pneumoniae* klónok megjelenésének és terjedésének fontosságát az interneten fellelhető publikációk magas száma is érzékelteti. Az *E. coli* nagyklónok közül az ST38, ST69, ST131, ST155, ST393, ST405 és ST648, a *K. pneumoniae* klónjai közül pedig az ST11, ST14, ST15, ST37, ST101, ST147, ST258, ST336, ST340 és ST874 kiemelt jelentőségű (161-167). Számos egyéb, „potenciális” nagyklónról is beszámolnak, melyek egyre szélesebb körben jelennek meg.

Dolgozatomban – kísérleti eredményeim tükrében – a *K. pneumoniae* magas kockázatú klónjainak ismertetése kerül részletesebb bemutatásra.

1.7.1. A *Klebsiella pneumoniae* magas kockázatú klónjai

A *K. pneumoniae* nemzetközi magas kockázatú klónjai a leggyakoribb Gram-negatív kórokozók közé tartoznak. Évtizedek óta ismert, hogy a közösségben szerzett fertőzések mellett – mivel ezek a baktériumok kórházi környezetben gyorsan terjedhetnek –, számos nozokomiális járvány kitöréséért is felelőssé tehetők. Számos multirezisztens *K. pneumoniae* klón alakult ki, mellyel összefüggésben drámai módon megnövekedett a nozokomiális fertőzések prevalenciája is. A MDR azonban sokszor magában foglalja a „páncélszekrény” antibiotikumnak számító karbapenemekkel szembeni rezisztenciát is: *bla*_{KPC-2}-vel és a *bla*_{KPC-3}-mal rendelkező *K. pneumoniae* ST258 izolátumokat világszerte azonosítanak, mely további problémaként jelenik meg a *Klebsiella* nagyklónok által okozott fertőzések kezelési lehetőségeinek tekintetében. Ezzel szemben a *K. oxytoca* betegápolási környezetben ritkábban okoz fertőzést (45, 168-170). A multirezisztens *K. pneumoniae* különféle kromoszomális és plazmidon kódolt rezisztencia-mechanizmusokra tesz szert az általánosan alkalmazott antibiotikumokkal szemben. Mivel kromoszomálisan kódolt SHV-t termel, természetes rezisztenciával rendelkezik az aminopenicillinekkal és a karboxipenicillinekkal szemben (171). Genomszekvenciájukban leggyakrabban a *bla*_{SHV-1} vagy *bla*_{SHV-11} géneket azonosítják; a

legtöbb plazmidon kódolt AmpC-típusú β -laktamáz (pAmpC) gén kromoszomális eredetű (172, 173). A klinikai izolátumokban leggyakrabban azonosított rezisztencia mechanizmusok között megtalálható az ESBL, a pAmpC, a PMQR gének által kódolt mechanizmusok, az aminoglikozid-módosító enzimek (aminoglycoside-modifying enzymes, AME), a 16S rRNS-metil-transzferáz, valamint mindinkább a karbapenemáz enzimek (174-177). Az ESBL variánsok közül világszerte a CTX-M-15 és CTX-M-14 a legelterjedtebb (178). A *K. pneumoniae*, *Salmonella spp.* és a *P. mirabilis* nem rendelkezik kromoszomális AmpC-vel, ezt a rezisztenciát a plazmid által kódolt AmpC cefalosporinázok közvetítik (179). A különféle pAmpC β -laktamáz-típusok földrajzi megoszlása azt mutatja, hogy az *Enterobacteriaceae* családban a CMY-2 típus a leggyakoribb, különösen Európában (180). A rezisztencia determinánsok (energetikailag kedvező) felhalmozása hozzájárul a globális MDR terjedéséhez (56). Következésképpen a plazmid által kódolt antimikrobiális rezisztencia gének fokozott diverzitása megkönnyíti ezen klónok terjedését, jelentős terápiás nehézséget okozva.

A multirezisztens *K. pneumoniae* törzsek jellemzően a fent említett szekvenciátípusokhoz tartoznak. Ezek tehát olyan magas kockázatú nemzetközi klónok, amelyeket a nosokomiális fertőzésekben a leggyakrabban izolálják (161-167). A felsorolt klónok közül az ST258 egy hibrid klón, amelyet az ST11 és ST442 közötti rekombinációs esemény hozott létre (161). A nemzetközi, magas kockázatú *K. pneumoniae* ST11 megjelenését világszerte észlelték, mint sikeres, gyakran karbapenemáz-termelő kórokozót, amelyhez fontos ko-rezisztencia és virulencia faktorok kapcsolódnak (163, 181). A CC258 (klonális komplex) tagja, amelybe az ST258 és annak (az ST11-en kívüli) egyéb SLV-i („single locus variant”, egyetlen lókuszt variáns), az ST340 és az ST512 tartoznak. A *bla*_{KPC}-t eddig több mint 100 különböző ST-ban detektálták, azonban pandémiát elsősorban a CC258 tagjai okoznak (161, 165). Az ST11 világszerte terjedő karbapenem rezisztenciáját (VIM, NDM és KPC-termelés) számos közlemény alátámasztja (174, 182-185).

1.7.2. A *Klebsiella pneumoniae* ST307, mint potenciális magas kockázatú nemzetközi klón

Az utóbbi években új antibiotikum-rezisztens klónok jelentek meg, melyek között figyelemre méltó a – terjedését illetően növekvő tendenciát mutató – KPC-termelő *K.*

pneumoniae ST307, mely megjelenését elsőként az Egyesült Államokban detektálták, eredetileg azonban a CTX-M-15 termelése miatt került a figyelem középpontjába (186). Később a klón számos országban való megjelenéséről beszámoltak, köztük Olaszországban, az Egyesült Királyságban, Kolumbiában, Pakisztánban, Marokkóban, Koreában, Tunéziában, Kínában és Szerbiában (187).

Kutatások kimutatták, hogy a fluorokinolon rezisztens nem magas kockázatú klónok a DNS-giráz vagy topoizomeráz IV-t kódoló gének QRDR-jában vagy „nem-szerin” mutációt, vagy csak a kedvező szerin mutációk egyikét hordozzák (91, 188). Kórházi körülmények között, ahol a fluorokinolonokat széles körben alkalmazzák, a sikeres „életképes” klónok kiszelektálódnak, majd elterjednek, ami lehetővé teszi számukra a globális dominancia elérését. A széles spektrumú β -laktamáz termelő *K. pneumoniae* klónváltásait is a fluorokinolon rezisztenciával összefüggő eltérő életképesség csökkenés szabja meg; ez a kapacitás növeli a klónok terjedési lehetőségeit (91, 92, 161, 188).

A teljes genom szekvenálás (WGS) hozzájárul a kórokozók klónváltásában meghatározó szereppel bíró markerek feltérképezéséhez. Kutatásunk során a WGS által közelebb kerülhettünk a magas kockázatú *K. pneumoniae* ST11 klón, valamint az ST307 potenciális nagyklón ezen markereinek (kromoszóma mutációk, rezisztenciagének) megismeréséhez.

1.8. Rezisztencia plazmidok

Egy 1983-ban publikált tanulmány szerint, a konjugációs plazmidok megjelenését nem az antibiotikumok széles körű használata idézte elő, hanem a mikrobiális evolúció egy korábbi termékeként alakultak ki. A baktériumok a már meglévő plazmidokba építették be a rezisztenciát biztosító géneket, amelyek replikációjának és terjedésének háttérében viszont már az antibiotikum expozíció áll (189).

A *K. pneumoniae* genomok sokfélesége elsősorban a mobilis genetikai elemeknek köszönhető, amelyek gyakran horizontális génátvitel útján cserélődnek a baktériumok között, ideértve a plazmidokat, az ICE-ket és ISE-ket is (190). Az *Enterobacteriaceae* családban a plazmid által kódolt rezisztencia terjedése globális méretet öltött, elsősorban PMQR, 16S-RMTase és karbapenemáz gének plazmid mediált terjedését detektálták (176, 191, 192). A plazmidok replikációs origójuk alapján inkompatibilitási csoportokra

sorolhatók, mellyel a plazmidok rokonsági kapcsolatát tárhatjuk fel. Az origójuk alapján nem tipizálható plazmidokat a „non-typeable” kategóriába soroljuk. A széles gazdaspektrumú plazmidok (pl. IncA/C, IncL/M és IncN) ritkán fordulnak elő az *E. coli* ST131 és *K. pneumoniae* ST258 nagyklónokban. Az IncF-hez tartozó, eltérő replikontípusokkal rendelkező rezisztencia plazmidok (pl. FIA, FIB és FII) azonban képesek rezisztencia géneket megszerezni, illetve terjedni az *Enterobacteriaceae*, különösen a fajon belüli klónok között. A széles gazdatartományú plazmidok könnyen átvihetők a különböző fajok között, míg a szűk gazdatartományú plazmidok általában a fajokra korlátozódnak. A magas kockázatú klónokban túlnyomórészt a szűk spektrumú plazmidok [kifejezetten az IncF bizonyos β -laktamázokkal (pl. *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{KPC-2} és *bla*_{KPC-3})] jelenléte észlelhető, melyeket „járványrezisztencia-plazmidoknak” nevezték el (161, 193, 194).

A nyolc integron osztály közül az 1., a 2., és a 3. osztályt hozták összefüggésbe az antimikrobiális rezisztenciával. Az antibiotikum rezisztenciáért felelős, plazmidon kódolt gének szabad mozgása központi szerepet játszik a rezisztencia gyors ütemű globális növekedésében, melyben az IncF és az 1. integron osztály domináns szerepet tölt be (195).

Az ESBL gének és más rezisztencia determinánsok ugyanazon plazmidokon való együttes előfordulásáról gyakorta beszámolnak; ilyen értelemben a PMQR gének jelenlétét társították a *bla*_{CTX-M} génekkel, az aminoglikozidokkal, valamint a tetraciklinnel szemben rezisztenciát biztosító génekkel is (24). Számos tanulmány igazolja, hogy *qnr* és ESBL determinánsok átvitele közös konjugábilis plazmidon történik (132, 196). A *qnrA*-val és a *qnrB*-vel ellentétben a *qnrS* gének nem kapcsolódnak az ISCR1-hez (Insertion Sequence Common Region). A legtöbb *qnrS* plazmid viszonylag kisméretű és nem konjugatív jellegű, ellentétben a *qnrA* és *qnrB* plazmidokkal (11).

Az ST258 nagyklónra, amely tartalmazza az ICEKp258.2-t, kifejezetten jellemző az IncF plazmidokhoz köthető KPC gén hordozása, míg az ST11 klónnal összefüggésben, amely nem rendelkezik ICEKp258.2-vel, különböző karbapenemáz kódoló gén (KPC, VIM, IMP, NDM és OXA-48) hordozása, illetve plazmidok széles skálája említhető meg (161).

2. Célkitűzések

A Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetének egyik fő profilja a Gram-negatív kórokozók antibiotikum rezisztencia mechanizmusainak kutatása, illetve ezen mechanizmusok genetikai hátterének feltérképezése. Az elmúlt 2 évtizedben számos, eddig nem ismert antibiotikum rezisztencia gén megjelenéséről és terjedéséről születtek mind hazai, mind nemzetközi publikációk, melyek a különféle rezisztencia mechanizmusokra szert tevő, ugyanakkor kedvező fitnesszel rendelkező Gram-pozitív és Gram-negatív törzsek széleskörű terjedéséről, mind magasabb prevalenciájáról számolnak be. Nem meglepő módon a nozokomiális infekciók előfordulása szintén világszerte növekvő tendenciát mutat, melyek kórokozói nem ritkán ezen multirezisztens, genetikailag sikeres törzsek, és amelyek terápiája hatalmas terhet ró a betegellátó intézményekre. A multirezisztens kórokozók széleskörű terjedése komoly közegészségügyi kihívást is jelent, mivel az általuk okozott fertőzések magasabb kockázattal, hosszabb kórházi tartózkodással és az egészségügyi költségek növekedésével járnak. Mind a nemzetközi szinten terjedő klónokkal, mind a sporadikusan előforduló klónokkal folytatott kutatások rendkívül aktuálisak és szükségszerűek.

Mindezek tükrében kutatásunk középpontjába a 2010-2014 között intenzív osztályon kezelt betegek véráramfertőzéseiből izolált *E. coli*, *K. pneumoniae*, valamint *K. oxytoca* törzsek rezisztenciájának molekuláris jellemzését helyeztük. Kutatásunkat az alábbi szempontrendszer szerint építettük fel:

1. A SE LMI KMDL (Semmelweis Egyetem Labor Medicina Intézet, Központi Mikrobiológiai Diagnosztikai Laboratórium) által rendelkezésünkre bocsátott 103 *Enterobacteriaceae* családba tartozó ESBL-termelő törzs további fenotípusos karakterizálása (különböző antibiotikumokkal szembeni antibiotikum érzékenység meghatározása).
2. A törzsek genotípusos karakterizálásának első lépéseként célunk volt a törzsek által hordozott PMQR determinánsok felderítése PCR módszerrel.
3. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok során kapott MIC értékek, valamint a PCR során kapott eredmények alapján kutatásunk fókuszpontját – az általunk meghatározott kritériumrendszer szerint alkotott három csoportba tartozó – öt törzs további genotípusos vizsgálatára szűkítettük. Célunk volt ezen törzsek

szekvencia-, illetve pulzotípusának meghatározása, teljes genom szekvenálása, valamint bizonyos PMQR gének (*qnr*, *oqxA*, *oqxB*) expressziós szintjeinek meghatározása.

4. Összefüggések felderítése az öt kiválasztott törzs fluorokinolon MIC értékei, a PMQR determinánsok jelenléte, illetve azok expressziós szintjei között; valamint ezen adatok összevetése a teljes genom szekvenálás során kapott szekvencia adatokkal. Munkánk során a QRDR-ban (*gyrA*, *gyrB*, *parC* és *parE*) fellelhető mutációk, aminosavszerű változások azonosítását is elvégeztük, mellyel teljes képet kaphatunk az adott klón antimikrobiális rezisztenciájáról, genetikai sikeréről, így elterjedésének okairól is.
5. A kapott eredmények összevetése hazai és nemzetközi adatokkal.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Baktériumtörzsek

Vizsgálataink során 103, *Enterobacteriaceae* családba tartozó izolátummal dolgoztunk, melyeket a SE LMI KMDL bocsátotta rendelkezésünkre.

3.2. A baktériumtörzsek fenotípusos vizsgálata

3.2.1. A baktériumtörzsek identifikálása

A negyvenkilenc *E. coli*, ötvenhárom *K. pneumoniae*, valamint egy *K. oxytoca* törzset 2010 és 2014 közötti intervallumban, a Semmelweis Egyetem klinikáinak intenzív osztályain kezelt betegek hemokultúrájából izolálták. Az izolátumok species szintű identifikálása MALDI-TOF/MS (Matrix assisted laser desorption ionization, Mátrixasszisztált lézerdeszorpció-ionizációs tömegspektrométer) (Bruker Daltonics, Bréma, Németország) módszer segítségével történt.

A törzseket a további felhasználásig 20%-os glicerint tartalmazó BHI táplevesben (Brain Heart Infusion broth, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) -80 °C -on tároltuk. A fenotípusos vizsgálatok során minden alkalommal meggyőződünk a törzsek telepmorfológiájának színtenyészetéről

3.2.2. A kiterjedt spektrumú β -laktamáz termelésének vizsgálata

Az izolátumok ESBL szűrését kettős-korong diffúziós teszttel (double-disk synergy test, DDST) vizsgáltuk. Ennek során a ceftazidim, cefepim és cefotaxim tartalmú korongokat egymástól 20-30 mm távolságban helyeztük el a központi amoxicillin/klavulánsav (20/10 μ g) tartalmú korongtól. Pozitív reakció esetén a 24 órás 37 °C-on történő inkubációs idő lejártá után a β -laktám korongok körüli gátlási zóna „kulcslyuk” formájú torzulását tapasztaljuk, mely bizonyítja a vizsgált törzs ESBL-termelő képességét.

3.2.3. Antibiotikum rezisztencia vizsgálatok

A SE LMI KMDL Kirby-Bauer korongdiffúziós módszer segítségével meghatározta mind a 103 izolátum imipenemmel, meropenemmel, ertapenemmel,

ciprofloxacinnal, sumetrolimmal, gentamicinnel és tobramicinnel szembeni érzékenységét.

A törzsek további antibiotikum érzékenységi vizsgálata mikrodilúciós módszerrel, a MIC értékek meghatározásával történt. Vizsgáltuk a törzsek ciprofloxacinnal (Fresenius Kabi Hungary Kft., Budapest, Magyarország), levofloxacinnal (Teva Gyógyszergyár Zrt., Debrecen, Magyarország) valamint moxifloxacinnal (Bayer Hungária Kft., Budapest, Magyarország) szembeni érzékenységét.

Az antibiotikum érzékenység mikrodilúcióval történő vizsgálatát a Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS) nemzetközi ajánlásai alapján végeztük el. A vizsgálat során minden baktériumtörzsből fiziológiás sóoldatban 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) sűrűségű baktériumszuszpenziót készítettünk denzitométer (BioSan, Riga, Lettország) segítségével. Táplevesként Mueller-Hinton (MH) táplevest (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) használtunk. A vizsgálni kívánt antibiotikumokból készült törzsoldatok kiindulási koncentrációját minden esetben úgy választottuk meg, hogy a várt MIC értéket meghaladja. A vizsgálathoz használt 96 lyukú mikrotitráló lemez minden welljében a végtér fogat 100-100 μ l volt. A lemez két utolsó oszlopát (11. és 12. oszlop) táptalaj kontrollként (a MH esetleges kontaminációjának felderítése céljából), valamint növekedési kontrollként (az adott baktériumtörzs antibiotikum mentes közegben történő növekedésének detektálása céljából) használtuk. Az elkészített antibiotikum törzsoldatok mindegyikét az 1. oszloptól kezdődően a 10. oszlopig többszörös pipetta segítségével mértük fel, tova futó felező hígításban. A MH kontrolloszlopán kívül, minden wellbe 10-10 μ l baktériumszuszpenziót inokuláltunk, majd 37°C-on 18 órán keresztül inkubáltuk.

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok interpretálásakor a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) aktuálisan hatályban lévő határértékeit vettük figyelembe (www.eucast.org).

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok során kontrollként az *E. coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922, illetve a *K. pneumoniae* ATCC 700603 törzset használtuk.

3.3. A baktériumtörzsek genotípusos vizsgálata

3.3.1. A plazmid-mediálta kinolon rezisztencia gének vizsgálata polimeráz láncreakcióval

A törzsek PMQR (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* és *oqxAB*) géneinek jelenlétét PCR reakcióval ellenőriztük. A mikrobiológiai kutatások során a PCR egy általánosan alkalmazott módszer, többek között bakteriális rezisztenciagének amplifikálására, majd gélelektroforézissel történő azonosítására.

A reakció első lépése a DNS izolálás eljárása volt, mely mind az *E. coli*, mind a *Klebsiella spp.* törzsek esetén azonos módon történt. A MH agarlemezekről 1-1 telepet 400 µl desztillált vízben szuszpendáltuk, majd 15 percre a 100 °C-ra melegített Thermoblock-ba (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) helyeztük. A felfőzött szuszpenziót 13000 rpm-en 15 percen keresztül centrifugáltuk (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), hogy az eljárás során keletkezett bakteriális sejttörmelék és a PCR reakcióban használandó, felülúszóban lévő templát DNS elváljon egymástól.

A reakcióelegy összetétele 30 µl-es végtérfogatra vonatkoztatva minden minta esetén a következő volt: 15 µl RedTaq ReadyMix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 11 µl desztillált víz, 2 µl DNS templát, 1 µl forward primer (10 pmol) (IDT Inc., Coralville, IA, USA), 1 µl reverse primer (10 pmol) (IDT Inc., Coralville, IA, USA).

A PCR reakció során a PMQR gének detektálására használt primerek (oligonukleotidok) adatait az 1. táblázat szemlélteti. A primereket a szerzők által kidolgozott formában, e táblázatban feltüntetett referenciák alapján alkalmaztuk. A különböző PCR reakciók során alkalmazott hőmérsékletprofilokat a 2. táblázat mutatja be.

Az amplikonok kimutatását elektroforetikus rendszer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével 120 V feszültségen végeztük, melyhez 0.8%-os agaróz gél (Agarose) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 1x TEA (Tris-EDTA- „glacial acetic acid”; 2M TRIS, 1M EDTA, 28,55 ml jégcet) puffert használtunk. A PCR amplikonokból 10-10 µl-t, a 100 bp-os molekulású markerből (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 3 µl-t pipettáztunk a gél megfelelő zsebeibe. 30 perc elektroforetizálás után a géleket fénytől védett módon SYBR® Green I. interkalációs nukleinsav festékoldatban

(TS Labor Kft., Budapest, Magyarország) tartottuk kb. 50 percig. A detektálás UV fényben történt, az eredményt digitális fényképezőgép segítségével rögzítettük.

1. táblázat. A PCR reakció során felhasznált primerpárok listája.

Gének	Oligonukleotid szekvencia (5'-3')	Amplikon mérete (bp)	Referencia
<i>qnrA</i> -F <i>qnrA</i> -R	ATTTCTCACGCCAGGATTTG GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	516	(197)
<i>qnrB</i> -F <i>qnrB</i> -R	ATGACGCCATTACTGTATAA GATCGCAATGTGTGAAGTTT	469	(124)
<i>qnrS</i> -F <i>qnrS</i> -R	ACGACATTCGTCAACTGCAA TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	417	(197)
<i>qnrC</i> -F <i>qnrC</i> -R	GGGTTGTACATTTATTGAATC TCCACTTTACGAGGTTCT	447	(125)
<i>qnrD</i> -F <i>qnrD</i> -R	CGAGATCAATTTACGGGGAATA AACAAGCTGAAGCGCCTG	582	(126)
<i>aac(6')-Ib-cr</i> -F <i>aac(6')-Ib-cr</i> -R	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGT	482	(115)
<i>oqxA</i> -F <i>oqxA</i> -R	CTCGGCGCGATGATGCT CCACTCTTCACGGGAGACGA	392	(117)
<i>oqxB</i> -F <i>oqxB</i> -R	TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC CTCGGCCATTTTGGCGCGTA	512	(117)
<i>qepA</i> -F <i>qepA</i> -R	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG CTTCCTGCCCGAGTATCGTG	199	(116)

2. táblázat. A PCR reakciók hőprofiljai.

Primerek	Kezdő denaturáció	Ciklusok száma	Denaturáció	Anneláció	Elongáció	Végső elongáció	Hűtés
<i>qnrA</i> -F <i>qnrA</i> -R	95°C 300 s	32	94°C 45 s	53°C 45 s	72°C 60 s	72°C 300 s	4°C ∞
<i>qnrB</i> -F <i>qnrB</i> -R	95°C 300 s	32	94°C 45 s	53°C 45 s	72°C 60 s	72°C 300 s	4°C ∞
<i>qnrS</i> -F <i>qnrS</i> -R	95°C 300 s	32	94°C 45 s	53°C 45 s	72°C 60 s	72°C 300 s	4°C ∞
<i>qnrC</i> -F <i>qnrC</i> -R	95°C 300 s	30	94°C 30 s	50°C 30 s	72°C 30 s	72°C 600 s	4°C ∞
<i>qnrD</i> -F <i>qnrD</i> -R	94°C 300 s	30	94°C 60 s	50°C 60 s	72°C 60 s	72°C 600 s	4°C ∞
<i>aac(6')-Ib-cr</i> -F <i>aac(6')-Ib-cr</i> -R	95°C 300 s	34	94°C 45 s	55°C 45 s	72°C 45 s	72°C 300 s	4°C ∞
<i>oqxA</i> -F <i>oqxA</i> -R	95°C 600 s	34	94°C 45 s	57°C 45 s	68°C 60 s	72°C 600 s	4°C ∞
<i>oqxB</i> -F <i>oqxB</i> -R	95°C 600 s	32	94°C 45 s	64°C 45 s	72°C 60 s	72°C 600 s	4°C ∞
<i>qepA</i> -F <i>qepA</i> -R	96°C 60 s	30	96°C 60 s	60°C 60 s	72°C 60 s	72°C 300 s	4°C ∞

3.3.2. A szekvenciatípus meghatározása multilókusz-szekvencia tipizálással

Előzetes kutatási eredményeink alapján, az alábbi kritériumrendszer szerint választottunk ki öt törzset további vizsgálatok elvégzésére:

- I. *qnr* gént hordozó törzsek, mely nem vad típusú fluorokinolon MIC értékekkel rendelkeznek
- II. *qnr* gént hordozó, magas fluorokinolon MIC értékekkel rendelkező törzsek
- III. Több PMQR gént hordozó, magas MIC értékeket mutató törzsek

A továbbiakban kutatásunk fókuszpontjában az az öt törzs állt (4 *K. pneumoniae* és 1 *K. oxytoca*), melyeket ezen kritériumrendszer alapján választottunk ki, és melyeket a PCR-en kívül további molekuláris vizsgálatoknak vetettük alá.

A multilókusz-szekvencia tipizálás (MLST) során a törzsek bizonyos konzervált génszakaszait, ún. housekeeping (háztartási) génjeit amplifikáljuk PCR reakcióval, majd tisztítást követően azok egy adott, specifikus szakaszát megszekvenálják. Az eredményül kapott allélmintázat alapján a törzseket szekvencia típusokba sorolhatjuk. A háztartási gének amplikonjait QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével tisztítottuk meg, a szekvenálást a gödöllői BIOMI Kft. végezte. A *Klebsiella spp.* hét háztartási génjének funkcióját, valamint az ezen génszakaszokat kijelölő primerek szekvenciáját a 3. táblázat foglalja össze.

A törzsek MLST vizsgálatát a Diancourt és munkatársai által 2005-ben közzétett publikáció alapján végeztük (198).

3. táblázat. Az MLST során felhasznált primerpárok listája (198).

Gén	Funkció	Primer	Primer szekvencia (5'-3')	Méret (bp)
<i>rpoB</i>	RNS polimeráz B β -alegység	rpoB-F rpoB-R	5'-GGCGAAATGGCWGAGAACCA-3' 5'-GAGTCTTCGAAGTTGTAACC-3'	501
<i>infB</i>	Transzláció iniciáló faktor 2	infB-F infB-R	5'-CTCGCTGCTGGACTATATTCG-3' 5'-CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC-3'	318
<i>mdh</i>	Almasav-dehidrogenáz	mdh-F mdh-R	5'-CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG-3' 5'-CCGTTTTTCCCAGCAGCAG-3'	477
<i>pgi</i>	Foszfoglükóz-izomeráz	pgi-F pgi-R	5'-GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC-3' 5'-CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT-3'	432
<i>phoE</i>	Foszforin E	phoE-F phoE-R	5'-ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG-3' 5'-TGATCAGAAGCTGGTAGGTGAT-3'	420
<i>gapA</i>	Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz	gapA-F gapA-R	5'-TGAAATATGACTCCACTCACGG-3' 5'-CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT-3'	450
<i>tonB</i>	Periplazmatikus energia transzducer	tonB1-F tonB2-R	5'-CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT-3' 5'-ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG-3'	414

Mivel az MLST egy fajon belül több gén (lokusz) szekvenciaadatait hasonlítja össze, ezért képes DNS-szinten olyan változásokat észlelni, amelyek nem mutathatók ki fenotípusos megközelítésekkel. A hagyományos molekuláris tipizálási módszerekkel ellentétben az MLST standardizálható, aminek egyik legfőbb előnye, hogy a nemzetközi szinten elérhető internetes adatbázis lehetőséget biztosít az adatok megosztására, filogenetikai és epidemiológiai kapcsolatrendszer feltárására. Másfelől rendkívül könnyen reprodukálható módszer, ami nem igényel speciális reagenseket, és mivel PCR módszeren alapul, nem igényelnek közvetlen hozzáférést élő baktérium izolátumokhoz. A módszer kifejlesztése Maiden és munkatársai (1998), valamint Spratt (1999) nevéhez fűződik, akik patogén baktériumok tipizálására dolgozták ki ezt az eljárást (199, 200).

3.3.3. Bakteriális genomszekvencia-tipizáló adatbázis

A multirezisztens baktériumok által okozott kórházi fertőzések halmozott előfordulása ösztönözte Zhi Ruant és Ye Fengt a bakteriális genomszekvencia-tipizáló adatbázis (Bacterial Whole Genome Sequence Typing database, BacWGSTdb) kifejlesztésére, ami a baktériumok genomszekvencia adatai alapján gyors és pontos klasszifikálás által lehetőséget ad a fertőzés forrásainak felkutatására (201). Mivel a teljes genom szekvenálás a molekuláris epidemiológiai gyakorlat egyik rutin módszerévé vált,

ugrásszerűen megemelkedett az elérhető genomszekvenciák mennyisége. A BacWGST adatbázis az MLST séma populációstruktúrája alapján hierarchikus adatstruktúrát fogad el. A felhasználók feltöltik az előre összeállított genomszekvenciákat az adatbázisba, a rendszer pedig a baktériumok genotipizálásának funkcionalitását kínálja mind a hagyományos MLST, mind az egész genom szintjén. A BacWGSTdb célja, hogy megoldást biztosítson az epidemiológiai esethalmozódások filogenetikai elemzésére és úttörő szerepet játsszon a klinikai mikrobiológiai kutatások repertoárjában.

Az általunk is használt többszörös genom elemzést arra használják, hogy a filogenetikai rokonság meghatározható legyen a felhasználó által feltöltött genomszekvenciák között, a genom MLST szekvenciaadatok SNP (single-nucleotide polymorphism, egyponos-nukleotid polizomorfizmus) analízisének kontextusában. Az antimikrobiális rezisztencia és a virulencia gének predikciója szintén integrálódott ebben az alkalmazásban (201). Munkánk során a genomszekvenciák analizálását a HS11286_CP003200_ST11 referencia genom kiválasztásával végeztük, a genomszekvenciákat FASTA formátumban töltöttük fel a BacWGSTdb hivatalos honlapján (<http://bacdb.org/BacWGSTdb/>).

A felhasználók a nyilvános adatbázis által információhoz juthatnak, hogy mely izolátumok állnak filogenetikai szempontból közel a vizsgált izolátumokhoz, kiegészítve klinikai információikkal, mint pl. gazdaszervezet, izolációs forrás, betegség, gyűjtési idő és földrajzi elhelyezkedés. Ily módon a BacWGSTdb gyors és kényelmes platformot kínál a világméretű felhasználók számára a különféle klinikai mikrobiológiai kérdések megoldására, pl. a baktériumok kórokozóinak nyomon követésére (201).

3.3.4. A pulzotípus meghatározása pulzáltatott-mezejű gélelektroforézissel

A pulzáltatott-mezejű gélelektroforézis (PFGE) a törzsek klonális kapcsolatát, genetikai rokonságát vizsgálja. A vizsgálatokhoz a CDC (Centers for Disease Control and Prevention) standardizált PFGE protokollját használtuk (202). A genomiális DNS izolálását követően a mintákat *Xba*I restrikciós endonukleázzal (Fermentas, ABI, Németország) emésztettük, majd a CHEF-DR II rendszeren (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) elvégeztük az emésztés által keletkezett makrorestrikciós fragmentumok elektroforetikus szeparálását. A dendrogramok és a cluster analízis „unweighted pair group method with arithmetic averages” (UPGMA) módszerrel készültek. A mintázatok

analizálása a Fingerprinting II Informatix Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével történt, a Dice hasonlósági koefficiens alkalmazásával.

Molekulasúly markerként a *Salmonella enterica* serotype Braenderup H9812 törzset használtuk (203). A mintázatokat a Tenover és munkatársai által 1995-ben leírtak alapján interpretáltuk (204). A törzseket akkor tekintjük klonálisan összetartozónak, ha a makrorestrikciós mintázatuk legalább 85%-os hasonlóságot mutat. Ebben az esetben a törzseket azonos pulzotípusba (PT) soroljuk.

A PFGE-t széleskörben alkalmazzák a baktériumok tipizálására, mivel más technikákhoz képest jó a diszkriminációs képessége, azonban általában nem alkalmas a térben és időben nem-összefüggő izolátumok összehasonlítására.

A PFGE módszert, illetve a kiértékelést az NNK-ban végeztük, Dr. Damjanova Ivelina vezetésével.

3.3.5. Az izolátumok vizsgálata teljes genom szekvenálással

Az Illumina (San Diego, CA, USA) készülékek a „Sequencing by Synthesis” (SBS) technológia felhasználásával, nagy pontosságú, nagy mennyiségű szekvenciaadatot szolgáltatnak megfelelően nagy read hosszal és kívánság szerinti lefedettséggel. A rendszerbe integrált vezérlő számítógép használatával a rendszer elvégzi a teljes adatelemzést. A számítógép végzi a „base calling és quality scoring” folyamatát. A rendszer képes kétirányú (paired-end) típusú leolvasások kivitelezésére. Előnye, hogy az adott DNS szakasz hossza ismert, azt is tudni lehet, hogy a két read milyen távolságra van egymástól; ezt a távolság információt pedig figyelembe kell venni a teljes szekvencia összeállítása során. A sorba rendezett és egymással átfedő szekvenciák összességét kontignak nevezzük. A MiSeq szekvenáló rendszer (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) kapcsolódhat az Illumina felhőalapú szolgáltatásához, a Basespace-hez, ahol az elérhető alkalmazások lehetővé teszik az olyan másodlagos adatértékelési lépések végrehajtását, mint a szekvencia illesztés, variáns azonosítás, annotálás, vizualizálás és adat interpretálás (205).

Munkánk során a 4 *K. pneumoniae* és 1 *K. oxytoca* törzs DNS extrakciója az UltraClean Microbial DNA Isolation Kittel (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) történt a gyártó utasításai alapján. Ezt követően a DNS könyvtárakat – szintén a gyártói utasításoknak megfelelően – a SureSelect QXT Library Prep Kit (Agilent Technologies,

Santa Clara, USA) felhasználásával állítottuk elő, melyek szekvenálását 250 bp paired-end módszerrel, Illumina MiSeq rendszeren hajtottuk végre a MiSeq v2 reagenskészlet alkalmazásával. Az Illumina NGS adatokra optimalizált „előfeldolgozás”, minőségi trimmelés FASTQ toolkit alkalmazással történt (206). A genom, azaz a szekvenciakontigok de novo összeszerelését a SPAdes Genome Assembler 3.13.0 segítségével végeztük (207).

Minden összeszerelt genomot – további analízis céljából – akkor fogadtunk el, ha teljesítette a következő minőségi kritériumok mindegyikét:

- (i) átlagos lefedettség > 30x
- (ii) N50 > 15.000 bp
- (iii) maximum kontighossz > 50.000 bp
- (iv) az összeszerelt genom mérete 5.000.000 és 6.500.000 bp közötti.

Az összeszerelt genomok – az izolátumok rezisztómjainak illetve plazmid replikontípusainak analizálása céljából feltöltésre kerültek a ResFinder (208) és PlasmidFinder (Center for Genomic Epidemiology, Dán Műszaki Egyetem, Lyngby, Dánia) (209) online bioinformatikai adatbázisokba. A teljes genom szekvenálást az NNK-ban Dr. Tóth Ákos végezte el.

3.3.6. Relatív génexpresszió vizsgálata kvantitatív polimeráz lánreakció módszerrel

A kvantitatív Real-Time PCR (qPCR) módszer lényege, hogy lehetővé teszi a PCR ciklusok során keletkező amplifikált termék valós idejű detektálását, mennyiségi meghatározását, génexpresszió analízisét. A módszer alapja, hogy a DNS festékek kötődésének, valamint a szekvencia-specifikus próbák fluoreszcens jelének detektálása minden ciklusban megvalósítható, ezáltal meg tudjuk határozni a DNS templát kiindulási mennyiségét.

Először felszaporításra kerül a PCR termék, amelyhez a polimerizációs lépésben hozzákötődik a kettősen jelölt próba. Az egyik jelölés a riporterként (R) szolgáló fluoreszcens festék (pl. FAM), azonban az általa kibocsátott fluoreszcens fényt a próbához kötött másik, ún. quencher (Q) fluoreszcens festék kioltja. A hibridizált próbát a Taq polimeráz elhidrolizálja, melynek következtében a kioltó festék eltávolodik a riporter festéktől, így annak fluoreszcenciája mérhető lesz.

A reakciót az ún. C_T (cycle threshold) érték meghatározásával értékelik, amely azt a ciklusszámot mutatja, ahol a jel eléri a detektálási küszöbértéket. Minél több a vizsgálati mintában a kimutatandó gén kópiaszáma, annál kisebb ciklusszámmal éri el a reakció a küszöbértéket, és fordítva. A kópiaszám logaritmusos fordítottan arányos a ciklusszámmal, így egy kalibrációs görbe felvétele után az ismeretlen minta kópiaszáma kiszámítható. Egy további kalibrációval a sejtszám és a C_T érték közötti összefüggés is meghatározható, ami lehetőséget nyújt a mintában lévő sejtszám becslésére.

A qPCR során célunk volt a különböző PMQR génekkel, illetve különböző fluorokinolon MIC értékekkel rendelkező törzsek génexpressziós szintbeli különbségeit meghatározni. Munkánk során a *qnr* gének (*qnrA1*, *qnrB1*, *qnrB4*), valamint az efflux pumpa gének (*oqxA* és *oqxB*) expresszióját hasonlítottuk össze.

A qPCR első lépéseként izoláltuk a törzsek RNS-ét RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével, a gyártó utasítása alapján. A qPCR-t Step One Real-Time PCR rendszeren (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA) végeztük el. A *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrB4*, *oqxA* és *oqxB* expressziós szintjét a kromoszomális *rpoB* háztartási gén expressziójával hasonlítottuk össze. Minden mintát triplikátumban vittünk fel a qPCR plate-re, a C_T értékek számításakor a három párhuzamos eredmény átlagát vettük figyelembe. A qPCR hőprofilját a következőképpen állítottuk be:

60 °C 30 mp; 50 °C 5 perc és 95 °C 10 perc; 40 ciklus [95 °C 15 mp és 60 °C 1 perc] 60 °C 30 mp.

Primer Express 3.0 szoftver (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével megterveztük a reakcióhoz szükséges primereket, valamint a 6-FAM és VIC festékkel jelölt specifikus próbákat. A qPCR során felhasznált primerek és próbák listáját a 4. táblázat tartalmazza.

Az eredményeket az alábbi képlet alapján kvantifikáltuk:

$$\Delta C_T = C_T(\text{target gén}) - C_T(\text{housekeeping gén})$$

A C_T (target gén) a célgén ciklusszáma, a C_T (housekeeping gén) a referencia gén ciklusszáma és a ΔC_T értéke megadja számunkra a referencia gén és vizsgált gén közötti különbségeket. Ezt követően az expresszióbeli különbség megállapítása a kettőnek az így nyert érték szerinti negatív hatványra emelésével történt:

$$2^{-\Delta C_T}$$

A képlet által megkapjuk, hogy a referencia génhez (*rpoB*) képest mekkora a vizsgált gének relatív expressziós szintje.

4. táblázat. A qPCR módszer során felhasznált primerpárok listája.

Gének	Primer szekvencia
<i>qnrA1-F</i>	5'-TTGAGTGACAGCCGTTTTTCG-3'
<i>qnrA1-R</i>	5'-GCAGCTGACAGTGGCTGAAG-3'
<i>qnrA1-P</i>	6-FAM-CTGCCGCTTTTATC-MGB
<i>qnrB1-F</i>	5'-GTGCGCTGGGCATTGAA-3'
<i>qnrB1-R</i>	5'-CGGAAATCTGCGCCTTGT-3'
<i>qnrB1-P</i>	6-FAM-TTCGCCACTGCCGC-MGB
<i>qnrB4-F</i>	5'-TGCGCTGGGAATCGAAA-3'
<i>qnrB4-R</i>	5'-CGCGAAAATCTGACCCTTGT-3'
<i>qnrB4-P</i>	6-FAM-TCGCCACTGCCGGG-MGB
<i>oqxA-F</i>	5'-GTCGACGGCTTACAAAAAGTGTT-3'
<i>oqxA-R</i>	5'-GCAACGGTTTTGGCGTTAA-3'
<i>oqxA-P</i>	6-FAM-ATGCCGGGTATGCC-MGB
<i>oqxB-F</i>	5'-CTGGATTTTCCGTCCGTTAAC-3'
<i>oqxB-R</i>	5'-TTGCCTACCAGTCCCTGATAGC-3'
<i>oqxB-P</i>	6-FAM-CTGCGCAGCTCGAA-MGB
<i>rpoB-F</i>	5'-GTCGCGGCTGAACAAGCT-3'
<i>rpoB-R</i>	5'-AACGGCCACTTCGTAGAAGATC-3'
<i>rpoB-P</i>	VIC-CTACGGCAGGTAACC-MGB

F, forward; R, reverse; P, próba; FAM és VIC, festék jelölések; MGB, minor groove binder

4. Eredmények

4.1. A baktériumtörzsek fenotípusos vizsgálatának eredményei

4.1.1. A baktériumtörzsek identifikálásának eredménye

Az izolátumok species szintű identifikálására szolgáló MALDI-TOF/MS módszer negyvenkilenc *E. coli* (47,6%), ötvenhárom *K. pneumoniae* (51,4%), és egy (1%) *K. oxytoca* törzset azonosított. *E. coli* és *K. pneumoniae* törzsek esetén a 2010-2014 közötti intervallum minden évéből származott izolátum, míg az egyetlen *K. oxytoca* minta a 2010-es évben került izolálásra. A törzskollekció évszám szerinti species szintű megoszlását az 5. táblázat szemlélteti.

5. táblázat. A vizsgált izolátumok species szintű megoszlása

Faj	Izolálási év				
	2010	2011	2012	2013	2014
	A törzsek száma (db)				
<i>E. coli</i>	9	4	12	12	12
<i>K. pneumoniae</i>	7	6	19	14	6
<i>K. oxytoca</i>	1	0	0	0	0

4.1.2. A kiterjedt spektrumú β -laktamáz termelés vizsgálatának eredménye

Az *Enterobacteriaceae* család ESBL-termelésének szűrésére alkalmazott DDST alapján mind a 103 törzs pozitívnak, azaz ESBL-termelőnek bizonyult. A β -laktámot tartalmazó korongok körül megjelenő gátlási zóna minden törzs esetében mutatta a jellegzetes „kulcslyuk” formát.

Irodalmi adatok szerint, amennyiben csökkentjük a távolságot a klavulánsavat és a 3. generációs cefalosporint tartalmazó korongok között 20 mm-re, akkor szignifikánsan javul a teszt érzékenysége (210). Az DDST ilyen módon történő megismétlése során mi is tapasztaltuk ezt a jelenséget: a gátlási zóna markánsabb kiszélesedését észleltük.

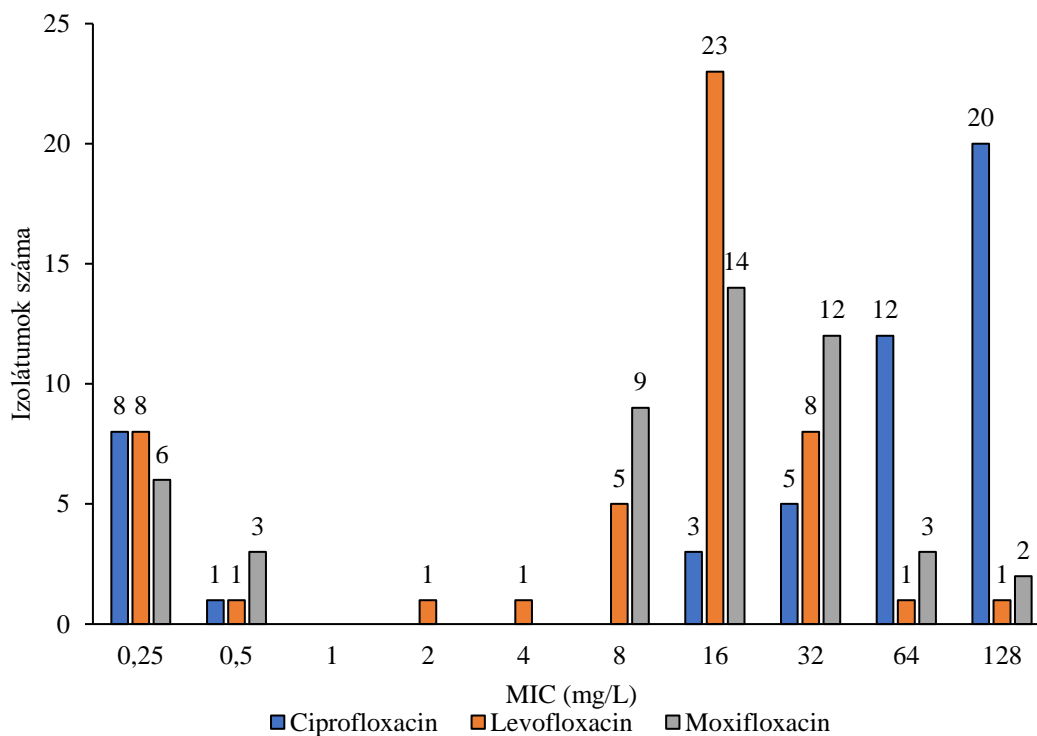
A kutatás megkezdésekor kifejezetten ESBL-termelő törzsek genotípusos karakterizálását tűztük ki célul. A törzsek ESBL-termelő képességének vizsgálatát tehát a SE LMI KMDL prelimináris szűrését követően végeztük el ismételten.

4.1.3. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálat eredménye

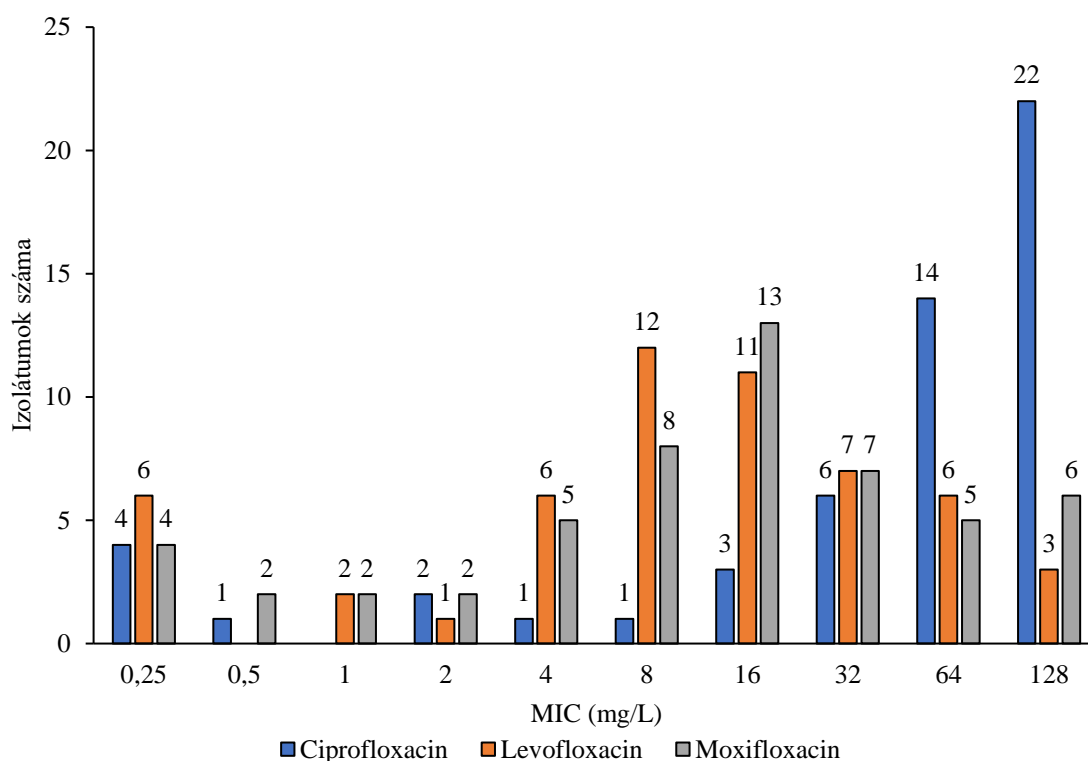
Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok interpretálásakor az EUCAST aktuálisan hatályban lévő klinikai breakpointjait vettük figyelembe. A fluorokinolonok közül ciprofloxacinnal szemben a 49 *E. coli* törzsből 40, az *E. coli* törzsek 81,6%-a, míg az 54 *Klebsiella spp.* törzsből ötven, a *Klebsiella spp.* törzsek 92,6%-a mutatott rezisztenciát. Ugyancsak 40 *E. coli* törzs volt rezisztens levofloxaccinnal szemben is, míg a *Klebsiella* genus vizsgált törzsei között 47 (87%) esetben tapasztaltunk levofloxacin rezisztenciát. Moxifloxaccinnal szemben 88 törzs, köztük 40 *E. coli* és 48 (88,8%) *Klebsiella spp.* bizonyult rezisztensnek. A *Klebsiella* genus képviselői közül az egyetlen *K. oxytoca* törzs mindhárom vizsgált fluorokinolon esetén alacsony MIC értékeket mutatott, ciprofloxacinnal és levofloxaccinnal 0,25 mg/L, moxifloxaccinnal 0,5 mg/L MIC értékeket kaptuk.

A teljes törzskollekció 87,4%-a, az *E. coli* törzsek 81,6%-a, a *Klebsiella spp.* törzsek 92,6%-a mutatott rezisztenciát legalább egy fluorokinolonnal szemben.

Az ESBL-termelő *E. coli* és *Klebsiella spp.* törzsek MIC értékeinek megoszlását a 8. és 9. ábra mutatja be.



8. ábra. Az ESBL-termelő *E. coli* izolátumok fluorokinolon MIC értékei (mg/L).



9. ábra. Az ESBL-termelő *Klebsiella spp.* izolátumok fluorokinolon MIC értékei (mg/L).

4.2. A baktériumtörzsek genotípusos vizsgálatának eredményei

4.2.1. A plazmid-mediálta kinolon rezisztencia gének polimeráz láncreakcióval történő vizsgálatának eredménye

A 103 ESBL-termelő törzs közül összesen 77 (74,8%), 30 *E. coli* és 47 *Klebsiella spp.* hordozott valamilyen PMQR gént. Ezek között a leggyakoribb az *aac(6')-Ib-cr* volt, amely jelenlétét 67 izolátum (65%) esetében azonosítottuk. Mindössze 6 esetben tapasztaltunk *qnrS* pozitív eredményt, míg érdekes módon *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* és *qepA* jelenlétét a PCR módszer során nem detektáltunk.

A 49 *E. coli* törzs vizsgálata során 29 esetben kaptunk pozitív eredményt *aac(6')-Ib-cr*, és egy esetben *qnrS* gén hordozására. 19 izolátum esetében semmilyen PMQR gént nem azonosítottunk. A *Klebsiella* fajok között a PMQR gén hordozás heterogénebb mintázatot mutatott; az 54 törzs közül ugyanis 38 adott pozitív eredményt *aac(6')-Ib-cr* gén hordozására, míg *qnrS* jelenlétét 4 *K. pneumoniae* és az egyetlen *K. oxytoca* törzsben

igazoltuk. Az efflux pumpa gének közül csupán az *oqxA* és *oqxB* PCR vizsgálata során kaptunk pozitív eredményt. 26 *K. pneumoniae* izolátumban mutattuk ki az *oqxA* míg 22 izolátumban az *oqxB* gén jelenlétét, míg *E. coli* esetén az általunk vizsgált efflux pumpa gének jelenlétét egyik törzs esetén sem azonosítottuk.

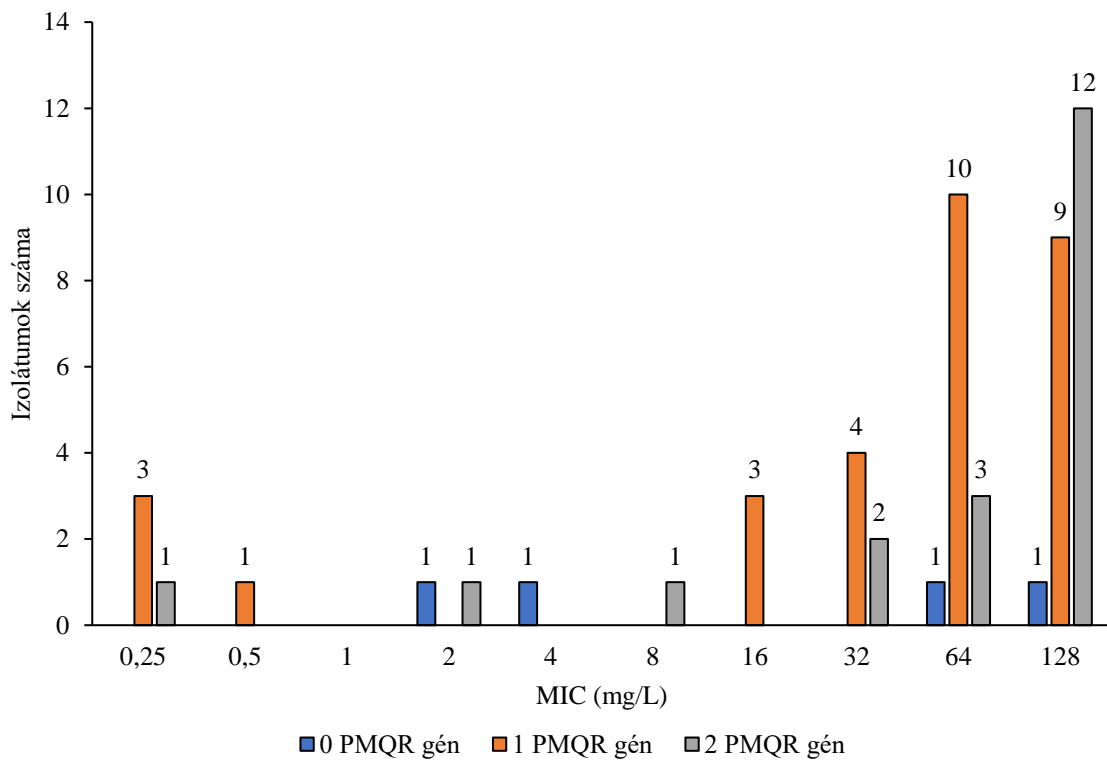
A teljes kollekció 74,8%-ában, azaz 77 izolátum esetében tapasztaltunk PMQR pozitivitást, melyből kettő vagy több különböző PMQR gén együttes jelenlétét 28 *Klebsiella* izolátum esetén azonosítottuk. A *Klebsiella spp.* törzsek mikrodilúciós vizsgálata során kapott fluorokinolon MIC (mg/L) értékek, valamint a PCR által detektált rezisztenciagének megléte (illetve hiánya) között azonban korreláció nem állapítható meg. Magas MIC értékek mellett találunk olyan törzseket, amelyekben PCR-rel PMQR gént nem detektáltunk, ugyanakkor egy vagy több fluorokinolon rezisztenciagén együttes jelenléte sem határoz meg minden esetben magas MIC értékeket: a 103 vizsgált izolátum közül négy PMQR-hordozó törzs alacsony ciprofloxacin MIC értékeket mutatott. Egyidejűleg több PMQR gén jelenlétét csak a *Klebsiella* faj esetén igazoltunk (10. ábra).

A PMQR pozitív törzsek ciprofloxacin MIC értékei széles tartományon belül mozognak (0,25 - 128 mg/L).

A PMQR gének PCR eredményeit összefoglalóan az 6. táblázat szemlélteti.

6. táblázat. A 103 ESBL-termelő törzs PMQR génjeinek százalékos eloszlása.

Rezisztencia gének	ESBL-termelő törzsek összes száma (%)	ESBL-termelő <i>Klebsiella spp.</i> törzsek száma (%)
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	67 (65%)	38 (70%)
<i>qnrA</i>	0 (0%)	0 (0%)
<i>qnrB</i>	0 (0%)	0 (0%)
<i>qnrC</i>	0 (0%)	0 (0%)
<i>qnrD</i>	0 (0%)	0 (0%)
<i>qnrS</i>	6 (5,8%)	5 (9%)
<i>qepA</i>	0 (0%)	0 (0%)
<i>oqxA</i>	26 (25,2%)	26 (48%)
<i>oqxB</i>	22 (21,4%)	22 (40%)



10. ábra. A *Klebsiella spp.* izolátumok ciprofloxacin MIC értékeinek (mg/L) eloszlása 0, 1 és 2 PMQR gén hordozása esetén.

4.2.2. A multilókusz-szekvencia tipizálás eredménye

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálat, valamint a PCR eredményeinek elemzését követően a genotípusos vizsgálatokat csupán 5 törzzsel folytattuk. Az „Anyag és módszer” fejezetben említésre került kritériumrendszer alapján a következő törzsek kerültek kiválasztásra:

- I. qnr gént hordozó törzsek, amelyek nem vad típusú fluorokinolon MIC értékekkel rendelkeznek:
K. oxytoca 37 (Kox37)
- II. qnr gént hordozó, magas fluorokinolon MIC értékekkel rendelkező törzsek:
K. pneumoniae 47 (Kpn47), *K. pneumoniae* 115 (Kpn115), *K. pneumoniae* 125 (Kpn125)
- III. Több PMQR gént hordozó, magas MIC értékeket mutató törzsek:
K. pneumoniae 33 (Kpn33)

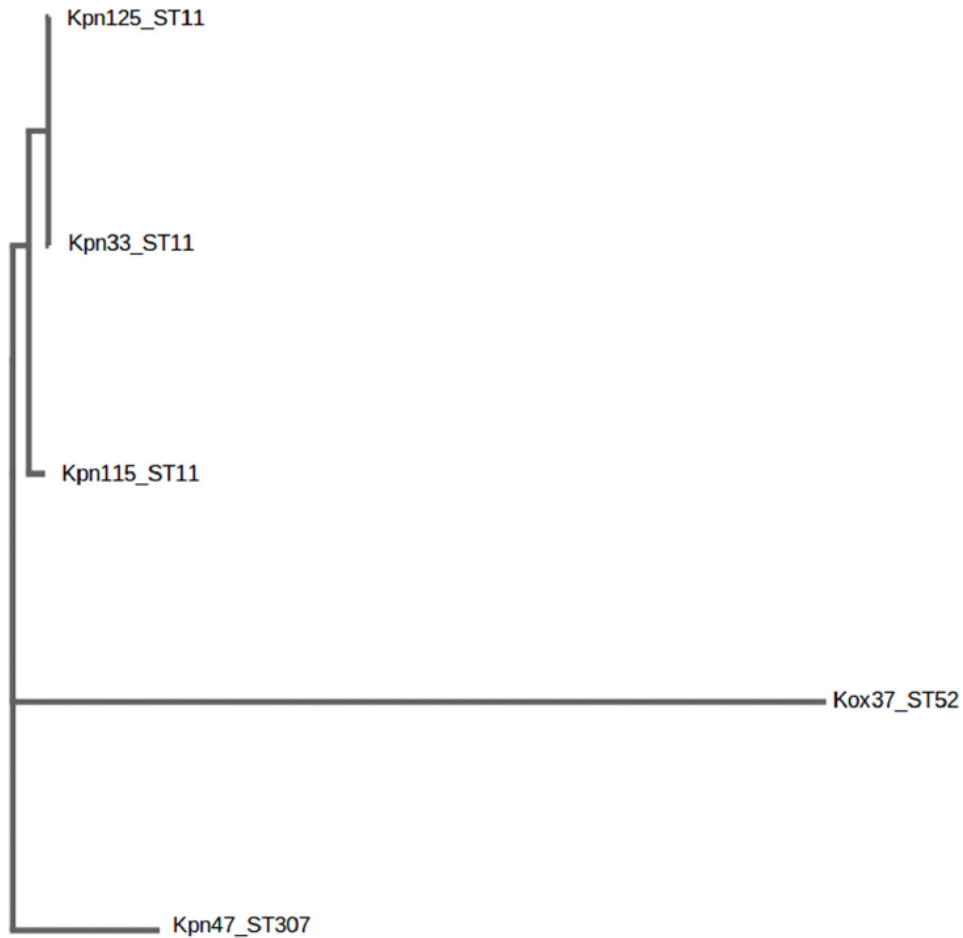
A kiválasztott PMQR hordozó törzsek további genotípusos karakterizálásának eredményeit a következő alpontokban ismertetem (5.2.2, 5.2.3, 5.2.4, 5.2.5, 5.2.6). A törzsek közül a Kpn33 és a Kox37 2010-ben, a Kpn47 2014-ben, a Kpn115 2012-ben, a Kpn125 2013-ban került izolálásra.

Az MLST vizsgálat kiértékelését a hét fajspecifikus háztartási gén szekvenciája alapján végeztük. A törzsek klaszteranalízise során minden egyes, lókuszonként észlelt nukleotid különbséghez egy-egy allélszámot rendelünk, a hivatalos MLST adatbázisban (<http://www.pasteur.fr/mlst/Kpneumoniae.html>) pedig minden allélkombináció alapján meg tudjuk határozni a különböző számokkal ellátott szekvenciatípusokat. Az allélkombinációk eredményeképpen kapott hasonlósági dendrogram a törzsek közötti hasonlósági viszonyokat tárja fel.

Az MLST vizsgálatok alapján törzseinket három különböző szekvenciatípusba sorolhatjuk: a Kpn33, Kpn115 és Kpn125 az ST11 nemzetközileg elterjedt magas kockázatú (nagy)klónba („international high-risk clone”), a Kpn47 az ST307 potenciális nagyklónba, míg a Kox37 az ST52 klónba tartozik.

4.2.3. A bakteriális genomszekvencia-tipizálás eredménye

A BacWGST adatbázisba feltöltött core genom SNP alapú genetikai távolságait a 11. ábra demonstrálja. A távolságmátrix a filogenetikai fák evolúciós távolsági adataiból történő rekonstruálásához javasolt Neighbor-Joining módszer és a minimális feszítőfa módszer algoritmusát ötvözi a klonális kapcsolatok felderítésére (minimum spanning tree, MST). Az illusztráció az SNP pontos értékét nem tünteti fel, azonban kiegészíti a PFGE által kapott eredményeinket. Alátámasztja a három év különbséggel izolált Kpn33 és Kpn125 közeli genetikai rokonságát, és megerősíti az MLST által szintén ST11 klónként specifikált Kpn115 klonális kapcsolatát a két előbbi klónnal. A komparatív elemzés érzékelteti a Kox37 (és az ST307) genetikai távolságát, melynek több ezer SNP-je van bármelyik *K. pneumoniae* klónhoz képest.

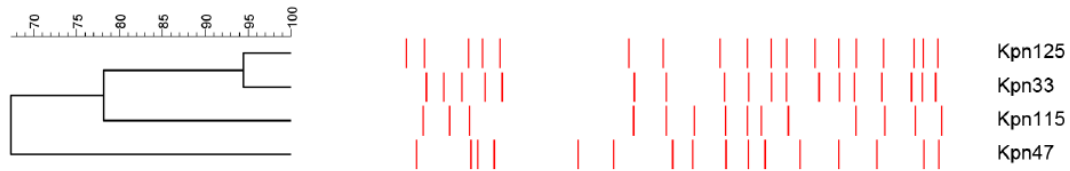


11. ábra. A *K. pneumoniae* ST11 (Kpn33, Kpn115, Kpn125), ST307 (Kpn47) és *K. oxytoca* ST52 törzsek genomalapú SNP elemzése alapján kapott távolságalapú fa.

4.2.4. A pulzálatott-mezejű gélelektroforézis eredménye

A PFGE analízis három pulzotípust (PT) azonosított *K. pneumoniae* törzseink között, a KP053, az S valamint a KP197 pulzotípust. Az ST11 klónba tartozó törzsek közül a Kpn33 és Kpn125 a KP053 PT-ba, míg a Kpn115 az S PT-ba tartozott. Az ST307 potenciális nagyklónt makrorestrikciós mintázata alapján KP197 PT-ként azonosítottuk. A törzseket akkor tekintjük klonálisan összetartozónak, ha a makrorestrikciós mintázatuk legalább 85%-os hasonlóságot mutat. A Kpn33 és Kpn125 törzs között ~ 95% genetikai hasonlóság ismerhető fel, míg érdekes módon az MLST módszer által ugyanazon szekvenciatípusba sorolt Kpn115 eltérő restrikciós mintázatot mutat, ami hasonlósági szempontból 85% alatt van. A Kpn47 genetikai távolságát a BacWGS tipizálási módszer

ábrája is érzékelteti, ami szekvenciatípusa (ST307) és restrikciós profilja alapján is tetten érhető (12. ábra).



12. ábra. A *K. pneumoniae* ST11 (Kpn33, Kpn115, Kpn125) és ST307 (Kpn47) törzsek PFGE módszerrel kapott makrorestrikciós mintázata.

4.2.5. A teljes genom szekvenálás eredménye

A draft genom szekvencia, azaz a kezdeti, részleges információkat nyújtó szekvenciaadatok alapján a Kpn33 törzs genommérete 5611026 bp, a Kox37 törzsé 6370417 bp, a Kpn47 törzsé 5451744 bp, a Kpn115 törzsé 5450412 bp, a Kpn125 törzs genommérete pedig 5593358 bp.

A szekvenciaadatok alapján mind a Kpn33, mind a Kpn125 genomjában tizenhét-tizenhét megegyező rezisztenciagén jelenlétét detektáltuk. A harmadik ST11 törzs (Kpn115) tizenkettő, a Kpn47 tizenhat rezisztenciagénnel rendelkezett, míg a Kox37 esetén mindössze tíz rezisztenciagént azonosítottunk. A szekvencia analízis adataiból láthatjuk, hogy törzseink különböző β -laktamáz géneket tartalmaznak, így *bla_{DHA-1}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-2}*, *bla_{OXA-9}*, *bla_{SHV-11}*, *bla_{SHV-28}*, *bla_{TEM-1A}*, *bla_{TEM-1B}*, *bla_{OXY-1-3}*, *bla_{TLA-1}* géneket. *bla_{SHV-11}* mindegyik ST11 törzsben jelen volt, míg az ST307 klón képviselője *bla_{SHV-28}* gént hordozott. A WGS a Kox37 törzsben *bla_{SHV}* és *bla_{CTX-M-15}* gén jelenlétét nem igazolta, szemben a *K. pneumoniae* törzsekkel, amelyek mindegyikét *bla_{CTX-M-15}* hordozóként azonosítottuk. Az aminoglikozid rezisztencia gének közül *aac(3)-IIa* gén hordozása minden törzsre jellemző volt, *aadA1*, *aadA2* és *aac(6')-Ib* azonban csak a két genetikailag hasonló ST11 törzsben (Kpn33 és Kpn125) volt megfigyelhető. Tetraciklin rezisztenciagénnel (*tetA*) egyedül az ST307 klón (Kpn47) rendelkezett. A Kox37 kivételével minden törzset *fosA* pozitívként detektáltunk. A szulfonamid rezisztenciagének (*sul1* vagy *sul2*), valamint a trimetoprim rezisztenciában szerepet játszó gének (*dfrA12*, *dfrA14*, *dfrA29*) hordozását a Kpn115 törzs esetén nem észleltük,

míg a többi törzs rendelkezett ezen gének valamelyikével. Fenikol rezisztencia gén (*catA1* vagy *catB3*) hordozására szintén minden törzs pozitívnak bizonyult.

A szekvenciaadatok interpretálása során PMQR gén/gének jelenlétét minden törzs esetén igazoltuk, azonban a PCR, mint retrospektív „genotípusos szűrés” során kapott adatokkal összevetve helyenként anomáliát tapasztaltunk. A Qnr fehérjét kódoló géneket illetően a WGS szekvencia adatelemzése cáfolta a PCR során azonosított *qnrS* gén jelenlétét, helyettük 2 törzs esetében *qnrB4* gént (Kpn33 és Kpn125), egy törzs esetében *qnrB1* gént (Kpn47) azonosított, szintén egy törzs pedig *qnrA1*-et hordozott (Kox37). Érdekes módon a Kpn115 esetében WGS alapján kiderült, hogy *qnr* gént nem hordoz. A WGS minden *K. pneumoniae* törzs genomjában felismerte az *oqxA* és *oqxB* efflux pumpa gének, valamint az *aac(6')-Ib-cr* szekvenciáját.

A szekvenálási eredményeket összefoglalóan a 7. táblázat ábrázolja.

A szekvenciaadatokat feltöltöttük az NCBI (National Center for Biotechnology Information) Genbank adatbázisba, melyek a következő „accession number” alatt érhetőek el:

Kpn 33: Bioproject: PRJNA511518, Biosample SAMN10639440

Kox37: Bioproject PRJNA511522, Biosample: SAMN106 39457

Kpn47: Bioproject: PRJNA511523, Biosample: SAMN10639726

Kpn115 Bioproject: PRJNA511524, BioSamples SAMN10639736

Kpn125: Bioproject: PRJNA511525, BioSamples SAMN10639737.

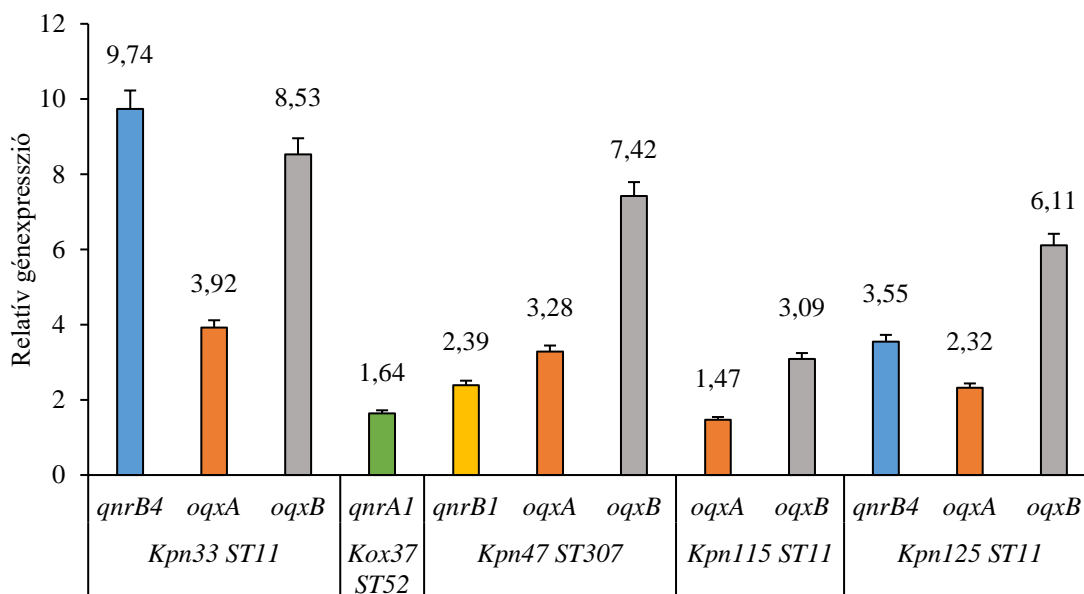
A nyers NGS szekvenálási adatokat az NCBI szekvenciaolvasási archívumában (Sequence Read Archive, SRA) helyeztük el.

7. táblázat. A vizsgált törzsek WGS által azonosított rezisztencia génjeinek és plazmid replikonjainak eloszlása.

ST11 Kpn33	ST52 Kox37	ST307 Kpn47	ST11 Kpn115	ST11 Kpn125	Gének
					<i>aadA1</i>
					<i>aac(3)-IIa</i>
					<i>aac(6')-Ib</i>
					<i>aph(3')-Ic</i>
					<i>aadA2</i>
					<i>strA</i>
					<i>strB</i>
					<i>sul1</i>
					<i>sul2</i>
					<i>fosA</i>
					<i>dfrA12</i>
					<i>dfrA14</i>
					<i>dfrA29</i>
					<i>oqxA</i>
					<i>oqxB</i>
					<i>aac(6')-Ib-cr</i>
					<i>qnrA1</i>
					<i>qnrB1</i>
					<i>qnrB4</i>
					<i>tet(A)</i>
					<i>blaOXY-1-3</i>
					<i>blaTLA-1</i>
					<i>blaTEM-1A</i>
					<i>blaTEM-1B</i>
					<i>blaDHA-1</i>
					<i>blaOXA-1</i>
					<i>blaOXA-2</i>
					<i>blaOXA-9</i>
					<i>blaSHV-11</i>
					<i>blaSHV-28</i>
					<i>blaCTX-M-15</i>
					<i>catA1</i>
					<i>catB3</i>
ST11 Kpn33	ST52 Kox37	ST307 Kpn47	ST11 Kpn115	ST11 Kpn125	Plazmid replikonok
					<i>IncFII(K)</i>
					<i>IncFIA(HII)</i>
					<i>IncR</i>
					<i>IncFIB(K)</i>
					<i>IncL/M (pmu407)</i>
					<i>IncFIB(Mar)</i>
					<i>IncHIIB</i>
					<i>ColRNAI</i>

A szekvenciaelemzés során fluorokinolon rezisztenciában szerepet játszó kromoszóma mutációkat szintén azonosítottunk. A Kpn115 (ST11) DNS-giráz enzimének A alegységében Ser83Phe és Asp87Ala szubsztitúciót eredményező mutációt detektáltunk, míg a többi *K. pneumoniae* törzs esetén a *gyrA* QRDR-jában csupán a Ser83Ile szubsztitúcióért felelős mutáció volt megfigyelhető. Mindegyik *K. pneumoniae* törzs DNS topozimeráz IV enzimszekvenciájában jelen volt a Ser80Ile szubsztitúció, a Kpn47 (ST307) QRDR-jában azonban még egy Asn304Ser aminosavcserét is észleltünk. A Kox37 *gyrA* és *parC* génjében nem azonosítottunk szubsztitúciót. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálat során kapott MIC értékek és a WGS által kimutatott kromoszóma mutációk információit közös ábrán tüntettem fel, a könnyebb összehasonlítás céljából (13. ábra). Jelen tanulmányban a feno- és genotípusos vizsgálati eredmények együttes figyelembevétele alappillére a kutatási konklúzió megalkotásának. Az adatok összevetése kiindulási alapot szolgáltat annak megértéséhez, hogy miért alacsonyabb, vagy épp miért kiugróan magas egy adott izolátum MIC értéke, miért szükséges az intrinsic rezisztencia megléte, vagy egyáltalán milyen előnyök segítik hozzá az adott klónt a nemzetközileg elterjedt, magas kockázatú „titulus” eléréséhez.

A WGS szekvenciaadatai alapján IncFIB(K) típusú plazmidreplikon mindegyik törzs esetén detektálható volt. Az ST11 törzsekben az IncFIB, IncFII, és IncR replikon egységesen jelen volt, azonban a Kpn33 és Kpn125 szekvenciaelemzése során a felsoroltakon kívül még IncFIA(HI1) jelenlétét is igazoltuk. Az ST307 törzs esetén IncFIB, IncL/M, IncFIB(Mar) és IncHI1B típusú replikonnal rendelkező plazmidok hordozását állapítottuk meg. A Kox37 törzsben az IncFIB replikonon kívül a ColRNA1 is azonosítható volt, amit azonban más törzsekben nem detektáltunk. A szekvenciaadatokban azonosított plazmidreplikonok listáját összefoglalóan a 7.táblázat szemlélteti.



	Kpn33	Kox37	Kpn47	Kpn115	Kpn125
MIC (mg/L)					
NAL	>256	16	>256	>256	>256
CIP	128	0,25	128	128	128
LEV	128	0,25	32	8	64
MOX	128	0,5	128	8	64
Detektált mutációk a QRDR-ban					
<i>gyrA</i>	Ser83Ile	-	Ser83Ile	Ser83Phe Asp87Ala	Ser83Ile
<i>parC</i>	Ser80Ile	-	Ser80Ile Asn304Ser	Ser80Ile	Ser80Ile

13. ábra. A *qnrB4* (Kpn33 és Kpn125), a *qnrA1* (Kox37), a *qnrB1* (Kpn47) az *oqxA* és *oqxB* relatív génexpressziós szintje, valamint a QRDR-ban detektált mutációk okozta aminosav szubsztitúciók a vizsgált baktériumtörzsekben. A MIC értékeket mg/L-ben adtuk meg.

4.2.6. A kvantitatív polimeráz láncreakció eredménye

A qPCR módszer során vizsgált *qnr* illetve *oqxAB* gének relatív expressziós szintje között meglepő különbségeket tapasztaltunk (13. ábra). A két genetikailag hasonló ST11 klón, a Kpn33 és Kpn125 *qnrB4* génjének (*rpoB* háztartási génhez viszonyított) expressziója 9,74 és 3,55, azaz csaknem háromszoros a különbség a két azonos szekvenciatípusú törzs ugyanazon génjének expressziója között. *qnr* gén tekintetében a

legalacsonyabb expressziós szintet (1,64) az alacsony fluorokinolon MIC értékekkel rendelkező, kromozómájában mutációt nem hordozó Kox37 esetében tapasztaltuk. A potenciális magas kockázatú ST307 klón (Kpn47) *qnrB1* génjének expressziója 2,39.

A törzsek *oqxA* expressziója 1,47 és 3,92 között, az *oqxB* expressziója pedig 3,09 és 8,53 között változott. A legnagyobb *oqxA* és *oqxB* expressziót a Kpn33-ban (ST11) és a Kpn47-ben (ST307) figyeltük meg, melyeket a Kpn125 (ST11) és a Kpn115 (ST11) követte.

Érdekes, hogy a Kpn115, mint ST11 magas kockázatú klón nem tartalmaz *qnr* gént, ráadásul a legalacsonyabb *oqxAB* expressziót mutatta, ugyanakkor a mikrodilúciós módszer alapján mégis rezisztens volt valamennyi vizsgált fluorokinolonnal szemben. A levofloxacin és moxifloxacin MIC értékeiben azonban szembetűnő a különbség: a Kpn115 értékei voltak a legalacsonyabbak a *K. pneumoniae* törzsek közül. Feltűnő továbbá, hogy minden törzs esetén az *oqxB* expressziós szintje jóval magasabb az *oqxA* értékénél.

5. Megbeszélés

5.1. A vizsgálat törzsek fenotipusos rezisztenciája

Széles körben elfogadott tény, hogy az antibiotikumok használata elősegíti a kórházakban és a közösségekben a baktériumok antibiotikumokkal szembeni rezisztenciájának kialakulását (9, 43). Nemrégiben bebizonyosodott azonban, hogy a kinolon rezisztencia az antibiotikum szelekciós nyomás hiányában is kialakul, ezért feltételezhetjük, hogy a klinikai esetekből származó rezisztens izolátumok megjelenése nem feltétlenül az antibiotikumok alkalmazására vezethető vissza (211, 212). Az egyik olyan antibiotikumcsoport, amely – a klinikumba történő bevezetése óta – nagy népszerűségnek örvend, a fluorokinolonok, melyeket szélesebb antimikrobiális spektrumuk és jobb farmakokinetikai tulajdonságaik miatt széleskörben alkalmaznak különféle fertőzések kezelésében. A szerek alkalmazásával azonban a kinolon rezisztencia problémája vitathatatlanul mindinkább súlyosabbá válik, így az intrinsic és extrinsic rezisztencia kumulatív módon egy magasabb rezisztenciaszintet hoz létre, mely terápiás nehézséget, egyben hosszabb kórházban tartózkodást eredményez (8-10, 110). A nozokomiális fertőzést okozó baktériumok közül az ESKAPE csoport kiemelt jelentőségű, melyek közül kettő az *Enterobacteriaceae* családba tartozik (30). A *K. pneumoniae* és az *E. coli* a két leggyakoribb kinolon rezisztens bélbaktérium (212). Az általunk vizsgált izolátumok species szerinti százalékos eloszlása tükrözi az ESKAPE baktériumok kórházi infekciókban betöltött szerepét és fontosságát. Az ezen baktériumok által okozott nozokomiális infekciókról évtizedek óta világszerte beszámolnak, és mivel a baktériumok által kolonizált leggyakoribb extraintestális hely a húgyúti rendszer, ez az infekció a véráramfertőzések általános forrása, mely kialakulásához számos virulencia faktor jelenlétét társították (35, 36) Az *E. coli* húgyúti infekciókban betöltött szerepét Azargun tanulmánya is alátámasztja, ahol 219 azerbajdzsáni és iráni beteg húgyúti mintájából 177 esetben *E. coli*-t, 28 esetben *K. pneumoniae*-t identifikáltak az infekció kórokozójaként; melyek közül 144 *E. coli* és 21 *K. pneumoniae* hordozott valamilyen plazmidon kódolt kinolon rezisztenciagént; a PMQR gének jelenléte azonban jellemzőbb volt azokban az izolátumokban, amelyek magas MIC értékekkel rendelkeztek, szemben az alacsony MIC értékeket mutató törzsekkel (26).

Az általunk vizsgált klinikai izolátumok jelentős része, a teljes törzskollekció mintegy 87,4%-a volt rezisztens legalább egy vizsgált fluorokinolonnal szemben. Ez az adat beleillik az irodalmi adatok alapján alkotott képbe, hasonlóan magas értékekről számos további publikációban beszámoltak (24, 213). Munkánk jól példázza tehát, hogy a véráramfertőzésből izolált kórokozók magas fluorokinolon MIC értékeket mutatnak. Egy kínai tanulmányban a 2013-15 közötti intervallumban nozokomiális véráramfertőzést okozó 35 *K. pneumoniae* izolátum antibiotikum érzékenységét vizsgálva azt tapasztalták, hogy ciprofloxacinnal szemben csupán egy izolátum volt érzékeny, míg levofloxacinnal szemben 100%-os rezisztenciát tapasztaltak. A tanulmány egyben az ST11 szekvenciatípus domináns elterjedését is érzékelteti, a 35 izolátumból 29 ebbe a klónba tartozott (177). Egy 2019-ben megjelent, ciprofloxacin rezisztenciát vizsgáló átfogó tanulmány a földrajzi régiók alapján foglalja össze az uropatogén *E. coli* ciprofloxacinnal szembeni rezisztenciájának százalékos megoszlásait. A fejlett és fejletlen országok adatait összevetve szignifikáns különbség érzékelhető: előbbi csoportban feltüntették az USA (5,1–12,1%), Belgium (12,9%), Németország (10,5–17,3%), Svájc (17,4%), Anglia, (20,4%), Franciaország (24,8%) és Spanyolország (39,8%) adatait, míg az utóbbi csoportban Jordánia (55,5%), Mongólia (58,1%), Pakisztán (60,8%), Nepál (64,6%) és Etiópia (85,5%) rendkívül magas százalékos arányát olvashatjuk (214). Kelet-afrikai kutatások kimutatták, hogy 2003 és 2016 között az ESBL-termelő törzsek prevalenciája 0,7% -ról 30,3% -ra emelkedett az *E. coli* esetében, míg 11,8% -ról 90,5% -ra a *Klebsiella* speciesek esetében. A tanulmány a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia megnövekedett értékeiről is beszámol; a vizsgálatok alapján *E. coli*-ban 2,5% -ról 31,1% -ra, a *Klebsiella* speciesekben 1,7% -ról 70,2% -ra változott a rezisztens törzsek aránya (215).

Az enterobaktériumokban a kinolonokkal szembeni rezisztencia elsősorban mutációi eredménye, amelyek a *gyrA* és a *parC* alegységeiben következnek be. A plazmid által közvetített kinolon rezisztenciagének alacsony szintű rezisztenciát eredményeznek, azonban a PMQR gének jelenléte elősegíti a QRDR régióban bekövetkező mutációk előfordulási gyakoriságát (55, 109). Fontos megjegyezni azonban, hogy a fluorokinolon rezisztenciagének jelenléte és a ciprofloxacin MIC értéke közötti kapcsolat nem nyilvánvaló (216). Vizsgálati eredményeink interpretálása során mi is azt tapasztaltuk, hogy nincs egyértelmű korreláció a fluorokinolon MIC értékek és a detektált PMQR-

determinánsok jelenléte között. Négy PMQR-hordozó törzs alacsony ciprofloxacinnal MIC értékeket mutatott, ami a kromoszomális mutációk hiányára is utalhat.

A ciprofloxacinnal MIC-értékek meghatározó szerepet játszhatnak a *K. pneumoniae* nagyklonok terjedésében (217). Azonban mégis elmondható, hogy nincs olyan specifikus fenotípusos vonás, amely lehetővé tenné a klinikai laboratórium számára, hogy könnyen felismerhetővé tegye a PMQR gének jelenlétét. Noha a ciprofloxacinnal szembeni csökkent érzékenység egy olyan fenotípusos jelleg, amelyet gyakran összekapcsolnak a PMQR gének jelenlétével, azonban nem mindig megbízható marker (43, 218, 219).

5.2. Fluorokinolon rezisztenciában szerepet játszó gének

Vizsgálataink eredményeink tükrözték az *aac(6')-Ib-cr* és az efflux pumpa gének jelentős gyakoriságát az ESBL-pozitív *K. pneumoniae* klinikai izolátumok között a Semmelweis Egyetemi Klinikákon. A PMQR gének ilyen magas gyakorisága rávilágít az ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumok, illetve PMQR hordozásuk korai felismerésének és rutin szűrésének szükségességére. Kimutattuk, hogy a 103 izolátum között a legelterjedtebb PMQR gén az *aac(6')-Ib-cr* (68,8%), melyet az *oqxA* (48%), *oqxB* (40%) és *qnrS* (6,4%) követett. Ezeket az adatokat összehasonlítva a korábbi magyarországi jelentéssel, Szabó és munkatársai közel azonos gyakoriságot mutattak ki a *qnr* rezisztencia gének tekintetében az ESBL-termelő *K. pneumoniae* izolátumok (3%) és a (szintén ESBL-t termelő) *E. coli* izolátumok (1,4%) között (220). Az *aac(6')-Ib-cr* prevalenciája drámai módon, 26,6%-ról 68,8%-ra növekedett, az első magyarországi kimutatás óta (220). Az ESBL-termelők között az *aac(6')-Ib-cr* különböző gyakoriságáról több országban beszámoltak: Iránban 70,1%, Spanyolországban pedig 16,2% (221, 222).

A PCR és a WGS által kapott eredmények interpretálása során anomáliát tapasztaltunk bizonyos PMQR gének (*qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *oqxAB*) tekintetében. A PCR módszer során előforduló detektálási hibák valószínűségéről Strahilevitz és munkatársai (2009) is beszámoltak. A *qnrA*, *qnrB* és *qnrS* gének egyszerűbb, illetve gyorsabb kimutathatóságának céljából számos munkacsoport alkalmazott multiplex PCR-t, melyet a későbbiekben további primer készletekkel egészítették ki, az újabb és újabb azonosított génavariáns azonosításának megkönnyítése érdekében. Strahilevitz leírja, hogy az általuk használt primerek nem teljesen egyeztek meg az összes *qnrB* génnel, és a reverse primer a 3' végén nem illeszkedett a *qnrB5*, *qnrB10* és *qnrB19* génekkel, hasonlóképpen a *qnrB*

reverse primerjének *qnrB17*-hez történő illeszkedési hibájáról is találunk irodalmi adatokat (11, 109, 223, 224). Kim és munkatársai fals pozitív amplikonokról számoltak be a multiplex PCR eljárások során, hangsúlyozva a kiterjedt DNS-szekvencia megerősítésének fontosságát (225). A különböző kimutatási módszerek összehasonlítása nélkül a prevalencia vizsgálatok potenciálisan detektálási torzításnak vannak kitéve. Mivel az *aac(6')-Ib-cr* és az *aac(6')-Ib* közötti különbség is csak két nukleotidban van, az *aac(6')-Ib-cr* szűrése az *aac(6')-Ib* amplifikációt követő szekvenálással erősíthető meg (115). Habár a PCR módszer prelimináris szűrésre kiválóan alkalmazható, a WGS nagyfokú szenzitivitása által kapott eredmények megbízhatóbb adatokat közölnek. Az *aac(6')-Ib-cr* különböző PMQR génnel asszociált jelenlétéről szintén irodalmi adatok állnak rendelkezésre, leírták a *qnrA1*, *qnrB1*, *qnrB4*, *qnrS1*, *qepA* génnel való koegzisztenciát is (109, 134, 226, 227).

A WGS szekvenciaadataiból megtudtuk, hogy törzseink közül kettő (Kpn33 és Kpn125) *qnrB4*-et, a *K. oxytoca* (Kox37) *qnrA1*-et, a Kpn47 pedig *qnrB1*-et hordoz genomjában. Ezen gének gyakoriságáról világszerte beszámolnak, számos publikáció támasztja alá a nozokomiális infekciót okozó *K. pneumoniae* izolátumokban való jelenlétüket (228-230). A *qnr* gének prevalenciája az egyes országokban eltérő megoszlást mutat: Kínában 65,5% (231), Malajziában 48,9% (232), Szingapúrban 5,2% (233), Olaszországban 5,02% (234), Brazíliában pedig 2,3% (235). Sem a PCR reakció, sem a WGS során izolátumaink között nem észleltük a *qnrC* és *qnrD* gén jelenlétét, ami nem meglepő, mivel a többi *qnr* génnel szemben lényegesen ritkábban azonosítják klinikai mintában. Irodalmi adatok szerint az utóbbi determinánst idáig jellemzően az Morganellaceae család (*Proteus spp.*, *Morganella spp.* és *Providencia spp.*) tagjaiban mutatták ki (236). A *qnrB* gének jelenlétét *K. pneumoniae* ST11 esetén számos közleményben jelentették, így eredményünk korrelál a nemzetközi adatokkal (237, 238). Legjobb ismereteink szerint ST52 szekvenciatípusba tartozó *K. oxytoca* esetén idáig világszerte nem azonosították a *qnrA1* jelenlétét, így munkánkkal elsőként írjuk le.

Vizsgálatunk során kimutattuk, hogy az ESBL-termelő *K. pneumoniae* törzsek között 48% volt az *oqxA*, illetve 40% az *oqxB* gének prevalenciája. Különböző országok különféle prevalencia-adatokról számoltak be; Spanyolországban az *oqxA* esetében 76,3%, az *oqxB* esetében pedig 74,6% prevalenciát tapasztaltak (239), míg egy kínai tanulmány eredményei 100%-os prevalenciáról számolnak be (240). A WGS adatai azt

mutatták, hogy az *oqxAB* minden *K. pneumoniae* klinikai izolátumban jelen volt, a *K. oxytoca*-ban azonban nem. Ez az eredmény azzal magyarázható, hogy az *oqxAB* egy kromoszomálisán kódolt gén a *K. pneumoniae*-ban (240).

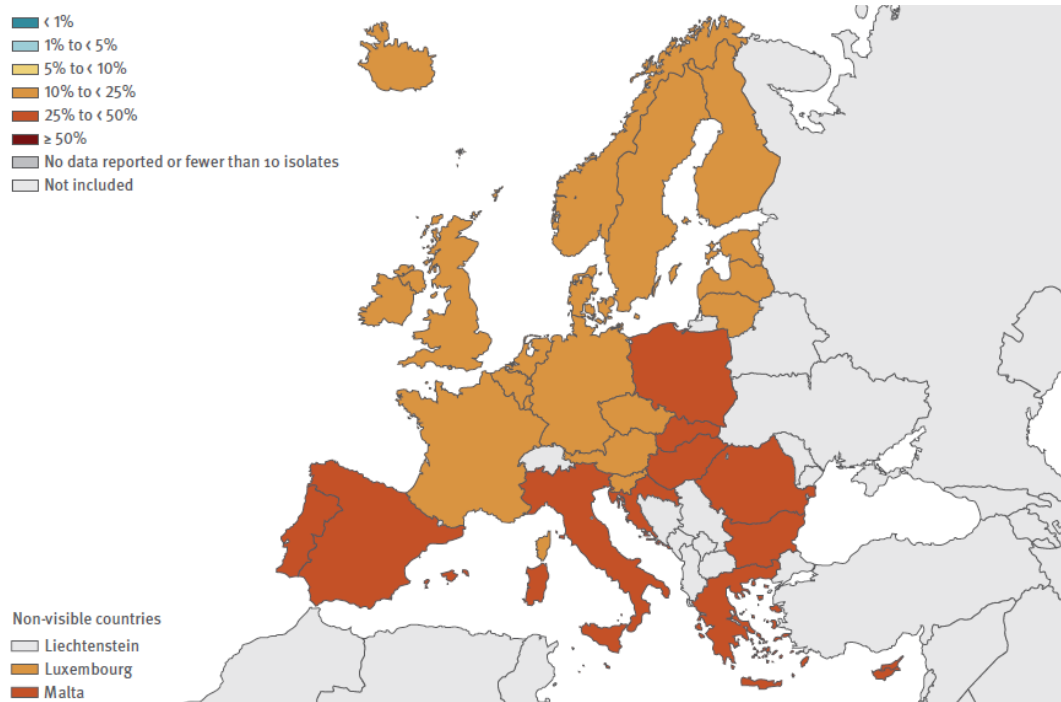
Más vizsgálatokhoz hasonlóan, a másik vizsgált efflux pumpa gén, a *qepA* nem volt jelen klinikai izolátumainkban, melyet a WGS eredménye is konfirmál (221, 241). Ugyancsak alacsony prevalenciáról számolnak be a következő tanulmányok is: a 2007-ben elkülönített 121 ESBL-pozitív *Enterobacteriaceae* törzs közül egyetlen *E. coli* izolátum (0,8%) volt pozitív a *qepA2* nevű variánsra nézve (139); egy kínai sertéstelep vizsgálatában azonban 48 *rmtB* pozitív *E. coli* izolátumból 28 (58,3%) bizonyult *qepA* pozitívnak (242). Az efflux pumpa gének állatokból izolált mintákból való magas detektálási arányából feltételezhető, hogy antibiotikum expozíció mellett, a környezeti mikroorganizmusok esetében a PMQR gének közül az efflux pumpa gének mechanizmusa dominál. Ez a feltételezés mindenesetre összefüggést mutat azzal a („Bevezetés” c. fejezetben említett) ténnyel, hogy az *oqxAB* gén első azonosítása sertéstrágya-mintából történt (137).

5.3. A fluorokinolon rezisztencia és a kiterjedt spektrumú β -laktamázok európai elterjedése

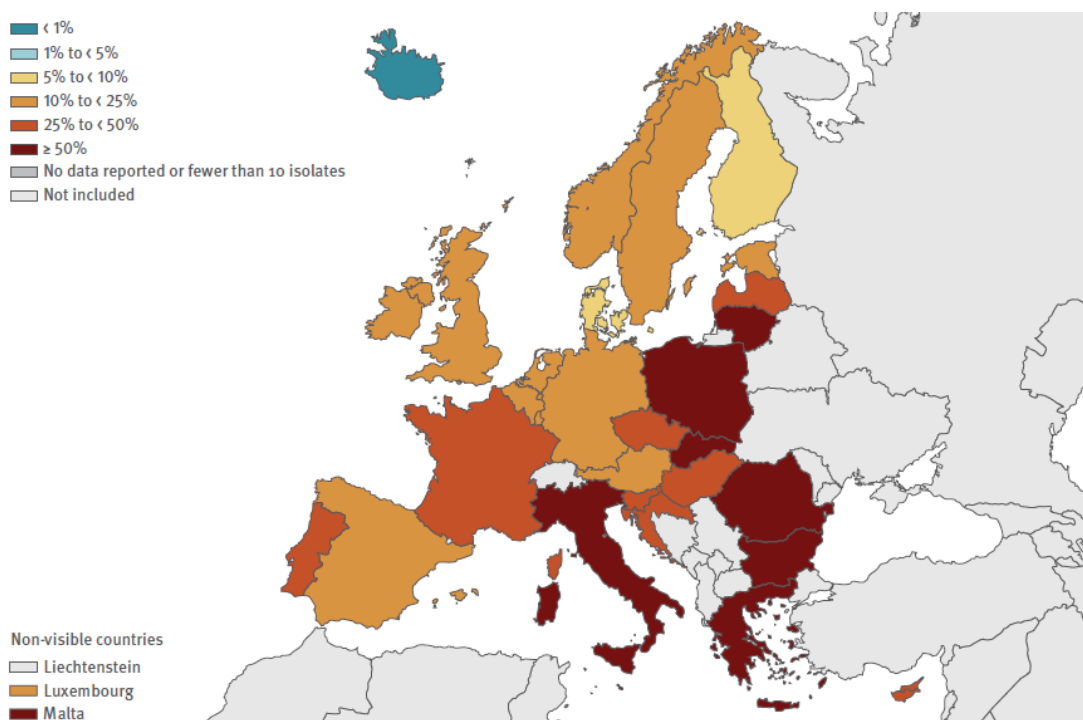
Ahogy azt a „Bevezetés” c. fejezetben is láttuk, az európai országok közül Romániában kimagasló az antibiotikum rezisztencia aránya, amint azt az EARS-Net (Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, Európai Antimikrobiális Rezisztencia Felügyeleti Hálózat, www.ecdc.europa.eu) által közölt legfrissebb adatok mutatják (14-17. ábra) (243). A szennyvíztisztító telep vízi környezet, amelyet az antibiotikumok és más kémiai szennyező anyagok (például nehézfémek, gyógyszerek, metabolitok) magas szintű szelektív nyomása jellemez. E célból román kutatók a szennyvíztisztító telepekről származó izolátumok, illetve a térben és időben összefüggő klinikai izolátumok összehasonlító elemzését végezték, és hiánypótló adatokat közöltek az antibiotikum rezisztencia gének (klinikai és a vízi környezet közötti) terjedésére vonatkozóan. Mind a klinikai, mind a környezeti mintákban széles körben elterjedt ESBL gének, így *bla_{SHV}*, *bla_{OXA}*, *bla_{TEM}* és *bla_{CTX-M}* voltak jelen. A kinolon rezisztenciagének közül *qnrS1* és *oqxAB* gén minden mintában megtalálható volt, míg *qnrD* és *qnrB* csupán a környezeti izolátumokra volt jellemző. Kimutatták az efflux pumpák és a plazmid által közvetített *qnrB*, *qnrD* és *qnrS* rezisztencia overexpresszióját a szennyvízi izolátumokban,

amelyekben azonban a hipervirulens *K. pneumoniae* genotípussal összefüggő gének egyike sem volt kimutatható (244). Számos klinikai jelentőségű szekvenciátípust is leírtak szennyvízi izolátumokban, köztük az ST11 (245-247) és az ST307 klónokat is (248, 249). Ezen klónok környezetben és kórházakban való megjelenése bizonyítja sikeres szelekciójukat, valamint utal széleskörű elterjedésükre, melyet kutatási eredményeink is alátámasztanak: vizsgált törzsek közül három *K. pneumoniae* az ST11 (Kpn33, Kpn115, Kpn125), egy pedig az ST307 klónba tartozott (Kpn47), míg a *K. oxytoca* – melyet e fejezetben a *qnrA1* jelenlét kapcsán novitásként konkludáltunk – az ST52 klón képviselője.

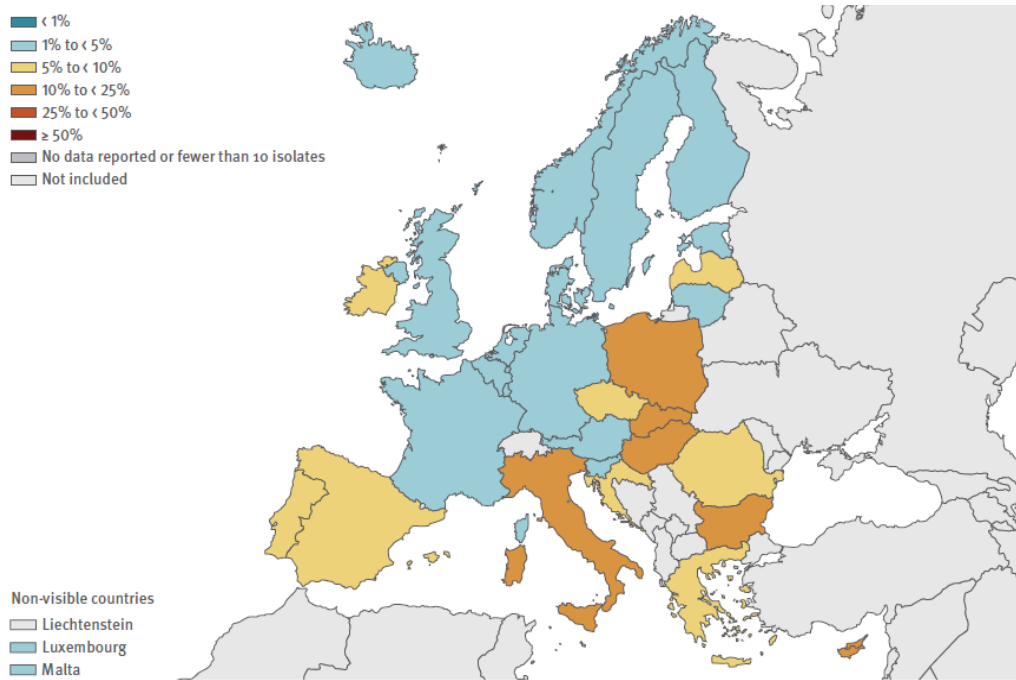
A 14. és 15. ábra illusztrálja a 2018. évi európai fluorokinolon rezisztencia helyzetet *E. coli*, illetve *K. pneumoniae* izolátumok körében (243). A magyarországi izolátumok mindkét térkép alapján 25-50%-os arányban mutatnak rezisztenciát fluorokinolonokkal szemben. A *K. pneumoniae* százalékaránya szélesebb tartományt ölel fel Európa szerte, a hazánkat határoló országok közül Románián kívül Szlovákiában is magas értéket adminisztráltak. A 16. és 17. ábra a multirezisztens (fluorokinolon, harmadik generációs cefalosporin és aminoglikozid rezisztens) *E. coli* és *K. pneumoniae* széleskörű európai megjelenését reprezentálja (243). Érzékelhető a különbség a két faj izolátumainak értékei között hazánkra vonatkoztatva; multirezisztens *K. pneumoniae*-t szignifikánsan magasabb arányban azonosítottak. Ebben a kontextusban Görögország mutat kirívóan magas értékeket, amit alátámaszt a „Bevezetés” c. fejezetben is említett közlemény: az antibiotikumok jelentős részéhez vény nélkül lehet hozzájutni ebben az országban (7).



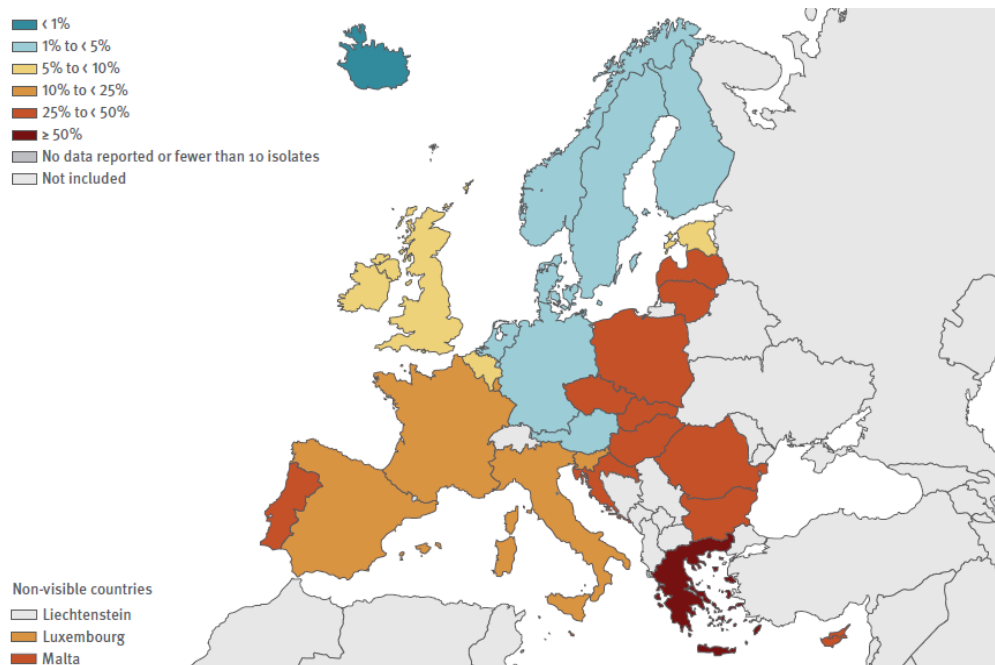
14. ábra. Fluorokinolon rezisztens invazív *E. coli* izolátumok százalékos eloszlását ábrázoló Európa térkép (2018) (243).



15. ábra. Fluorokinolon rezisztens invazív *K. pneumoniae* izolátumok százalékos eloszlását ábrázoló Európa térkép (2018) (243).



16. ábra. Fluorokinolon, harmadik generációs cefalosporin és aminoglikozid rezisztens invazív *E. coli* izolátumok százalékos eloszlását ábrázoló Európa térkép (2018) (243).



17. ábra. Fluorokinolon, harmadik generációs cefalosporin és aminoglikozid rezisztens invazív *K. pneumoniae* izolátumok százalékos eloszlását ábrázoló Európa térkép (2018) (243).

Eredményeink szerint az ST11 nemzetközi magas kockázatú klón minden törzse hordozta a *bla*_{CTX-M-15} ESBL gént, ami jól korrelál az irodalmi adatokkal, mivel a leggyakoribb ESBL gének a CTX-M típusú β -laktamázok az Enterobacterales rendben, amint erre korábban már utaltunk (170, 250). A közelmúltban megjelent egy bolgár tanulmány, melyben 82 ESBL-termelő *K. pneumoniae* és négy *K. oxytoca* izolátum közül a kollekció 87%-a rendelkezett CTX-M-15 génnel (251). A *K. pneumoniae* ST11 hazai megjelenéséről elsőként Damjanova és munkatársai számoltak be 2008-ban, és már e tanulmányban is széleskörűen elterjedt klónként jellemezték (163). Lengyelországban interregionális járványról számoltak be, amelyben az NDM-1 és CTX-M-15 termelő *K. pneumoniae* ST11 klón dominanciáját emelték ki (252). Mexikói kutatók pedig a gyermek- és felnőtt betegmintából származó ESBL-termelő izolátumok között tártak fel szemléletes különbségeket. A felnőttekből származó izolátumokban az SHV-típus volt a legelterjedtebb (81,6%), melyet a CTX-M-15 (44,9%) követett, míg a *qnr*-pozitív gyermekgyógyászati izolátumokban a CTX-M-15 volt a leggyakoribb ESBL gén (70,5%). Érdekes módon a *qnr*-determinánsok gyakorisága az *E. cloacae* izolátumok között volt a legmagasabb, melyet a *K. pneumoniae* és végül az *E. coli* követett. Megfigyelték továbbá, hogy a gyermekgyógyászati izolátumokban lényegesen kevesebbszer detektálható kromoszomális mutáció (250).

A CTX-M-15-termelő *K. pneumoniae* magas előfordulási arányát (30,2%) jól példázza a szarvasmarha tejből történt kimutatása is, ami tehát figyelmeztet az élelmiszerláncban történő terjedésére is (253). A gén széleskörű elterjedését számos további irodalmi adat bizonyítja. Egy 2019-ben megjelent barcelonai cikk vadon élő emlősök és madarak baktérium-hordozásának rendkívüli diverzitásáról számolt be. A legtöbb multirezisztens *K. pneumoniae* és *Citrobacter freundii* izolátum rezisztenciát mutatott fluorokinolonokkal, tetraciklinnel, szulfonamidokkal és aminoglikozidokkal szemben is. Az izolátumok 23%-ában *bla*_{SHV-12}, 18%-ában *bla*_{CTX-M-15} gén jelenlétét azonosították. A tanulmány legfontosabb célja az volt, hogy felhívja a figyelmet az antropogén nyomás környezetre gyakorolt hatásának monitorozására. Mind a *bla*_{CTX-M-15}, mind a *bla*_{SHV-12} jelenleg is a közösségből, valamint egészségügyi ellátásból származó klinikai minták legelterjedtebb génei Spanyolországban is, melyek országok közötti terjesztésének szempontjából – a spanyol kutatás következtetései alapján – a vándormadarak migrációja komoly problémát jelent. A madarakon kívül fontos kiemelni

az urbanizált környezethez alkalmazkodni képes emlősök (pl. sünök) antimikrobiális rezisztencia terjesztésében betöltött szerepét is (254-256).

A CTX-M-15 β -laktamázon kívül a CTX-M-14 a leggyakoribb variáns, amelyeket globálisan orvosi szempontból jelentős mikrobákban detektálnak. A különféle kórokozókban leírt számos ESBL közül a CTX-M, TEM és SHV típusok bizonyultak a legsikeresebbnek a terjedés szempontjából, amit eredményeinkkel mi is megerősítünk (257). A Gram-negatív baktériumokban az ampicillin elleni rezisztencia csaknem 90% - a TEM által kódolt géneknek köszönhető (258). Ez a típusú β -laktamáz (*bla*_{TEM-1A} vagy *bla*_{TEM-1B}) a WGS adatai alapján minden törzsünkben megtalálható volt.

5.4. A vizsgált *Klebsiella pneumoniae* törzsek klonalitása és az ST307 klón térnyerése

A nemzetközi magas kockázatú *K. pneumoniae* nagyklónokon kívül az ST307 megjelenése és terjedése is mindinkább felkeltette a tudományos publikum érdeklődését. A klón 2013-ban történt első leírása óta számos országban megjelent, köztük Olaszországban, az Egyesült Királyságban, Kolumbiában, Pakisztánban, Marokkóban, Koreában, Tunéziában, Kínában és Szerbiában (186, 259-267). Az ST307 magyarországi előfordulását mi jelentettük elsőként, mely a Villa és munkatársai által leírt ST307 klónnal nagyfokú hasonlóságot mutat (187, 266). Felmerül a kérdés, hogy vajon mi válthatta ki az multirezisztens kórokozók metamorfózisát az elmúlt évtizedekben. Számos kutató a virulenciafaktorok kulcsszerepét gyanította a siker hátterében, amelyek hozzájárultak a különböző kórokozók multirezisztens klónjainak/ST-inek megjelenéséhez. A *Clostridium difficile* 027 ribotípusú klónját leszámítva azonban egyetlen másik faj magas kockázatú klónja sem mutatott nagyobb virulenciát a kisebb klónokhoz képest; ez a megfigyelés tehát erős érvként szolgál a virulencián alapuló disszemináció cáfolására (268). Martínez és Baquero 2002-es közleményükben kihangsúlyozták az antibiotikum rezisztencia (virulenciával szembeni) prioritását a nemzetközi klónok szelekciójában (269). Kimutatták, hogy a fluorokinolonokkal szembeni magas szintű rezisztenciával járó fitnessz hatások közvetett növekedési előnyt jelentenek a magas kockázatú ESBL- termelő *K. pneumoniae* és *E. coli* számára. Füzi és munkatársai 2020-ban megjelent publikációjukban azt a konzekvenciát vonják le, hogy a rezisztens klónok megjelenése és sikeres elterjedése valószínűleg multifaktoriális

jelenség, azonban feltételezhető, hogy a fluorokinolonok kritikus szerepet játszanak ebben a folyamatban (91, 92, 188, 268, 270, 271).

Publikációnk 2019 eleji megjelenését követően a világ számos további országában jelentették a *K. pneumoniae* ST307 megjelenését klinikai, illetve környezeti mintákban (pl. szennyvízben) egyaránt. 2015 őszén egy 66 éves, cukorbetegségben, hepatitis C vírusfertőzésben és végstádiumú vesebetegségben szenvedő, hemodializált nőt vettek fel a Dominikai Köztársaság kórházába láz, anorexia, hidegrázás és myalgia tünetekkel. A 3. napon hemokultúrája pozitívnak bizonyult *K. pneumoniae*-ra, mely csupán polimixinekkal szemben mutatott érzékenységet. A páciens néhány hónappal ezt megelőzően egy Puerto Rico-i kórházban ápolták. A kezdeti javulás ellenére a beteg a felvételt követő 25. napon meghalt. A teljes genom szekvenálás feltárta, hogy az izolátum az ST307 szekvenciatípusú klónba tartozik, és szoros rokonságban áll (<185 SNP) több hasonló fenotípusú nemzetközi ST307 izolátummal. Érdekes módon legszorosabban (36 SNP) egy New York-i páciens izolátumához kapcsolódott, aki 2016-ban szintén Puerto Ricóban került kórházba (272). Ez a megállapítás felveti annak lehetőségét, hogy mindkét beteg ugyanabban a Puerto Rico-i kórházban fertőződött meg, és fertőzéseik később hazájukban alakultak ki (273).

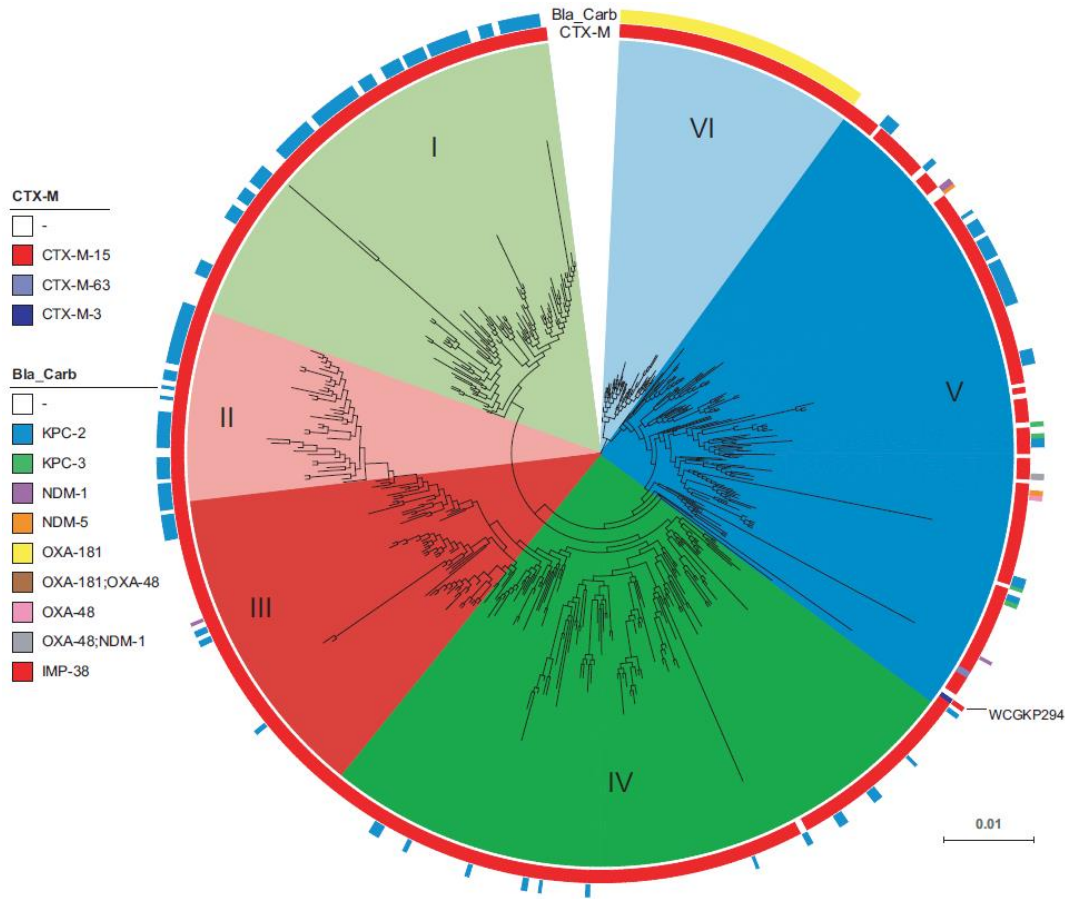
Az első, NDM-1, OXA-48 és CTX-M-15-termelő *K. pneumoniae* ST307 által okozott kórházi járványt Pomerániában jelentették, ami 2019. júniusától októberig tartott. A higiénés óvintézkedések ellenére egy északkelet-németországi egyetemi kórház, két másik kórház és egy rehabilitációs klinika is érintettek voltak a járványban, ami megerősíti, hogy a klón nagymértékben képes alkalmazkodni a kórházi környezethez. A klón rezisztenciagénjei között említik a *bla_{SHV28}-like*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{TEM-1B}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-48}*, *aac(3)-IIa-like*, *sul1*, *sul2*, *fosA-like*, *dfrA5*, *oqxA-like*, *oqxB-like* és *qnrS1* géneket, valamint a *gyrA83*, *parC80* mutációkat (274). A kromoszóma ezen pozícióiban az általunk azonosított ST307 klónban is detektálhatóak mutációk.

Az említett példákon kívül a Karib-térségben, az Egyesült Arab Emírségekben, Guineában, Kamerunban, Dél-Koreában, Tunéziában illetve Ecuadorban is jelentették a különböző típusú karbapenémáz- és ESBL- termelő ST307 megjelenését (275-277).

Wang és munkatársai tizennégy IMP-38-termelő ST307 *K. pneumoniae* törzset azonosított 2013 és 2016 között gyűjtött, szepszisben szenvedő újszülöttek mintái között. A *bla_{IMP}*-ről korábban nem számoltak be ST307 törzsekben; ez ösztönözte a kínai

kutatócsoportot a világ 19 országából származó, összesen 708 *K. pneumoniae* ST307 törzs genomjának hierarchikus Bayes-féle klaszterelemzésének elvégzésére (18. ábra). Az elemzés a szekvenciatípust földrajzi régiók alapján 6 csoportra osztotta. Az I.-IV. kládok az Egyesült Államok-beli izolátumok, a VI. klád dél-afrikai izolátumok adatait foglalja magába, míg az V. klád (amelybe Wang-ék WCGKP294 jelöléssel ellátott törzse is tartozik) Ausztráliából, Brazíliából, Kambodzsából, Kamerunból, Kínából, Kolumbiából, Franciaországból, Guineából, Iránból, Olaszországból, Nepálból, Hollandiából, Nigériából, Norvégiából, Pakisztánból, Thaiföldről, az Egyesült Királyságból, illetve bizonyos további Egyesült Államokból származó izolátumokat foglal magába (278, 279). Az I-IV., illetve VI. klád lokális jellegű, míg az V. klád sokkal inkább hasonlít a globális vonalhoz. Érdekes módon – a többi „globális” jelleget mutató ST307 törzssel ellentétben – a WCGKP294 nem hordozott QRDR mutációkat, és nem detektáltak IncFIIK/ IncFIBK replikonokat sem, de még a törzsek jelentős hányadára jellemző *bla*_{CTX-M-15} gén jelenléte sem volt kimutatható. Mindez arra utal, hogy az IMP-38-termelő ST307 törzsek valószínűsíthetően eltérő evolúciós útvonalon jutottak el a kedvező fitnessszel rendelkező klón kialakulásához. Vélhetően különböző antibiotikum-selektációs nyomás alatt voltak, ami magyarázhatja az aminosav-szubsztitúciók és mutációk hiányát, ami az egyik legfőbb genetikai különbség a „globális” ST307 genomokhoz képest. 95 „globális” ST307 genom vizsgálata azt mutatta, hogy a ParC 80I és a GyrA 83I mutációk 100% -ban konzerválódtak a genomban, továbbá egy kisebb klaszterben egy további GyrA 87N mutáció is észlelhető (277, 279).

A WCGKP294 törzs QRDR eredményei összhangban voltak az antibiotikum-érzékenységi teszt eredményeivel, mivel érzékenységet mutatott ciprofloxacinnal és levofloxaccinnal szemben is (279).



18. ábra. A *K. pneumoniae* ST307 genomok Bayes- féle filogenetikai rekonstrukciója. Az elemzésbe 708 ST307 genomot vontak be egy korábbi vizsgálat alapján (273). A filogenetikai elemzést végző szerzők a WCGKP294 törzset szekvenálták, melyet az ábrán külön jelöltek. CTX-M, cefotaximmal szembeni aktivitás; Bla_Carb, karbapenemáz gének (279).

Ahogy erre már a „Bevezetés” c. fejezetben is utaltunk, a mutációk leggyakrabban a szerint és egy savas aminosav maradékot (glutaminsav vagy aszparaginsav) érintik (55). A Kox37 esetén tapasztalt alacsony fluorokinolon MIC értékek és a mutációk hiánya – a kínai WCGKP294 törzshöz hasonló módon – összefüggést mutatnak. Az általunk vizsgált ST307 törzsben azonban a GyrA és ParC alegységekben is megfigyeltünk mutációkat. A *gyrA*-ban Ser83Ile, a *parC*-ben Ser80Ile, valamint Asn304Ser aminosavcserét eredményező mutáció is kimutatható volt, melyek magyarázzák a törzs fluorokinolonokkal szembeni magas MIC értékeit, továbbá sugallják a genom „globális” jellegét. A többi *K. pneumoniae* törzs QRDR-jában detektált Ser80Ile, Ser83Ile, Ser83Phe valamint Asp87Ala aminosav-szubsztitúció szintén a magas MIC értékek bizonyítékául

szolgál. Pham és munkatársai összegyűjtötték a bizonyos Gram-negatív és Gram-pozitív fajok DNS-giráz és topoizomeráz IV génjeiben detektált leggyakoribb mutációkat. Ezek az adatok szintén alátámasztják, hogy az *E. coli*, a *Salmonella spp.* és a *P. mirabilis* fajokban (és vélhetően általánosan az *Enterobacteriaceae* családban) a *gyrA* esetén a 83-as pozícióban lévő szerin, a *parC* esetén a 80-as pozícióban lévő szerin szubsztitúciója azonosítható a leggyakrabban (9).

A vizsgált *K. pneumoniae* törzsek között három pulzotípust azonosítottunk: KP053, S PT és KP197. Két ST11 izolátum (Kpn33 és Kpn125) a KP053 pulzotípushoz tartozott, a harmadik ST11 törzset (Kpn115) S PT-ként detektáltuk, amelyet korábban már jelentettek Magyarországon (163). Egy korábbi hazai vizsgálat során 312 *K. pneumoniae* izolátum PFGE-tipizálását végezték el, mely 12 különböző pulzotípust specifikált. Az izolátumok közül 262 KP053 és 38 KP070 az ST11 szekvenciatípusba tartozott (280). Ezek az adatok a KP053/ST11 klón hazánkban való elterjedését bizonyítják. A *K. pneumoniae* ST307 (Kpn47) a KP197 pulzotípusba került, ezt a típust azonban csak 2014-ben regisztrálta az NNK. 2015 óta Magyarországon összesen 30 törzset adminisztráltak ezzel a pulzotípussal (nem publikált adatok alapján).

A plazmid replikon típusokat tekintve, az IncFIB(K) minden törzsünk esetében azonosítható volt, ami megerősíti a korábbi vizsgálatokat. Egy tanulmányban a vizsgált klinikai *K. pneumoniae* izolátumok többségében (91%) IncFII és IncFIB replikon típusok jelenlétét igazolták. (281). A *bla_{CTX-M-15}* rendszerint IncF típusú plazmidokon helyezkedik el, ami növeli a rezisztencia-determinánsok prevalenciáját a *K. pneumoniae* izolátumok között. Az IncF-hez tartozó, eltérő replikontípusokkal rendelkező rezisztencia plazmidok (például FIA, FIB és FII) képesek rezisztencia géneket megszerezni, majd gyorsan terjedni az *Enterobacteriaceae*, különösen a fajon belüli klónok között, ezért is nevezik „járványrezisztencia-plazmidoknak” (194). Ennek ellenére arról is beszámoltak, hogy a *bla_{CTX-M-15}* gén megtalálható az IncN, IncR vagy IncL/M replikontípusú plazmidokon is (24, 282-285).

A qPCR módszerrel vizsgált *qnr*, valamint *oqxA* és *oqxB* relatív expressziós szintek interpretálásakor arra a következtetésre jutottunk, hogy a *K. oxytoca* esetében a *qnrA1* jelenléte és (a *qnr* gének között a legalacsonyabbnak mutatózó) expressziós szintje csökkentette a kinolonok iránti érzékenységet. A *K. pneumoniae* ST11 és ST307 klónok levofloxacin és moxifloxacin MIC értékei korreláltak a *qnr* és *oqxAB* expressziós

szintekkel. Az *oqx*B expressziója minden törzs esetén magasabb az *oqx*A-hoz képest, ami egyezést mutatott egy 2018-as hazai publikáció adataival (286). A Qnr fehérjék további előnyös tulajdonsága a toxin-antitoxin hatással magyarázható. A Qnr fehérjéket antitoxinoknak tekintik, amelyek megvédik a DNS-giráz és topoizomeráz IV enzimeket a természetesen előforduló toxinoktól. Ezt az elméletet Ellington és Woodford (2006) írta le, és fontos megemlíteni, hogy a nemzetközileg elterjedt, magas kockázatú klónokban különösen fontos szerep társítható ezen Qnr fehérjék jelenlétéhez (287). A fluorokinolon rezisztencia kialakulása során a PMQR determinánsok szerepet játszanak a csökkent érzékenységben, és alacsony szintű fluorokinolon rezisztenciát tartanak fenn (288). A QRDR kromoszomális mutációi révén magas szintű fluorokinolon rezisztencia alakul ki, de a PMQR gének expressziója fennmarad, melyhez tehát jelentős funkció társítható (így pl. az említett DNS-giráz és a topoizomeráz IV enzimek „antitoxikus” védelmének biztosítása) (87, 119, 289).

A magas kockázatú nagyklónok és a sporadikus elterjedésű kis klónok közötti meghatározó különbség abban rejlik, hogy az izolátumok képesek-e energetikailag kedvező genetikai változások (mutációk) kialakítására a DNS-girázban és az topoizomerázban IV-ben (91). A főbb ST (ST11, ST15, ST147) MDR *K. pneumoniae* törzsek sikere összefüggésben volt azzal a képességgel, hogy legalább két energetikailag kedvező QRDR mutációt fejlesszen ki. A főbb ST törzsekkel ellentétben a kisebb ST izolátumok erre vagy képtelenek voltak, vagy csak egyetlen változást fejlesztettek ki (188). Ez a kapacitás előfeltételnek tűnik: a sikeres klónoknak képesnek kell lenniük olyan mutációk kialakítására, amelyek magas szintű rezisztenciát biztosítanak a fluorokinolonokkal szemben anélkül, hogy a fitnesszt veszélyeztetnék (92). Ezenkívül jelentették a „kettős szerin” QRDR mutációkkal járó előnyöket is, amelyek az ST307 klónra is jellemző (91, 277). A virulencia faktorok csak másodlagos szerepet játszanak a baktériumok klonális dinamikájában a multirezisztenciához viszonyítva; utóbbi kialakításában a fluorokinolonok átgondolatlan alkalmazása kulcsszerepet játszik (268).

A fluorokinolonok szerepe sajátos fitnessz-hatásuk miatt egyedülálló. Vélhetően egyetlen baktérium sem marad „immunis” a fluorokinolonok hatásával szemben evolúciós dinamikájuk kialakulása során. Következésképpen - különös tekintettel a betegellátási helyszínekre -, a fluorokinolonok használatának csökkentésére, megfontolt alkalmazására van szükség, ami várhatóan a nemzetközi nagyklónok kialakulásának és

terjedésének visszaszorítását eredményezi (268, 290). A PMQR-determinánsok növekvő prevalenciáját figyelemfelhívásként kell tekinteni, mivel olyan genetikai platformoknak tekinthetők, amelyek nagymértékben elősegítik a több antibiotikumcsoporttal szemben rezisztens izolátumok kisselektálódását és világszintű térhódítását. A *K. pneumoniae* ST307 kórházi környezetben való megjelenése és lehetséges terjesztése szintén közegészségügyi aggályokat vet fel, ezért a magas kockázatú és potenciálisan magas kockázatú klónok folyamatos monitorozására van szükség. Mindezekon kívül további terhet ró az egészségügyre az *Enterobacteriaceae* család karbapenemáz-termelő törzseinek mind gyakoribb izolálása is, ami szintén veszélyezteti az antibiotikumok alkalmazhatóságát és általános terápiás hasznát; továbbá költségterhet ró az egészségügyi ellátórendszerre is. A multirezisztens kórokozók terjedését az infekciókontroll szigorú betartásával lehet mérsékelni. Az egészségügyi szakemberek, különösen az ápolók képzése rendkívül fontos a fertőzések ellenőrzése és megelőzése szempontjából (291, 292). A műtétek során alkalmazott invazív eszközök és orvosi műszerek megfelelő sterilizálására és fertőtlenítésére szintén nagy hangsúlyt kell fektetni; az irányelvek be nem tartása ugyanis növeli a nosokomiális fertőzések kockázatát (293, 294). Nagyon nagy a különbség azonban az iránymutatások megléte és azok tényleges végrehajtása között (295).

A teljes genomszekvenálás elengedhetetlen eszköz, amely gyors és gazdag adatokat szolgáltat a rezisztencia génekről, a mobilis genetikai elemekről és a virulencia profilokról, továbbá rendkívül hasznos módszer az antibiotikum rezisztencia nyomon követésére, terjedésére nézve. A WGS által kinyert szekvenciaadatokat a tudományos közélet számára elérhetővé tettük az NCBI Genbank adatbázisába történő feltöltéssel, mellyel szélesíteni kívántuk a multirezisztens kórokozók klónspektrumának metamorfózisával kapcsolatos ismereteket.

6. Következtetések, új eredmények

A fluorokinolonokat – az 1960-as évek elején történt felfedezésük óta – világszerte használják közösségben szerzett, valamint súlyos kórházban szerzett fertőzések kezelésére. Ezen antibiotikumok széleskörű használata azonban elősegíti a fluorokinolon rezisztens törzsek kialakulását és növeli a PMQR-determinánsok prevalenciáját, ami pedig elősegíti a multirezisztens klónok kiszelektálódását és világszintű térhódítását. A már jól ismert, világszerte elterjedt, magas kockázatú nagyklónokon kívül mind gyakrabban számolnak be a *K. pneumoniae* ST307 kórházi környezetben való megjelenéséről is, mely terjedése szintén komoly problémát vet fel az egészségügyi környezetben, terápiás kihívás elé állítva a klinikumban dolgozó szakembereket.

- Az általunk vizsgált izolátumok species szerinti százalékos eloszlása hűen tükrözi az ESKAPE baktériumok kórházi infekciókban betöltött szerepét és fontosságát. Az ESBL-termelés igazolásával, valamint a vizsgált törzsek 87,4%-ában előforduló, legalább egy típusú fluorokinolonnal szembeni rezisztencia kimutatásával kiegészítjük és megerősítjük az irodalmi adatokat.
- Kutatásunk során kimutattuk, hogy a 103 izolátum között a legelterjedtebb PMQR gén az *aac(6')-Ib-cr* volt, melynek prevalenciája drasztikus növekedést mutat a gén első magyarországi jelentése óta (26,6% -ról 68,8% -ra nőtt).
- A *Klebsiella spp.* törzsek mikrodilúciós vizsgálata során kapott fluorokinolon MIC (mg/L) értékek, valamint a detektált rezisztenciagének megléte (illetve hiánya) között egyértelmű korreláció nem állapítható meg.
- Eredményeink szintén bizonyítják a KP053 / ST11 klón hazánkban való elterjedését.
- Jelen tanulmányunkkal elsőként igazoljuk az ST307-es klón magyarországi megjelenését.
- Elsőként számolunk be *qnrA1* hordozásról *K. oxytoca* ST52 esetében.
- Megerősítjük a *bla_{CTX-M-15}* gén széleskörű előfordulását a magas kockázatú és potenciális nagyklónok között.
- Igazoljuk az IncFIB(K) replikontípusú plazmidok *K. pneumoniae* klónokban való elterjedését.

- Minden törzs esetében az oqxB overexpresszióját figyelhettük meg, ami egybevág korábbi hazai adatokkal.
- A WGS által kinyert szekvenciaadatokat feltöltöttük az NCBI Genbank adatbázisába, elérhetővé téve különböző epidemiológiai és filogenetikai kutatások számára.

7. Összefoglalás

A fluorokinolonok széles spektrumú baktericid antibiotikumok, amelyek kiváló aktivitást mutatnak Gram-negatív baktériumokkal szemben. Széles körben használják különféle fertőzések kezelésére, melynek eredményeként a rezisztencia számos *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumfaj esetén általánossá vált. A kinolonokkal szembeni rezisztencia fő mechanizmusa a DNS-giráz és topoizomeráz IV enzimeket kódoló kromoszomális génekben felhalmozódó mutációkkal magyarázható. Az újabban felfedezett plazmidon kódolt kinolon rezisztencia (PMQR) determinánsok a rezisztencia elérésében szintén szerepet játszanak. A fluorokinolonokkal szembeni magas szintű rezisztenciával járó „fitnessz előny” hozzájárult az ESBL-termelő *E. coli* és *Klebsiella spp.* nemzetközi klónjainak szelekciójához és világméretű elterjedéséhez. Az elmúlt évtizedekben a multirezisztens *K. pneumoniae* által okozott kórházi fertőzések prevalenciája drámai módon megnőtt, jelentős terápiás nehézségeket okozva, míg a *K. oxytoca*-t kórházi fertőzésekben ritkábban izolálták.

Mindezek fényében kutatásunk során hemokultúrából izolált ESBL-termelő *Enterobacteriaceae* törzsek fenotípusos jellemzésére fókuszáltunk. A prelimináris vizsgálatokat követően kutatásunk középpontjában négy *K. pneumoniae* és egy *K. oxytoca* törzs fluorokinolon-rezisztencia vizsgálata állt. A kiválasztott törzsekben molekuláris tipizálást, valamint teljes genom szekvenálást végeztünk. Az MLST feltárta, hogy három *K. pneumoniae* törzs a nemzetközi, nagy kockázatú ST11-be tartozik, egy pedig az ST307-be, amelyről az utóbbi években potenciális magas kockázatú klónként számoltak be, és amely növekedő elterjedést mutat, míg a *K. oxytoca*-t ST52-ként azonosítottuk. A *K. pneumoniae* ST11-et világszerte gyakran kimutatták sikeres kórokozóként, és döntő szerepet játszik a kórházi fertőzésekben. Legjobb tudomásunk szerint tanulmányunk az ST307 első magyarországi leírása. Továbbá ez az első jelentés a *K. oxytoca* ST52 szekvenciatípusban detektált *qnr* (PMQR) gén jelenlétéről is.

A PMQR gének megnövekedett diverzitása megkönnyíti ezen klónok terjedését. Az irodalmi adatok számos, magas kockázatú és potenciális magas kockázatú *K. pneumoniae* klón által okozott kórházi járványról számolnak be, ezért ezen multirezisztens klónok folyamatos monitorozása szükséges.

8. Summary

Fluoroquinolones are broad-spectrum bactericidal antibiotics that have an excellent activity against Gram-negative bacteria. These antibiotics are widely used agents to treat various infections, as a result resistance became common in numerous bacteria belonging to the family *Enterobacteriaceae*. The main mechanism of quinolone resistance is the accumulation of mutations in the chromosomal genes encoding DNA-gyrase and topoisomerase IV enzymes. Furthermore, plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinants were discovered as new additional ways to achieve resistance. Beneficial „fitness cost” associated with high-level resistance to fluoroquinolones contributed to the selection and worldwide dissemination of the international clones of ESBL-producing *E. coli* and *Klebsiella spp.* Over the last decades prevalence of nosocomial infections caused by multiresistant *K. pneumoniae* have drastically increased causing significant therapeutic difficulties, while *K. oxytoca* has been isolated in hospital infections with less frequency.

In light of all this in our research we focused on pheno- and genotypic characterization of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* strains isolated from blood cultures. Following preliminary examinations our main purpose was to investigate fluoroquinolone resistance in certain selected strains, thus four *K. pneumoniae* and a single *K. oxytoca*. Molecular typing as well as whole-genome sequencing were performed for these strains. MLST revealed that three *K. pneumoniae* strains belonged to international high-risk ST11 and one to ST307 that has been reported as a potential high-risk clone in recent years and shows an increasing dissemination, whereas *K. oxytoca* was identified as ST52. *K. pneumoniae* ST11 has been frequently detected worldwide as a successful pathogen and plays a crucial role in nosocomial infections. To the best of our knowledge, our study is the first report of ST307 in Hungary. In addition to that this is the first description of the *qnr* (PMQR) gene in *K. oxytoca* ST52.

Increased diversity of PMQR genes facilitates spread of these clones. Based on literature data there are several hospital outbreaks caused by high-risk and potential high-risk *K. pneumoniae* clones, therefore, continuous monitoring of these multiresistant clones is necessary.

9. Irodalomjegyzék

1. Ligon BL. (2004) Penicillin: its discovery and early development. *Semin Pediatr Infect Dis*, 15: 52-57.
2. Abraham EP, Chain E. (1988) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis*, 10: 677-678.
3. Calhoun JH, Murray CK, Manring MM. (2008) Multidrug-resistant organisms in military wounds from Iraq and Afghanistan. *Clin Orthop Relat Res*, 466: 1356-1362.
4. Spellberg B, Gilbert DN. (2014) The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clin Infect Dis*, 59 Suppl 2: S71-75.
5. Bartlett JG, Gilbert DN, Spellberg B. (2013) Seven ways to preserve the miracle of antibiotics. *Clin Infect Dis*, 56: 1445-1450.
6. Sengupta S, Chattopadhyay MK, Grossart HP. (2013) The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol*, 4: 47.
7. Gravningen K, Field N, Blix HS, Asfeldt AM, Smabrekke L. (2020) Non-prescription purchase of antibiotics during travel abroad among a general adult population in Norway: Findings from the seventh Tromso Study. *PLoS One*, 15: e0228792.
8. Liu H, Mulholland SG. (2005) Appropriate antibiotic treatment of genitourinary infections in hospitalized patients. *Am J Med*, 118 Suppl 7A: 14S-20S.
9. Pham TDM, Ziora ZM, Blaskovich MAT. (2019) Quinolone antibiotics. *Medchemcomm*, 10: 1719-1739.
10. Piddock LJ. (1998) Fluoroquinolone resistance: overuse of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance. *BMJ*, 317: 1029-1030.
11. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev*, 22: 664-689.
12. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. (2014) Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr*, 2.
13. Piekarska K, Wolkowicz T, Zacharczuk K, Rzeczowska M, Chrost A, Bareja E, Olak M, Gierczynski R. (2015) Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-

- resistant clinical Enterobacteriaceae isolated in a tertiary hospital in Warsaw, Poland. *Int J Antimicrob Agents*, 45: 238-243.
14. Hooper DC, Jacoby GA. (2015) Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci*, 1354: 12-31.
 15. Paterson DL, Bonomo RA. (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 18: 657-686.
 16. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. (1983) Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11: 315-317.
 17. Pitout JD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. (2005) Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *J Antimicrob Chemother*, 56: 52-59.
 18. Codjoe FS, Donkor ES. (2017) Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci (Basel)*, 6.
 19. World Health Organization. WHO releases the 2019 AWaRe Classification Antibiotics. https://www.who.int/medicines/news/2019/WHO_releases2019AWaRe_classification_antibiotics/en/ Hozzáférés dátuma: 2020.09.15.
 20. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*, 39: 309-317.
 21. Rezai MS, Bagheri-Nesami M, Nikkhah A. (2017) Catheter-related urinary nosocomial infections in intensive care units: An epidemiologic study in North of Iran. *Caspian J Intern Med*, 8: 76-82.
 22. Russotto V, Cortegiani A, Raineri SM, Giarratano A. (2015) Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *J Intensive Care*, 3: 54.
 23. Khan HA, Ahmad A, Mehboob R. (2015) Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pac J Trop Biomed*, 5: 509-514.

24. Xu H, Huo C, Sun Y, Zhou Y, Xiong Y, Zhao Z, Zhou Q, Sha L, Zhang B, Chen Y. (2019) Emergence and molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring bla CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases causing ventilator-associated pneumonia in China. *Infect Drug Resist*, 12: 33-43.
25. Bereket W, Hemalatha K, Getenet B, Wondwossen T, Solomon A, Zeynudin A, Kannan S. (2012) Update on bacterial nosocomial infections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 16: 1039-1044.
26. Azargun R, Sadeghi MR, Soroush Barhaghi MH, Samadi Kafil H, Yeganeh F, Ahangar Oskouee M, Ghotaslou R. (2018) The prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and ESBL-production in Enterobacteriaceae isolated from urinary tract infections. *Infect Drug Resist*, 11: 1007-1014.
27. Freystatter C, Radtke C, Ihra G, Thalhammer F, Fochtmann-Frana A. (2018) Sepsis caused by multidrug-resistant *klebsiella pneumoniae* infection in a 23-year-old burn patient: case report and literature review. *Ann Burns Fire Disasters*, 31: 113-117.
28. World Health Organization. Prevention of hospital-acquired infections: a practical guide. World Health Organization, Geneva, Switzerland, (2002).
29. Ma YX, Wang CY, Li YY, Li J, Wan QQ, Chen JH, Tay FR, Niu LN. (2020) Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections. *Adv Sci (Weinh)*, 7: 1901872.
30. Rice LB. (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis*, 197: 1079-1081.
31. Országos Epidemiológiai Központ. Az Országos Epidemiológiai Központ tájékoztatója a Nemzeti Nosocomialis Surveillance Rendszer 2017. évi eredményeiről. https://www.antsz.hu/data/cms88661/NNSR_2017.pdf
Hozzáférés dátuma: 2020.09.15.
32. Országos Epidemiológiai Központ. Az Országos Epidemiológiai Központ tájékoztatója a Nemzeti Nosocomialis Surveillance Rendszer 2018. évi eredményeiről. https://www.antsz.hu/data/cms93503/NNSR_2018.pdf
Hozzáférés dátuma: 2020.09.15.

33. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. (2013) *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health*, 10: 6235-6254.
34. Manning S, Lautenbach E, Tolomeo P, Han JH. (2015) Risk factors for infection with *Escherichia coli* in nursing home residents colonized with fluoroquinolone-resistant *E. coli*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 36: 575-577.
35. Micenkova L, Benova A, Frankovicova L, Bosak J, Vrba M, Sevcikova A, Kmetova M, Smajs D. (2017) Human *Escherichia coli* isolates from hemocultures: Septicemia linked to urogenital tract infections is caused by isolates harboring more virulence genes than bacteraemia linked to other conditions. *Int J Med Microbiol*, 307: 182-189.
36. Daga AP, Koga VL, Soncini JGM, de Matos CM, Perugini MRE, Pelisson M, Kobayashi RKT, Vespero EC. (2019) *Escherichia coli* Bloodstream Infections in Patients at a University Hospital: Virulence Factors and Clinical Characteristics. *Front Cell Infect Microbiol*, 9: 191.
37. Johnson JR, Gajewski A, Lesse AJ, Russo TA. (2003) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive nonurinary infections. *J Clin Microbiol*, 41: 5798-5802.
38. Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmiecik A, Frej-Madrzak M, Ksiazczyk M, Bugla-Ploskonska G, Choroszy-Krol I. (2019) Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathog*, 11: 10.
39. Johnson TJ, Nolan LK. (2009) Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73: 750-774.
40. Toval F, Kohler CD, Vogel U, Wagenlehner F, Mellmann A, Fruth A, Schmidt MA, Karch H, Bielaszewska M, Dobrindt U. (2014) Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *J Clin Microbiol*, 52: 407-418.
41. Talan DA, Takhar SS, Krishnadasan A, Abrahamian FM, Mower WR, Moran GJ, Group EMINS. (2016) Fluoroquinolone-Resistant and Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Infections in Patients with Pyelonephritis, United States(1). *Emerg Infect Dis*, 22.

42. Garcia-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI, Robino L, Cordeiro NF, Varela A, Algorta G, Gutkind G, Ayala JA, Vignoli R. (2011) Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother*, 66: 1725-1729.
43. Rodriguez-Martinez JM, Cano ME, Velasco C, Martinez-Martinez L, Pascual A. (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother*, 17: 149-182.
44. Monarrez R, Braun M, Coburn-Flynn O, Botelho J, Odetoyin BW, Otero-Vera JI, Quartey NKE, Peixe L, Aboderin AO, Okeke IN. (2019) A large self-transmissible resistance plasmid from Nigeria contains genes that ameliorate a carrying cost. *Sci Rep*, 9: 19624.
45. Podschun R, Ullmann U. (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*, 11: 589-603.
46. Kloos WE, Musselwhite MS. (1975) Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol*, 30: 381-385.
47. Casewell M, Phillips I. (1977) Hands as route of transmission for *Klebsiella* species. *Br Med J*, 2: 1315-1317.
48. Singh L, Cariappa MP, Kaur M. (2016) *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen? *Med J Armed Forces India*, 72: S59-S61.
49. Li L, Huang H. (2017) Risk factors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: A single-center retrospective study in China. *Medicine (Baltimore)*, 96: e7924.
50. Starzyk-Luszcz K, Zielonka TM, Jakubik J, Zycinska K. (2017) Mortality Due to Nosocomial Infection with *Klebsiella pneumoniae* ESBL<sup>^{/>}. *Adv Exp Med Biol*, 1022: 19-26.
51. Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. (2017) Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *J Infect Dis*, 215: S18-S27.
52. Onori R, Gaiarsa S, Comandatore F, Pongolini S, Brisse S, Colombo A, Cassani G, Marone P, Grossi P, Minoja G, Bandi C, Sasser D, Toniolo A. (2015)

- Tracking Nosocomial *Klebsiella pneumoniae* Infections and Outbreaks by Whole-Genome Analysis: Small-Scale Italian Scenario within a Single Hospital. *J Clin Microbiol*, 53: 2861-2868.
53. Domenico P, Salo RJ, Cross AS, Cunha BA. (1994) Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 62: 4495-4499.
 54. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Alberti S, Bengoechea JA. (2004) Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*, 72: 7107-7114.
 55. Jacoby GA. (2005) Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 2: S120-126.
 56. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. (2011) Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 35: 736-755.
 57. Al-Agamy MH, Aljallal A, Radwan HH, Shibl AM. (2018) Characterization of carbapenemases, ESBLs, and plasmid-mediated quinolone determinants in carbapenem-insensitive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh hospitals. *J Infect Public Health*, 11: 64-68.
 58. Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. (1962) 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. *J Med Pharm Chem*, 91: 1063-1065.
 59. Emmerson AM, Jones AM. (2003) The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother*, 51 Suppl 1: 13-20.
 60. Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Itoh T, Tomizawa JI. (1977) Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74: 4772-4776.
 61. Sharma PC, Jain A, Jain S. (2009) Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Pol Pharm*, 66: 587-604.
 62. Vardakas KZ, Siempos II, Grammatikos A, Athanassa Z, Korbila IP, Falagas ME. (2008) Respiratory fluoroquinolones for the treatment of community-acquired pneumonia: a meta-analysis of randomized controlled trials. *CMAJ*, 179: 1269-1277.

63. Blondeau JM. (2004) Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Surv Ophthalmol*, 49 Suppl 2: S73-78.
64. Van Caekenberghe DL, Pattyn SR. (1984) In vitro activity of ciprofloxacin compared with those of other new fluorinated piperaziny-substituted quinoline derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*, 25: 518-521.
65. El Solh AA, Alhajhusain A. (2009) Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Antimicrob Chemother*, 64: 229-238.
66. 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.
67. Wang H, Dzink-Fox JL, Chen M, Levy SB. (2001) Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 1515-1521.
68. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. (2014) Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53: 1565-1574.
69. Tillotson GS. (1996) Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J Med Microbiol*, 44: 320-324.
70. Domagala JM. (1994) Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother*, 33: 685-706.
71. Fillastre JP, Leroy A, Moulin B, Dhib M, Borsa-Lebas F, Humbert G. (1990) Pharmacokinetics of quinolones in renal insufficiency. *J Antimicrob Chemother*, 26 Suppl B: 51-60.
72. Verbeeck RK. (2008) Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with hepatic dysfunction. *Eur J Clin Pharmacol*, 64: 1147-1161.
73. Czock D, Husig-Linde C, Langhoff A, Schopke T, Hafer C, de Groot K, Swoboda S, Kuse E, Haller H, Fliser D, Keller F, Kielstein JT. (2006) Pharmacokinetics of moxifloxacin and levofloxacin in intensive care unit patients who have acute renal failure and undergo extended daily dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1: 1263-1268.
74. Hooper DC. (1999) Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs*, 58 Suppl 2: 6-10.
75. Hooper DC. (2001) Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. *Clin Infect Dis*, 32 Suppl 1: S9-S15.

76. Tretter EM, Berger JM. (2012) Mechanisms for defining supercoiling set point of DNA gyrase orthologs: II. The shape of the GyrA subunit C-terminal domain (CTD) is not a sole determinant for controlling supercoiling efficiency. *J Biol Chem*, 287: 18645-18654.
77. Aldred KJ, Schwanz HA, Li G, McPherson SA, Turnbough CL, Jr., Kerns RJ, Osheroff N. (2013) Overcoming target-mediated quinolone resistance in topoisomerase IV by introducing metal-ion-independent drug-enzyme interactions. *ACS Chem Biol*, 8: 2660-2668.
78. Drlica K, Hiasa H, Kerns R, Malik M, Mustaev A, Zhao X. (2009) Quinolones: action and resistance updated. *Curr Top Med Chem*, 9: 981-998.
79. Smith HJ, Nichol KA, Hoban DJ, Zhanel GG. (2002) Dual activity of fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae*: the facts behind the claims. *J Antimicrob Chemother*, 49: 893-895.
80. Wang M, Jacoby GA, Mills DM, Hooper DC. (2009) SOS regulation of *qnrB* expression. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 821-823.
81. Exner M, Bhattacharya S, Christiansen B, Gebel J, Goroncy-Bermes P, Hartemann P, Heeg P, Ilchner C, Kramer A, Larson E, Merckens W, Mielke M, Oltmanns P, Ross B, Rotter M, Schmithausen RM, Sonntag HG, Trautmann M. (2017) Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? *GMS Hyg Infect Control*, 12: Doc05.
82. Ruppe E, Woerther PL, Barbier F. (2015) Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care*, 5: 61.
83. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. (2010) The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2: a000414.
84. Miller SI. (2016) Antibiotic Resistance and Regulation of the Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Barrier by Host Innate Immune Molecules. *mBio*, 7.
85. Kim ES, Hooper DC. (2014) Clinical importance and epidemiology of quinolone resistance. *Infect Chemother*, 46: 226-238.
86. Fabrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. (2009) Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol*, 2: 40-61.

87. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJ. (2014) Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol*, 22: 438-445.
88. Hooper DC, Jacoby GA. (2016) Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6.
89. Barnard FM, Maxwell A. (2001) Interaction between DNA gyrase and quinolones: effects of alanine mutations at GyrA subunit residues Ser(83) and Asp(87). *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 1994-2000.
90. Willmott CJ, Maxwell A. (1993) A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob Agents Chemother*, 37: 126-127.
91. Fuzi M, Szabo D, Csercsik R. (2017) Double-Serine Fluoroquinolone Resistance Mutations Advance Major International Clones and Lineages of Various Multi-Drug Resistant Bacteria. *Front Microbiol*, 8: 2261.
92. Fuzi M. (2016) Dissimilar Fitness Associated with Resistance to Fluoroquinolones Influences Clonal Dynamics of Various Multiresistant Bacteria. *Front Microbiol*, 7: 1017.
93. Fernandez L, Hancock RE. (2012) Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev*, 25: 661-681.
94. Bolla JM, Alibert-Franco S, Handzlik J, Chevalier J, Mahamoud A, Boyer G, Kiec-Kononowicz K, Pages JM. (2011) Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Lett*, 585: 1682-1690.
95. Correia S, Hebraud M, Chafsey I, Chambon C, Viala D, Torres C, de Toro M, Capelo JL, Poeta P, Igrejas G. (2016) Impacts of experimentally induced and clinically acquired quinolone resistance on the membrane and intracellular subproteomes of *Salmonella Typhimurium* DT104B. *J Proteomics*, 145: 46-59.
96. Correia S, Poeta P, Hebraud M, Capelo JL, Igrejas G. (2017) Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J Med Microbiol*, 66: 551-559.

97. Davin-Regli A, Pages JM. (2015) *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol*, 6: 392.
98. Charrel RN, Pages JM, De Micco P, Mallea M. (1996) Prevalence of outer membrane porin alteration in beta-lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 40: 2854-2858.
99. Nikaido H, Takatsuka Y. (2009) Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim Biophys Acta*, 1794: 769-781.
100. Perez A, Poza M, Fernandez A, Fernandez Mdel C, Mallo S, Merino M, Rumbo-Feal S, Cabral MP, Bou G. (2012) Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 56: 2084-2090.
101. Piddock LJ. (2006) Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*, 4: 629-636.
102. Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L. (2011) Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 55: 921-924.
103. Mallea M, Chevalier J, Bornet C, Eyraud A, Davin-Regli A, Bollet C, Pages JM. (1998) Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology (Reading)*, 144 (Pt 11): 3003-3009.
104. Pakzad I, Zayyen Karin M, Taherikalani M, Boustanshenas M, Lari AR. (2013) Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn patients. *GMS Hyg Infect Control*, 8: Doc15.
105. Piddock LJ. (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 19: 382-402.
106. Grkovic S, Brown MH, Skurray RA. (2002) Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66: 671-701, table of contents.
107. Davies J, Davies D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74: 417-433.

108. Jacoby GA, Chow N, Waites KB. (2003) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 559-562.
109. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. (2006) The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis*, 6: 629-640.
110. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351: 797-799.
111. Martinez-Martinez L, Pascual A, Garcia I, Tran J, Jacoby GA. (2003) Interaction of plasmid and host quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother*, 51: 1037-1039.
112. Xue G, Li J, Feng Y, Xu W, Li S, Yan C, Zhao H, Sun H. (2017) High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Pediatric Patients in China. *Microb Drug Resist*, 23: 107-114.
113. Tepekule B, Abel Zur Wiesch P, Kouyos RD, Bonhoeffer S. (2019) Quantifying the impact of treatment history on plasmid-mediated resistance evolution in human gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116: 23106-23116.
114. Yan L, Liu D, Wang XH, Wang Y, Zhang B, Wang M, Xu H. (2017) Bacterial plasmid-mediated quinolone resistance genes in aquatic environments in China. *Sci Rep*, 7: 40610.
115. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. (2006) Prevalence in the United States of *aac(6)-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 3953-3955.
116. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. (2008) Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 1564-1566.
117. Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. (2009) *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 3582-3584.
118. Tran JH, Jacoby GA. (2002) Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 5638-5642.

119. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. (2005) Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 118-125.
120. Zhao X, Drlica K. (2001) Restricting the selection of antibiotic-resistant mutants: a general strategy derived from fluoroquinolone studies. *Clin Infect Dis*, 33 Suppl 3: S147-156.
121. Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC. (2003) Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother*, 47: 2242-2248.
122. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. (2012) Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Front Microbiol*, 3: 24.
123. Hata M, Suzuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S, Sakae K. (2005) Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 801-803.
124. Jacoby GA, Walsh KE, Mills DM, Walker VJ, Oh H, Robicsek A, Hooper DC. (2006) qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 1178-1182.
125. Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, Hooper DC, Wang M. (2009) New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 1892-1897.
126. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. (2009) qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 603-608.
127. Fonseca EL, Dos Santos Freitas F, Vieira VV, Vicente AC. (2008) New qnr gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerg Infect Dis*, 14: 1129-1131.
128. Zhang Y, Zheng Z, Chan EW, Dong N, Xia X, Chen S. (2018) Molecular Characterization of qnrVC Genes and Their Novel Alleles in *Vibrio* spp. Isolated from Food Products in China. *Antimicrob Agents Chemother*, 62.

129. Albornoz E, Tijet N, De Belder D, Gomez S, Martino F, Corso A, Melano RG, Petroni A. (2017) qnrE1, a Member of a New Family of Plasmid-Located Quinolone Resistance Genes, Originated from the Chromosome of Enterobacter Species. *Antimicrob Agents Chemother*, 61.
130. Peterson E, Kaur P. (2018) Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Front Microbiol*, 9: 2928.
131. Lautenbach E, Strom BL, Bilker WB, Patel JB, Edelstein PH, Fishman NO. (2001) Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis*, 33: 1288-1294.
132. Mammeri H, Van De Loo M, Poirel L, Martinez-Martinez L, Nordmann P. (2005) Emergence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* in Europe. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 71-76.
133. Vetting MW, Park CH, Hegde SS, Jacoby GA, Hooper DC, Blanchard JS. (2008) Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant. *Biochemistry*, 47: 9825-9835.
134. Jiang Y, Zhou Z, Qian Y, Wei Z, Yu Y, Hu S, Li L. (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6')-Ib-cr in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother*, 61: 1003-1006.
135. Pitout JD, Wei Y, Church DL, Gregson DB. (2008) Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of aac(6')-Ib-cr. *J Antimicrob Chemother*, 61: 999-1002.
136. 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.
137. Hansen LH, Johannesen E, Burmolle M, Sorensen AH, Sorensen SJ. (2004) Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 3332-3337.

138. Yamane K, Wachino J-I, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, Shibayama K, Konda T, Arakawa Y. (2007) New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 3354-3360.
139. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 3801-3804.
140. Qin TT, Kang HQ, Ma P, Li PP, Huang LY, Gu B. (2015) SOS response and its regulation on the fluoroquinolone resistance. *Ann Transl Med*, 3: 358.
141. Levy MS, Balbinder E, Nagel R. (1993) Effect of mutations in SOS genes on UV-induced precise excision of Tn10 in *Escherichia coli*. *Mutat Res*, 293: 241-247.
142. Ilves H, Horak R, Kivisaar M. (2001) Involvement of sigma(S) in starvation-induced transposition of *Pseudomonas putida* transposon Tn4652. *J Bacteriol*, 183: 5445-5448.
143. Butala M, Zgur-Bertok D, Busby SJ. (2009) The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell Mol Life Sci*, 66: 82-93.
144. Zhang AP, Pigli YZ, Rice PA. (2010) Structure of the LexA-DNA complex and implications for SOS box measurement. *Nature*, 466: 883-886.
145. Cirz RT, Romesberg FE. (2006) Induction and inhibition of ciprofloxacin resistance-conferring mutations in hypermutator bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 220-225.
146. Schroder W, Goerke C, Wolz C. (2013) Opposing effects of aminocoumarins and fluoroquinolones on the SOS response and adaptability in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, 68: 529-538.
147. Urios A, Herrera G, Aleixandre V, Blanco M. (1991) Influence of recA mutations on gyrA dependent quinolone resistance. *Biochimie*, 73: 519-521.
148. Levy SB. (2002) Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol*, 92 Suppl: 65S-71S.
149. De Majumdar S, Yu J, Fookes M, McAteer SP, Llobet E, Finn S, Spence S, Monahan A, Monaghan A, Kissenpfennig A, Ingram RJ, Bengoechea J, Gally DL, Fanning S, Elborn JS, Schneiders T. (2015) Elucidation of the RamA regulon in

- Klebsiella pneumoniae* reveals a role in LPS regulation. *PLoS Pathog*, 11: e1004627.
150. Webber MA, Piddock LJ. (2003) The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, 51: 9-11.
 151. Bratu S, Landman D, George A, Salvani J, Quale J. (2009) Correlation of the expression of *acrB* and the regulatory genes *marA*, *soxS* and *ramA* with antimicrobial resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* endemic to New York City. *J Antimicrob Chemother*, 64: 278-283.
 152. Veleba M, De Majumdar S, Hornsey M, Woodford N, Schneiders T. (2013) Genetic characterization of tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Antimicrob Chemother*, 68: 1011-1018.
 153. Delilhas N, Forst S. (2001) *MicF*: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. *J Mol Biol*, 313: 1-12.
 154. Nikaido H, Pages JM. (2012) Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 36: 340-363.
 155. Masi M, Pages JM. (2013) Structure, Function and Regulation of Outer Membrane Proteins Involved in Drug Transport in Enterobacteriaceae: the *OmpF/C* - *TolC* Case. *Open Microbiol J*, 7: 22-33.
 156. 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.
 157. Martinez JL, Fajardo A, Garmendia L, Hernandez A, Linares JF, Martinez-Solano L, Sanchez MB. (2009) A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 33: 44-65.
 158. Silva-Sanchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, Reyna-Flores F, Sanchez-Perez A, Bacterial Resistance C, Garza-Ramos U. (2013) Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae pediatric clinical isolates in Mexico. *PLoS One*, 8: e77968.

159. Luyt CE, Brechot N, Trouillet JL, Chastre J. (2014) Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Crit Care*, 18: 480.
160. Ventola CL. (2015) The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*, 40: 277-283.
161. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. (2015) The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*, 28: 565-591.
162. Baquero F, Tedim AP, Coque TM. (2013) Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Front Microbiol*, 4: 15.
163. Damjanova I, Toth A, Paszti J, Hajbel-Vekony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Fuzi M. (2008) Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother*, 62: 978-985.
164. Hrabak J, Empel J, Bergerova T, Fajfrlik K, Urbaskova P, Kern-Zdanowicz I, Hryniewicz W, Gniadkowski M. (2009) International clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases in a Czech hospital. *J Clin Microbiol*, 47: 3353-3357.
165. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. (2013) Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*, 13: 785-796.
166. Rodrigues C, Machado E, Ramos H, Peixe L, Novais A. (2014) Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK). *Int J Med Microbiol*, 304: 1100-1108.
167. Goncalves GB, Furlan JPR, Vespero EC, Pelisson M, Stehling EG, Pitondo-Silva A. (2017) Spread of multidrug-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones in a tertiary hospital from southern Brazil. *Infect Genet Evol*, 56: 1-7.
168. Kang CI, Kim SH, Bang JW, Kim HB, Kim NJ, Kim EC, Oh MD, Choe KW. (2006) Community-acquired versus nosocomial *Klebsiella pneumoniae*

- bacteremia: clinical features, treatment outcomes, and clinical implication of antimicrobial resistance. *J Korean Med Sci*, 21: 816-822.
169. Zhou K, Lokate M, Deurenberg RH, Tepper M, Arends JP, Raangs EG, Lo-Ten-Foe J, Grundmann H, Rossen JW, Friedrich AW. (2016) Use of whole-genome sequencing to trace, control and characterize the regional expansion of extended-spectrum beta-lactamase producing ST15 *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep*, 6: 20840.
 170. Nordmann P, Poirel L. (2014) The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect*, 20: 821-830.
 171. Haeggman S, Lofdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S. (2004) Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 2400-2408.
 172. Chaves J, Ladona MG, Segura C, Coira A, Reig R, Ampurdanes C. (2001) SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45: 2856-2861.
 173. Lee YH, Cho B, Bae IK, Chang CL, Jeong SH. (2006) *Klebsiella pneumoniae* strains carrying the chromosomal SHV-11 beta-lactamase gene produce the plasmid-mediated SHV-12 extended-spectrum beta-lactamase more frequently than those carrying the chromosomal SHV-1 beta-lactamase gene. *J Antimicrob Chemother*, 57: 1259-1261.
 174. Yan JJ, Ko WC, Jung YC, Chuang CL, Wu JJ. (2002) Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 beta-lactamase in a university hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol*, 40: 3121-3126.
 175. Ko KS, Lee JY, Baek JY, Suh JY, Lee MY, Choi JY, Yeom JS, Kim YS, Jung SI, Shin SY, Heo ST, Kwon KT, Son JS, Kim SW, Chang HH, Ki HK, Chung DR, Peck KR, Song JH. (2010) Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *J Med Microbiol*, 59: 822-828.
 176. Cao X, Xu X, Zhang Z, Shen H, Chen J, Zhang K. (2014) Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 13: 16.

177. Bi W, Liu H, Dunstan RA, Li B, Torres VVL, Cao J, Chen L, Wilksch JJ, Strugnell RA, Lithgow T, Zhou T. (2017) Extensively Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Causing Nosocomial Bloodstream Infections in China: Molecular Investigation of Antibiotic Resistance Determinants, Informing Therapy, and Clinical Outcomes. *Front Microbiol*, 8: 1230.
178. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. (2017) Global epidemiology of CTX-M beta-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother*, 72: 2145-2155.
179. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. (2002) Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 46: 1-11.
180. Cherif T, Saidani M, Decre D, Boutiba-Ben Boubaker I, Arlet G. (2016) Cooccurrence of Multiple AmpC beta-Lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* in Tunisia. *Antimicrob Agents Chemother*, 60: 44-51.
181. Andrade LN, Vitali L, Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Martinez R, Darini AL. (2014) Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. *J Clin Microbiol*, 52: 2530-2535.
182. Yu J, Tan K, Rong Z, Wang Y, Chen Z, Zhu X, Wu L, Tan L, Xiong W, Sun Z, Chen L. (2016) Nosocomial outbreak of KPC-2- and NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal ward: a retrospective study. *BMC Infect Dis*, 16: 563.
183. Kristof K, Toth A, Damjanova I, Janvari L, Konkoly-Thege M, Kocsis B, Koncan R, Cornaglia G, Szego E, Nagy K, Szabo D. (2010) Identification of a blaVIM-4 gene in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone and in a *Klebsiella oxytoca* strain in Hungary. *J Antimicrob Chemother*, 65: 1303-1305.
184. Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. (2011) ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother*, 66: 307-312.
185. Campana EH, Montezzi LF, Paschoal RP, Picao RC. (2017) NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 goes to the beach. *Int J Antimicrob Agents*, 49: 119-121.

186. Castanheira M, Farrell SE, Wanger A, Rolston KV, Jones RN, Mendes RE. (2013) Rapid expansion of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in two Texas hospitals due to clonal spread of ST258 and ST307 lineages. *Microb Drug Resist*, 19: 295-297.
187. Domokos J, Damjanova I, Kristof K, Ligeti B, Kocsis B, Szabo D. (2019) Multiple Benefits of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in *Klebsiella pneumoniae* ST11 High-Risk Clone and Recently Emerging ST307 Clone. *Front Microbiol*, 10: 157.
188. Toth A, Kocsis B, Damjanova I, Kristof K, Janvari L, Paszti J, Cserecsik R, Topf J, Szabo D, Hamar P, Nagy K, Fuzi M. (2014) Fitness cost associated with resistance to fluoroquinolones is diverse across clones of *Klebsiella pneumoniae* and may select for CTX-M-15 type extended-spectrum beta-lactamase. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33: 837-843.
189. Datta N, Hughes VM. (1983) Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature*, 306: 616-617.
190. Wyres KL, Wick RR, Judd LM, Froumine R, Tokolyi A, Gorrie CL, Lam MMC, Duchene S, Jenney A, Holt KE. (2019) Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Genet*, 15: e1008114.
191. Nordmann P, Naas T, Poirel L. (2011) Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*, 17: 1791-1798.
192. Carattoli A. (2013) Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*, 303: 298-304.
193. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*, 63: 219-228.
194. Carattoli A. (2009) Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 2227-2238.
195. Mbelle NM, Feldman C, Sekyere JO, Maningi NE, Modipane L, Essack SY. (2020) Pathogenomics and Evolutionary Epidemiology of Multi-Drug Resistant Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Pretoria, South Africa. *Sci Rep*, 10: 1232.

196. Salah FD, Soubeiga ST, Ouattara AK, Sadjı AY, Metuor-Dabire A, Obiri-Yeboah D, Banla-Kere A, Karou S, Simporo J. (2019) Distribution of quinolone resistance gene (*qnr*) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lome, Togo. *Antimicrob Resist Infect Control*, 8: 104.
197. Robicsek A, Strahilevitz J, Sahn DF, Jacoby GA, Hooper DC. (2006) *qnr* prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 2872-2874.
198. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. (2005) Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*, 43: 4178-4182.
199. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 3140-3145.
200. Spratt BG. (1999) Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Curr Opin Microbiol*, 2: 312-316.
201. Ruan Z, Feng Y. (2016) BacWGSTdb, a database for genotyping and source tracking bacterial pathogens. *Nucleic Acids Res*, 44: D682-687.
202. Centers for Disease Control and Prevention. Standardized molecular subtyping of foodborne bacterial pathogens by pulsed-field gel electrophoresis: training manual. CDC, Atlanta, GA, (2000).
203. Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, Wrigley D, Barrett T, Ribot E. (2005) Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. *J Clin Microbiol*, 43: 1045-1050.
204. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33: 2233-2239.

205. <https://genetica.hu> Hozzáférés dátuma: 2020.09.15.
206. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30: 2114-2120.
207. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*, 19: 455-477.
208. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. (2012) Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*, 67: 2640-2644.
209. Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Moller Aarestrup F, Hasman H. (2014) In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*, 58: 3895-3903.
210. Thomson KS, Sanders CC. (1992) Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrob Agents Chemother*, 36: 1877-1882.
211. Pallecchi L, Bartoloni A, Riccobono E, Fernandez C, Mantella A, Magnelli D, Mannini D, Strohmeyer M, Bartalesi F, Rodriguez H, Gotuzzo E, Rossolini GM. (2012) Quinolone resistance in absence of selective pressure: the experience of a very remote community in the Amazon forest. *PLoS Negl Trop Dis*, 6: e1790.
212. Huang Y, Ogutu JO, Gu J, Ding F, You Y, Huo Y, Zhao H, Li W, Zhang Z, Zhang W, Chen X, Fu Y, Zhang F. (2015) Comparative analysis of quinolone resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from Chinese children and adults. *Biomed Res Int*, 2015: 168292.
213. Nordmann P, Poirel L. (2005) Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, 56: 463-469.
214. Kot B. (2019) Antibiotic Resistance Among Uropathogenic *Escherichia coli*. *Pol J Microbiol*, 68: 403-415.

215. Musicha P, Cornick JE, Bar-Zeev N, French N, Masesa C, Denis B, Kennedy N, Mallewa J, Gordon MA, Msefula CL, Heyderman RS, Everett DB, Feasey NA. (2017) Trends in antimicrobial resistance in bloodstream infection isolates at a large urban hospital in Malawi (1998-2016): a surveillance study. *Lancet Infect Dis*, 17: 1042-1052.
216. 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.
217. Melegh S, Schneider G, Horvath M, Jakab F, Emody L, Tigyi Z. (2015) Identification and characterization of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* clone ST101 in a Hungarian university teaching hospital. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 62: 233-245.
218. Hakanen AJ, Lindgren M, Huovinen P, Jalava J, Siitonen A, Kotilainen P. (2005) New quinolone resistance phenomenon in *Salmonella enterica*: nalidixic acid-susceptible isolates with reduced fluoroquinolone susceptibility. *J Clin Microbiol*, 43: 5775-5778.
219. Murray A, Mather H, Coia JE, Brown DJ. (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance in nalidixic-acid-susceptible strains of *Salmonella enterica* isolated in Scotland. *J Antimicrob Chemother*, 62: 1153-1155.
220. Szabo D, Kocsis B, Rokusz L, Szentandrassy J, Katona K, Kristof K, Nagy K. (2008) First detection of plasmid-mediated, quinolone resistance determinants *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in Budapest, Hungary. *J Antimicrob Chemother*, 62: 630-632.
221. Shams E, Firoozeh F, Moniri R, Zibaei M. (2015) Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among Extended-Spectrum beta - Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Human Isolates in Iran. *J Pathog*, 2015: 434391.
222. Briales A, Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, de Alba PD, Rodriguez-Bano J, Martinez-Martinez L, Pascual A. (2012) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in *Escherichia coli* and

- Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Int J Antimicrob Agents*, 39: 431-434.
223. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. (2007) Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother*, 60: 394-397.
224. Gay K, Robicsek A, Strahilevitz J, Park CH, Jacoby G, Barrett TJ, Medalla F, Chiller TM, Hooper DC. (2006) Plasmid-mediated quinolone resistance in non-Typhi serotypes of *Salmonella enterica*. *Clin Infect Dis*, 43: 297-304.
225. Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. (2009) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 639-645.
226. Magesh H, Kamatchi C, Vaidyanathan R, Sumathi G. (2011) Identification of plasmid-mediated quinolone resistance genes qnrA1, qnrB1 and aac(6')-1b-cr in a multiple drug-resistant isolate of *Klebsiella pneumoniae* from Chennai. *Indian J Med Microbiol*, 29: 262-268.
227. Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y, Lu D, Huang L, Zhang Y, Liu J, Wang M. (2009) High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6')-Ib-cr, and qepA among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 519-524.
228. Dolejska M, Villa L, Hasman H, Hansen L, Carattoli A. (2013) Characterization of IncN plasmids carrying bla CTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *J Antimicrob Chemother*, 68: 333-339.
229. Tokajian S, Eisen JA, Jospin G, Farra A, Coil DA. (2015) Whole genome sequencing of extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient in Lebanon. *Front Cell Infect Microbiol*, 5: 32.
230. Peymani A, Naserpour Farivar T, Nikooei L, Najafipour R, Javadi A, Pahlevan AA. (2015) Emergence of plasmid-mediated quinolone-resistant determinants in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tehran and Qazvin provinces, Iran. *J Prev Med Hyg*, 56: E61-65.

231. Yang H, Chen H, Yang Q, Chen M, Wang H. (2008) High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnr* and *aac(6)-Ib-cr* in clinical isolates of Enterobacteriaceae from nine teaching hospitals in China. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 4268-4273.
232. Saiful Anuar AS, Mohd Yusof MY, Tay ST. (2013) Prevalence of plasmid-mediated *qnr* determinants and gyrase alteration in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university teaching hospital in Malaysia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 17: 1744-1747.
233. Teo JW, Ng KY, Lin RT. (2009) Detection and genetic characterisation of *qnrB* in hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. *Int J Antimicrob Agents*, 33: 177-180.
234. Kocsis B, Mazzariol A, Kocsis E, Koncan R, Fontana R, Cornaglia G. (2013) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae strains isolated in North-East Italy. *J Chemother*, 25: 36-40.
235. Minarini LA, Poirel L, Cattoir V, Darini AL, Nordmann P. (2008) Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *J Antimicrob Chemother*, 62: 474-478.
236. Mazzariol A, Kocsis B, Koncan R, Kocsis E, Lanzafame P, Cornaglia G. (2012) Description and plasmid characterization of *qnrD* determinants in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii*. *Clin Microbiol Infect*, 18: E46-48.
237. Hidalgo L, Gutierrez B, Ovejero CM, Carrilero L, Matrat S, Saba CK, Santos-Lopez A, Thomas-Lopez D, Hoefler A, Suarez M, Santurde G, Martin-Espada C, Gonzalez-Zorn B. (2013) *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 from companion animals bearing *ArmA* methyltransferase, *DHA-1* beta-lactamase, and *QnrB4*. *Antimicrob Agents Chemother*, 57: 4532-4534.
238. Jaidane N, Bonnin RA, Mansour W, Girlich D, Creton E, Cotellon G, Chaouch C, Boujaafar N, Bouallegue O, Naas T. (2018) Genomic Insights into Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* from a Tunisian Teaching Hospital. *Antimicrob Agents Chemother*, 62.
239. Rodriguez-Martinez JM, Diaz de Alba P, Briales A, Machuca J, Lossa M, Fernandez-Cuenca F, Rodriguez Bano J, Martinez-Martinez L, Pascual A. (2013) Contribution of *OqxAB* efflux pumps to quinolone resistance in extended-

- spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 68: 68-73.
240. Yuan J, Xu X, Guo Q, Zhao X, Ye X, Guo Y, Wang M. (2012) Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother*, 67: 1655-1659.
241. Ferjani S, Saidani M, Amine FS, Boutiba-Ben Boubaker I. (2015) Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a Tunisian hospital. *Microb Drug Resist*, 21: 158-166.
242. Liu JH, Deng YT, Zeng ZL, Gao JH, Chen L, Arakawa Y, Chen ZL. (2008) Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *QepA*, *Qnr*, and *AAC(6')-Ib-cr* among 16S rRNA methylase *RmtB*-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 2992-2993.
243. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. ECDC, Stockholm, (2019).
244. Surleac M, Czobor Barbu I, Paraschiv S, Popa LI, Gheorghe I, Marutescu L, Popa M, Sarbu I, Talapan D, Nita M, Iancu AV, Arbune M, Manole A, Nicolescu S, Sandulescu O, Streinu-Cercel A, Otelea D, Chifiriuc MC. (2020) Whole genome sequencing snapshot of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals and receiving wastewater treatment plants in Southern Romania. *PLoS One*, 15: e0228079.
245. Lepuschitz S, Schill S, Stoeger A, Pekard-Amenitsch S, Huhulescu S, Inreiter N, Hartl R, Kerschner H, Sorschag S, Springer B, Brisse S, Allerberger F, Mach RL, Ruppitsch W. (2019) Whole genome sequencing reveals resemblance between ESBL-producing and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Austrian rivers and clinical isolates from hospitals. *Sci Total Environ*, 662: 227-235.
246. Sekizuka T, Yatsu K, Inamine Y, Segawa T, Nishio M, Kishi N, Kuroda M. (2018) Complete Genome Sequence of a *blaKPC-2*-Positive *Klebsiella pneumoniae* Strain Isolated from the Effluent of an Urban Sewage Treatment Plant in Japan. *mSphere*, 3.

247. Obasi A, Nwachukwu S, Ugoji E, Kohler C, Gohler A, Balau V, Pfeifer Y, Steinmetz I. (2017) Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* from Pharmaceutical Wastewaters in South-Western Nigeria. *Microb Drug Resist*, 23: 1013-1018.
248. Sghaier S, Abbassi MS, Pascual A, Serrano L, Diaz-De-Alba P, Said MB, Hassen B, Ibrahim C, Hassen A, Lopez-Cerero L. (2019) Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from animal origin and wastewater in Tunisia: first detection of O25b-B23-CTX-M-27-ST131 *Escherichia coli* and CTX-M-15/OXA-204-producing *Citrobacter freundii* from wastewater. *J Glob Antimicrob Resist*, 17: 189-194.
249. Caltagirone M, Nucleo E, Spalla M, Zara F, Novazzi F, Marchetti VM, Piazza A, Bitar I, De Cicco M, Paolucci S, Pilla G, Migliavacca R, Pagani L. (2017) Occurrence of Extended Spectrum beta-Lactamases, KPC-Type, and MCR-1.2-Producing Enterobacteriaceae from Wells, River Water, and Wastewater Treatment Plants in Oltrepo Pavese Area, Northern Italy. *Front Microbiol*, 8: 2232.
250. Silva-Sanchez J, Barrios H, Reyna-Flores F, Bello-Diaz M, Sanchez-Perez A, Rojas T, Bacterial Resistance C, Garza-Ramos U. (2011) Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in Mexico. *Microb Drug Resist*, 17: 497-505.
251. Markovska R, Stoeva T, Boyanova L, Stankova P, Pencheva D, Keuleyan E, Murjeva M, Sredkova M, Ivanova D, Lazarova G, Nedelcheva G, Kaneva R, Mitov I. (2017) Dissemination of successful international clone ST15 and clonal complex 17 among Bulgarian CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 89: 310-313.
252. Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Gawryszewska I, Bojarska K, Herda M, Literacka E, Zabicka D, Tomczak H, Pewinska N, Szarata M, Ozorowski T, Milner A, Hryniewicz W, Gniadkowski M. (2016) NDM-producing Enterobacteriaceae in Poland, 2012-14: inter-regional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases. *J Antimicrob Chemother*, 71: 85-91.

253. Diab M, Hamze M, Bonnet R, Saras E, Madec JY, Haenni M. (2017) OXA-48 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in raw milk in Lebanon: epidemic spread of dominant *Klebsiella pneumoniae* clones. *J Med Microbiol*, 66: 1688-1691.
254. Darwich L, Vidal A, Seminati C, Albamonte A, Casado A, Lopez F, Molina-Lopez RA, Migura-Garcia L. (2019) High prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamase and emergence of OXA-48 producing Enterobacterales in wildlife in Catalonia. *PLoS One*, 14: e0210686.
255. Diaz MA, Hernandez-Bello JR, Rodriguez-Bano J, Martinez-Martinez L, Calvo J, Blanco J, Pascual A, Spanish Group for Nosocomial I. (2010) Diversity of *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain: second nationwide study. *J Clin Microbiol*, 48: 2840-2845.
256. Merino I, Shaw E, Horcajada JP, Cercenado E, Mirelis B, Pallares MA, Gomez J, Xercavins M, Martinez-Martinez L, De Cueto M, Canton R, Ruiz-Garbajosa P, Group I-G-S. (2016) CTX-M-15-H30Rx-ST131 subclone is one of the main causes of healthcare-associated ESBL-producing *Escherichia coli* bacteraemia of urinary origin in Spain. *J Antimicrob Chemother*, 71: 2125-2130.
257. Ur Rahman S, Ali T, Ali I, Khan NA, Han B, Gao J. (2018) The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *Biomed Res Int*, 2018: 9519718.
258. Rice LB, Willey SH, Papanicolaou GA, Medeiros AA, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr., Jacoby GA. (1990) Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum beta-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother*, 34: 2193-2199.
259. Habeeb MA, Haque A, Nematzadeh S, Iversen A, Giske CG. (2013) High prevalence of 16S rRNA methylase RmtB among CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from Islamabad, Pakistan. *Int J Antimicrob Agents*, 41: 524-526.
260. Girlich D, Bouihat N, Poirel L, Benouda A, Nordmann P. (2014) High rate of faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at a university hospital in Morocco. *Clin Microbiol Infect*, 20: 350-354.

261. Gona F, Barbera F, Pasquariello AC, Grossi P, Gridelli B, Mezzatesta ML, Caio C, Stefani S, Conaldi PG. (2014) In vivo multiclonal transfer of bla(KPC-3) from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in surgery patients. *Clin Microbiol Infect*, 20: O633-635.
262. Park DJ, Yu JK, Park KG, Park YJ. (2015) Genotypes of Ciprofloxacin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Korea and Their Characteristics According to the Genetic Lineages. *Microb Drug Resist*, 21: 622-630.
263. Ocampo AM, Chen L, Cienfuegos AV, Roncancio G, Chavda KD, Kreiswirth BN, Jimenez JN. (2016) A Two-Year Surveillance in Five Colombian Tertiary Care Hospitals Reveals High Frequency of Non-CG258 Clones of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Distinct Clinical Characteristics. *Antimicrob Agents Chemother*, 60: 332-342.
264. Mansour W, Grami R, Ben Haj Khalifa A, Dahmen S, Chatre P, Haenni M, Aouni M, Madec JY. (2015) Dissemination of multidrug-resistant blaCTX-M-15/IncFIIk plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospital- and community-acquired human infections in Tunisia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 83: 298-304.
265. Novovic K, Trudic A, Brkic S, Vasiljevic Z, Kojic M, Medic D, Cirkovic I, Jovcic B. (2017) Molecular Epidemiology of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Serbia from 2013 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother*, 61.
266. Villa L, Feudi C, Fortini D, Brisse S, Passet V, Bonura C, Endimiani A, Mammina C, Ocampo AM, Jimenez JN, Doumith M, Woodford N, Hopkins K, Carattoli A. (2017) Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microb Genom*, 3: e000110.
267. Xie L, Dou Y, Zhou K, Chen Y, Han L, Guo X, Sun J. (2017) Coexistence of blaOXA-48 and Truncated blaNDM-1 on Different Plasmids in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate in China. *Front Microbiol*, 8: 133.
268. Fuzi M, Rodriguez Bano J, Toth A. (2020) Global Evolution of Pathogenic Bacteria With Extensive Use of Fluoroquinolone Agents. *Front Microbiol*, 11: 271.

269. Martinez JL, Baquero F. (2002) Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev*, 15: 647-679.
270. Johnson JR, Johnston B, Kuskowski MA, Sokurenko EV, Tchesnokova V. (2015) Intensity and Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance within the H30 and H30Rx Subclones of *Escherichia coli* Sequence Type 131 Compared with Other Fluoroquinolone-Resistant *E. coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 59: 4471-4480.
271. Johnson JR, Porter SB, Thuras P, Johnson TJ, Price LB, Tchesnokova V, Sokurenko EV. (2015) Greater ciprofloxacin tolerance as a possible selectable phenotype underlying the pandemic spread of the H30 subclone of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrob Agents Chemother*, 59: 7132-7135.
272. Giddins MJ, Macesic N, Annavajhala MK, Stump S, Khan S, McConville TH, Mehta M, Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. (2018) Successive Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance through Distinct Genomic Adaptations in blaKPC-2-Harboring *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 307 Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 62.
273. Rojas R, Macesic N, Tolari G, Guzman A, Uhlemann AC. (2019) Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST307 in Traveler Returning from Puerto Rico to Dominican Republic. *Emerg Infect Dis*, 25: 1583-1585.
274. Haller S, Kramer R, Becker K, Bohnert JA, Eckmanns T, Hans JB, Hecht J, Heidecke CD, Hubner NO, Kramer A, Klaper K, Littmann M, Marlinghaus L, Neumann B, Pfeifer Y, Pfennigwerth N, Rogge S, Schaufler K, Thurmer A, Werner G, Gatermann S. (2019) Extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST307 outbreak, north-eastern Germany, June to October 2019. *Euro Surveill*, 24.
275. Villacis JE, Reyes JA, Castelan-Sanchez HG, Davila-Ramos S, Lazo MA, Wali A, Bodero LA, Toapanta Y, Naranjo C, Montero L, Campos J, Galas MG, Gestal MC. (2020) OXA-48 Carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 307 in Ecuador. *Microorganisms*, 8.

276. Heinz E, Brindle R, Morgan-McCalla A, Peters K, Thomson NR. (2019) Caribbean multi-centre study of *Klebsiella pneumoniae*: whole-genome sequencing, antimicrobial resistance and virulence factors. *Microb Genom*, 5.
277. Wyres KL, Hawkey J, Hetland MAK, Fostervold A, Wick RR, Judd LM, Hamidian M, Howden BP, Lohr IH, Holt KE. (2019) Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *J Antimicrob Chemother*, 74: 577-581.
278. Lowe M, Kock MM, Coetzee J, Hoosien E, Peirano G, Strydom KA, Ehlers MM, Mbelle NM, Shashkina E, Haslam DB, Dhawan P, Donnelly RJ, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. (2019) *Klebsiella pneumoniae* ST307 with blaOXA-181, South Africa, 2014-2016. *Emerg Infect Dis*, 25: 739-747.
279. Wang S, Zhao J, Liu N, Yang F, Zhong Y, Gu X, Jian Z, Yan Q, Liu Q, Li H, Li Y, Liu J, Li H, Chen L, Liu W. (2020) IMP-38-Producing High-Risk Sequence Type 307 *Klebsiella pneumoniae* Strains from a Neonatal Unit in China. *mSphere*, 5.
280. Kis Z, Toth A, Janvari L, Damjanova I. (2016) Countrywide dissemination of a DHA-1-type plasmid-mediated AmpC beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone in Hungary, 2009-2013. *J Med Microbiol*, 65: 1020-1027.
281. Anes J, Hurley D, Martins M, Fanning S. (2017) Exploring the Genome and Phenotype of Multi-Drug Resistant *Klebsiella pneumoniae* of Clinical Origin. *Front Microbiol*, 8: 1913.
282. Younes A, Hamouda A, Dave J, Amyes SG. (2011) Prevalence of transferable blaCTX-M-15 from hospital- and community-acquired *Klebsiella pneumoniae* isolates in Scotland. *J Antimicrob Chemother*, 66: 313-318.
283. Lavollay M, Mamlouk K, Frank T, Akpabie A, Burghoffer B, Ben Redjeb S, Bercion R, Gautier V, Arlet G. (2006) Clonal dissemination of a CTX-M-15 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain in the Paris area, Tunis, and Bangui. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 2433-2438.
284. Coelho A, Gonzalez-Lopez JJ, Miro E, Alonso-Tarres C, Mirelis B, Larrosa MN, Bartolome RM, Andreu A, Navarro F, Johnson JR, Prats G. (2010) Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae*

- strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *Int J Antimicrob Agents*, 36: 73-78.
285. Novais A, Canton R, Moreira R, Peixe L, Baquero F, Coque TM. (2007) Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 796-799.
286. Szabo O, Kocsis B, Szabo N, Kristof K, Szabo D. (2018) Contribution of OqxAB Efflux Pump in Selection of Fluoroquinolone-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2018: 4271638.
287. Ellington MJ, Woodford N. (2006) Fluoroquinolone resistance and plasmid addiction systems: self-imposed selection pressure? *J Antimicrob Chemother*, 57: 1026-1029.
288. Garoff L, Yadav K, Hughes D. (2018) Increased expression of Qnr is sufficient to confer clinical resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, 73: 348-352.
289. Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. (2005) Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 3050-3052.
290. Szabo R, Borocz K. (2015) Infections and antimicrobial use among institutionalized residents in Hungary: increasing need of microbiological surveillance. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 62: 29-44.
291. Brusaferrero S, Arnoldo L, Cattani G, Fabbro E, Cookson B, Gallagher R, Hartemann P, Holt J, Kalenic S, Popp W, Privitera G, Prikazsky V, Velasco C, Suetens C, Varela Santos C. (2015) Harmonizing and supporting infection control training in Europe. *J Hosp Infect*, 89: 351-356.
292. Pegram A, Bloomfield J. (2015) Infection prevention and control. *Nurs Stand*, 29: 37-42.
293. Rutala WA, Weber DJ, Society for Healthcare Epidemiology of A. (2010) Guideline for disinfection and sterilization of prion-contaminated medical instruments. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 31: 107-117.

294. Patterson P. (2009) CDC sterilization, disinfection guideline. *OR Manager*, 25: 14-16.
295. Meneguetti MG, Canini SR, Bellissimo-Rodrigues F, Laus AM. (2015) Evaluation of Nosocomial Infection Control Programs in health services. *Rev Lat Am Enfermagem*, 23: 98-105.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Az értekezés témájában megjelent publikációk

[1] **Domokos J**, Kristof K, Szabo D. (2016) Plasmid-mediated quinolone resistance among extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* from bloodstream infections. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 63(3): 313-323. IF: 0,921

[2] **Domokos J**, Damjanova I, Kristof K, Ligeti B, Kocsis B, Szabo D. (2019) Multiple Benefits of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in *Klebsiella pneumoniae* ST11 High-Risk Clone and Recently Emerging ST307 Clone. *Front Microbiol*, 10: 157. IF: 4,236

10.2. Egyéb témában megjelent publikációk

[1] Kocsis B, **Domokos J**, Szabo D. (2016) Chemical structure and pharmacokinetics of novel quinolone agents represented by avarofloxacin, delafloxacin, finafloxacin, zabofloxacin and nemonoxacin. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 15(1): 34. IF: 2,376

[2] Khayer B, **Domokos J**, Magyar T, Wehmann E. (2015) Antibiotic susceptibility of Hungarian *Bordetella bronchiseptica* strains isolated from pigs. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 62 (Suppl): 44-45.

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni köszönetem Dr. Szabó Dóra Professzor Asszonynak, Témavezetőmnek, hogy lehetőséget biztosított kutatásaim elvégzéséhez a Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézetében. Köszönöm, hogy hasznos szakmai tapasztalatainak megosztásával, tanácsaival mindvégig támogatta tanulmányaimat. Hálával tartozom továbbá Dr. Kocsis Bélának, aki folyamatos iránymutatásaival, biztatásával és tanácsaival szintén nagyban hozzájárult szakmai fejlődésemhez.

Köszönöm Stercz Balázsnak a kísérleti munka során felmerült gyakorlati problémák megoldásában nyújtott önzetlen segítségét és tanítását, aki rendkívüli szakmai hozzáértésével és precizitásával mindvégig segítette munkámat.

Köszönettel tartozom Dr. Tóth Ákosnak és Dr. Damjanova Ivelinának, hogy biztosították a feltételeket a NNK-ban történő laboratóriumi munkavégzéshez. Hálás vagyok a teljes genom szekvenálás, illetve a PFGE módszer elvégzésében és kiértékelésében nyújtott segítségükért, szakmai igényességükért.

Köszönöm az Orvosi Mikrobiológiai Intézet és a Labor Medicina Intézet Munkatársainak, különösen Dr. Kristóf Katalinnak, Uzsonyik Noéminek, Marosvölgyi Péternének és Pesti Natasának, akik kutatómunkám bizonyos szakaszaiban rendkívüli segítségemre voltak. Köszönöm továbbá minden Szerzőtársamnak, mindannyian nélkülözhetetlen közreműködői és segítői voltak publikációink megjelentetésének.

Végül, de nem utolsó sorban hálás vagyok Szüleimnek, Testvéremnek és az egész Családomnak, hogy végtelen szeretetükkel, türelmükkel és támogatásukkal végig kísérték utamon.