

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2538.**

**SZABÓ ORSOLYA**

**Mikroorganizmusok és anyagaik hatásainak molekuláris, celluláris és  
organizmus szintű vizsgálata**

című program

Programvezető: Dr. Nagy Károly, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Kocsis Béla, egyetemi adjunktus

A plazmid-mediálta kinolon rezisztencia  
determinánsok szerepe a fluorokinolon rezisztens  
Enterobacterales törzsek kialakulásában

Doktori értekezés

**Dr. Szabó Orsolya**

Semmelweis Egyetem

Pathológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kocsis Béla Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Kónya József, DSc, egyetemi tanár

Dr. Kenesei Éva, Ph.D, laboratórium vezető

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Ungvári Zoltán István, Ph.D, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Köles László, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Csire Márta, Ph.D., laboratórium vezető

Budapest

2021

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés.....	6
1.1 Rezisztencia okozta kihívások.....	6
1.2 Kinolon, fluorokinolon antibiotikumok.....	7
1.3 Fluorokinolon rezisztencia.....	14
1.4 Rezisztencia mechanizmusok.....	19
1.4.1 Kromozómális rezisztencia mechanizmusok.....	19
1.4.2 Plazmidon közvetített rezisztencia mechanizmusok.....	22
1.4.3 QNR-ok.....	22
1.4.3/a Felfedezésük.....	22
1.4.3/b Eredetük.....	23
1.4.3/c Szerkezet és hatásmechanizmus, hatásuk a MIC-re és az MPC-re.....	25
1.4.3/d Plazmidok, inzerciós szekvenciák szerepe.....	27
1.4.4 Aminoglikozid-acetiltranszferáz-(6')-Ib-cr.....	28
1.4.5 QepA efflux pumpa.....	29
1.4.6 OqxAB efflux pumpa.....	30
1.4.7 A PMQR-ok detektálása.....	31
1.5 EUCAST és CLSI.....	32
2. Célkitűzések.....	34
3. Módszerek.....	35
3.1 PMQR prevalencia meghatározás és fluorokinolon rezisztencia felmérés....	35
3.1.1 Törzsek.....	35
3.1.2 MIC meghatározás.....	36
3.1.3 PMQR detektálás.....	36
3.2 Virulencia faktorok detektálása <i>Escherichia coli</i> törzsekben.....	38
3.3 Az <i>oqxAB</i> génexpressziós vizsgálata <i>Klebsiella pneumoniae</i> törzsekben....	40
3.3.1 Törzsek.....	40
3.3.2 Ciprofloxacín expozíció.....	41
3.3.3 Kvantitatív reverz-transzkriptáz PCR analízis.....	41

3.3.4	Mutációk azonosítása a <i>gyrA</i> és a <i>parC</i> génekben.....	42
3.3.5	Multilocus szekvencia típus (MLST) meghatározása.....	43
3.3.6	Statisztikai elemzés.....	44
3.4	A <i>qnrD</i> plazmidot hordozó <i>Morganella morganii</i> vizsgálata, illetve a <i>qnrD</i> plazmidok filogenetiaki elemzése.....	44
3.4.1	Törzsek.....	44
3.4.2	A <i>qnrD</i> plazmid szekvenciájának elemzése.....	44
3.4.3	A kinolon rezisztencia determináns régió analízise.....	46
3.4.4	A <i>qnrD</i> plazmidok összehasonlítása és filogenetikai elemzése.....	47
3.4.5	Konjugációs vizsgálatok.....	47
3.4.6	A <i>qnrD</i> expresszió analízis és a <i>qnrD</i> plazmid kópia szám elemzése kvantitatív reverz-transzkriptáz PCR-el.....	47
4.	Eredmények.....	49
4.1	PMQR gének prevalenciája húgyúti fertőzésekből izolált Enterobacterales törzsekben.....	49
4.2	Virulencia faktorok detektálása <i>E. coli</i> törzsekben.....	55
4.3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>oqxAB</i> effluxpumpa szerepe fluorokinolon rezisztenciában.....	55
4.4	<i>Morganella morganii</i> <i>qnrD</i> determináns szerepe fluorokinolon rezisztenciában.....	58
5.	Megbeszélés.....	66
5.1	PMQR detektálás.....	66
5.2	<i>K. pneumoniae</i> <i>oqxAB</i> determinánsok vizsgálata.....	67
5.3	<i>qnrD</i> plazmidok vizsgálata.....	73
6	Következtetések.....	78
7.	Összefoglalás.....	81
8.	Summary.....	82
9.	Irodalomjegyzék.....	83
10.	Saját publikációk jegyzéke.....	98
11.	Köszönetnyilvánítás.....	99

## Rövidítések jegyzéke

<b><i>aac(6')-Ib-cr</i></b>	aminoglikozid-acetyltransferáz (6')-Ib cr variáns
<b>AcrAB</b>	Efflux pumpa típus
<b><i>afa</i></b>	afimbriális adhezinek
<b>ATP</b>	adenozin trifoszfát
<b>bp</b>	bázispár
<b><i>bla</i></b>	béta-laktamáz kódoló génszakasz
<b>BLAST</b>	basic local alignment search tool
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>dATP</b>	dezoxi adenozin trifoszfát
<b>dCTP</b>	dezoxi citozin trifoszfát
<b>dGTP</b>	dezoxi guanozin trifoszfát
<b>DNS</b>	dezoxiribonukleinsav
<b>dNTP</b>	dezoxi nukleotid trifoszfát
<b>dTTP</b>	dezoxi timidin trifoszfát
<b>ECDC</b>	European Centre for Disease Prevention and Control
<b><i>E. coli</i> DH10B</b>	<i>E.coli</i> DH10B törzs
<b><i>E. coli</i> J53</b>	<i>E.coli</i> J53 törzs
<b><i>E. coli</i> TG1</b>	<i>E.coli</i> TG1 törzs
<b>ESBL</b>	extended-spectrum beta-lactamase
<b>EUCAST</b>	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>FAM</b>	6-carboxyfluorescein
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b><i>foc</i></b>	F1C fimbriák
<b>FOX5</b>	Béta-laktamáz típus
<b>fwd</b>	forward
<b><i>gapA</i></b>	gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz
<b><i>infB</i></b>	transzlációs iniciációs faktor 2
<b>INR</b>	international normalized ratio
<b>IRL</b>	invert repeat left szekvencia
<b>IRR</b>	invert repeat right szekvencia

<b>ISCR-1</b>	insertion sequence common region 1
<b>kbp</b>	kilobázispár
<b><i>kpsMT</i></b>	K-antigén
<b>LB</b>	Luria-Bertani táptalaj
<b>LexA</b>	az SOS response rendszer represszor fehérjéje
<b>MALDI-TOF/MS</b>	matrix-assisted laser desorption ionization time of flight/mass spectrometry
<b>McbG</b>	girázt a microcintől védő pentapeptid repeat fehérje
<b><i>mdh</i></b>	malát dehidrogenáz
<b>MfpA</b>	<i>Mycobacterium</i> fluoroquinolone resistance protein A (giráz inhibitor)
<b>MFS</b>	major facilitator superfamily
<b>MH</b>	Mueller-Hinton táptalaj
<b>MIC</b>	minimális gátló koncentráció
<b>min</b>	perc
<b>MLST</b>	multilocus sequence typing
<b>MPC</b>	mutáció prevenció koncentráció
<b>NAC</b>	National Antimicrobial Susceptibility Testing Committees
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>OD</b>	Optical Density
<b>OqxAB</b>	Efflux pumpa típus
<b>orf</b>	open reading frame
<b><i>pap</i></b>	pyelonephritis asszociált pilus
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)
<b><i>pgi</i></b>	foszfoglukóz izomeráz
<b><i>phoE</i></b>	foszoporin E
<b><i>pil</i></b>	P-fimbria
<b>PMQR</b>	plazmidon közvetített kinolon rezisztencia
<b>Qep</b>	Efflux pumpa típus
<b>QNR</b>	quinolone resistance determinant
<b>QRDR</b>	Kinolon rezisztencia determináns régió
<b>RecA</b>	az SOS response rendszer DNS bántalom érzékelő fehérjéje

<b>rev</b>	reverse
<b>RND</b>	resistance-nodulation-cell division superfamily
<b>RNS</b>	ribonukleinsav
<b>rpm</b>	percenkénti fordulatszám
<b><i>rpoB</i></b>	RNS polimeráz béta-alegysége
<b>RT-PCR</b>	real time PCR
<b>SE23</b>	A 23-mas sorszámú <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>SE191</b>	A 191-es sorszámú <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>SE10MM</b>	A 10-es sorszámú <i>Morganella morganii</i>
<b>pSE10MM</b>	A 10-es sorszámú <i>Morganella morganii</i> plazmidja
<b>sec</b>	másodperc
<b><i>sfa</i></b>	S fimbriák
<b>ST</b>	szekvencia típus
<b><i>sul-1</i></b>	integron típus (jellemzően szulfonamid rezisztencia)
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TdP</b>	torsades de pointes
<b><i>tonB</i></b>	periplazmatikus energia transzducer
<b>U</b>	unit / egység
<b>VEB-1</b>	béta-laktamáz típus
<b>VIC</b>	Aequorea victoria módosításával létrehozott qPCR-hoz használt jelölő molekula

## 1. Bevezetés

### 1.1 Rezisztencia okozta kihívások

Napjainkban világszerte komoly kihívást jelent az antibiotikum rezisztencia. A fertőző betegségeket emelkedő számban okozzák antibiotikum rezisztens kórokozók, amely terápiás nehézséghez vezet, mert limitált számú hatásos antibiotikum áll rendelkezésre a kezelésre. A European Center for Diseases Control (ECDC) adatai alapján évente 33.000 beteg meghal antibiotikum rezisztens kórokozó okozta fertőzésben Európában.<sup>(1)</sup>

Világszerte évente 700.000 beteg haláláért felelősek a rezisztens kórokozók és becslések szerint 2050-re körülbelül 10.000.000 ember halálát fogják okozni.<sup>(2)</sup>

A bakteriális fertőzések közül az egyik legjelentősebbek az Enterobacterales rend tagjai által okozott fertőzések. Számos anatómiai helyen okoznak humán fertőzést, úgymint húgyútakban, sebekben, bélrendszerben, légutakban vagy a legsúlyosabb esetben a véráramban is. Kezelésük azonban egyre nagyobb problémát jelent, a különböző antibiotikumokkal szemben kialakuló rezisztenciájuk miatt. Az elmúlt, megközelítőleg 30 évben az antibiotikum rezisztens Enterobacterales törzsek egyre szélesebb körben elterjedtek. Ismert rezisztenciájuk béta-laktámokkal, fluorokinolonokkal, aminoglikozidokkal, illetve polymyxinekkal szemben is.<sup>(3-5)</sup>

A fluorokinolonok mindennapos használatának, illetve a baktériumok alkalmazkodó képességének köszönhetően a rezisztens törzsek aránya nagymértékben emelkedni kezdett. A jelenség világszerte terápiás nehézséget okozó problémává nőtte ki magát.<sup>(6)</sup>

Az 1990-es években az **Amerikai Egyesült Államokban** közel 40%-kal nőtt a fluorokinolonok használata, mindeközben az intenzív osztályokon izolált Gram-negatív baktérium törzsekben előforduló ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia megduplázódott.<sup>(7)</sup>

1997-2001 között több mint 10% volt a ciprofloxacinnal szembeni rezisztens bélbaktérium törzsek aránya az **Egyesült Államokban**. A rezisztens törzsek aránya ennél is magasabbnak bizonyult *Pseudomonas aeruginosa* és egyéb Gram-negatív baktériumok esetén.<sup>(8-11)</sup>

1997-1999 között vizsgálva, **Pekingben**, a nosocomialis fertőzések esetén izolált *Escherichia coli* törzsekben a ciprofloxacinnal szembeni rezisztencia aránya közel 60% volt.<sup>(12)</sup>



**Barcelonában** az egészséges populációt vizsgálva az egyének bélrendszerét kolonizáló *E. coli* törzsek több mint 25%-a bizonyult fluorokinolonnal szemben rezisztensnek.<sup>(13)</sup>

*Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella spp.*, *Shigella*, valamint *Campylobacter spp.* fertőzések esetén is történtek vizsgálatok fluorokinolon rezisztencia feltérképezésére. 2006-ban **Koreában** férfi páciensekből izolált *N. gonorrhoeae* törzsek 83%-a rezisztens volt fluorokinolonokkal szemben, mely a 2000-ben dokumentált adatokhoz képest jelentős emelkedést mutat, akkor 23% volt. 2007 és 2009 között **Ázsiában** és **Afrikában** 64,5%, illetve 29,1%-os ciprofloxacín rezisztencia arányt találtak *Shigella spp.* törzsek esetén. **Koreában** átlagosan 24% volt a ciprofloxacín rezisztenciát mutató *Campylobacter spp.* törzsek aránya.<sup>(14,15)</sup>

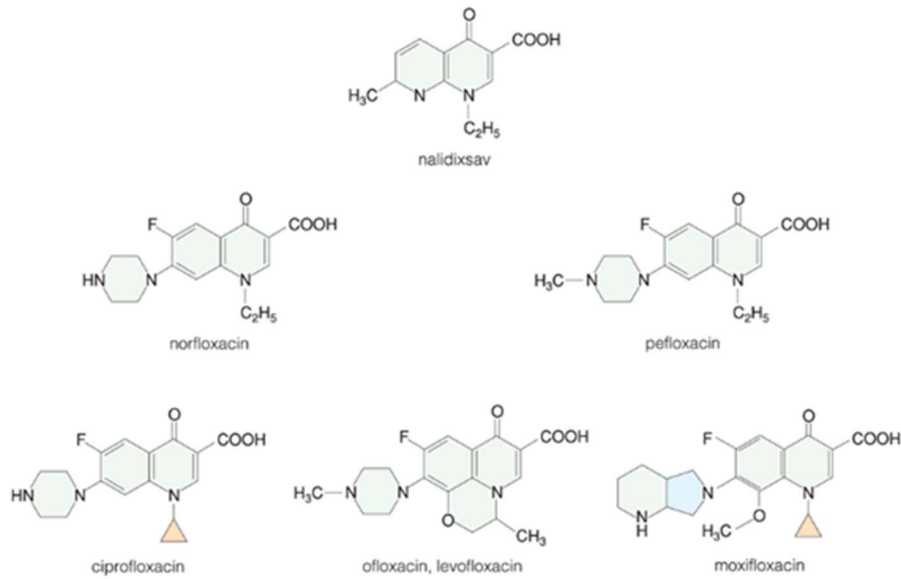
**Svájcban** 1997 és 2007 között 1,8%-ról 15,9%-ra emelkedett a ciprofloxacín rezisztencia aránya *E. coli* törzsekben.<sup>(16)</sup>

Az **Egyesült Államokban** 2000 és 2010 között követve ötszörösére emelkedett a ciprofloxacín rezisztens *E. coli* törzsek aránya: 3%-ról 17,1%-ra, míg a nitrofurantion és ceftriaxon rezisztencia aránya nem mutatott jelentős emelkedést.<sup>(17)</sup>

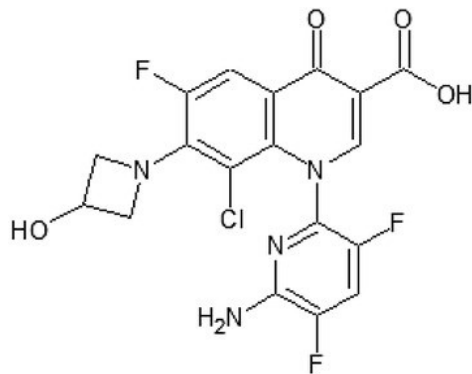
**Braziliában** 2014-ben húgyúti fertőzésből izolált 1641 Enterobacterales törzset vizsgálva, melynek jelentős hányadában a kórokozó *E. coli* volt, 36%-os ciprofloxacín rezisztenciát észleltek. Ugyanakkor férfi betegek esetén magasabb arányban észleltek ciprofloxacín rezisztenciát, mint női betegekben: 32,7% és 15,9% arányban.<sup>(18)</sup>

## 1.2 Kinolon, fluorokinolon antibiotikumok

Az első **kinolon** antibiotikum a nalidixsav volt, amit 1962-ben vezettek be a klinikai gyakorlatba. A szintetikus, baktericid hatású szer kezdetben a legtöbb Enterobacterales esetén hatékonynak bizonyult. A későbbiekben számos kémiai szerkezeti módosítással potencírozva a molekulát, kifejlesztették a ma is használt **fluorokinolonokat**, illetve ezek különböző generációit. A legfőbb szerkezeti módosítások a C6-os pozícióban egy fluor atom, valamint a C7-es pozícióban egy piperazinyl gyűrű, illetve ennek valamely származékai voltak. Az újabb fejlesztésű delafloxacín hatóanyag sajátossága a molekulában elhelyezett klór atom, mely a molekula stabilitását növeli. (Ábra 1, 2)



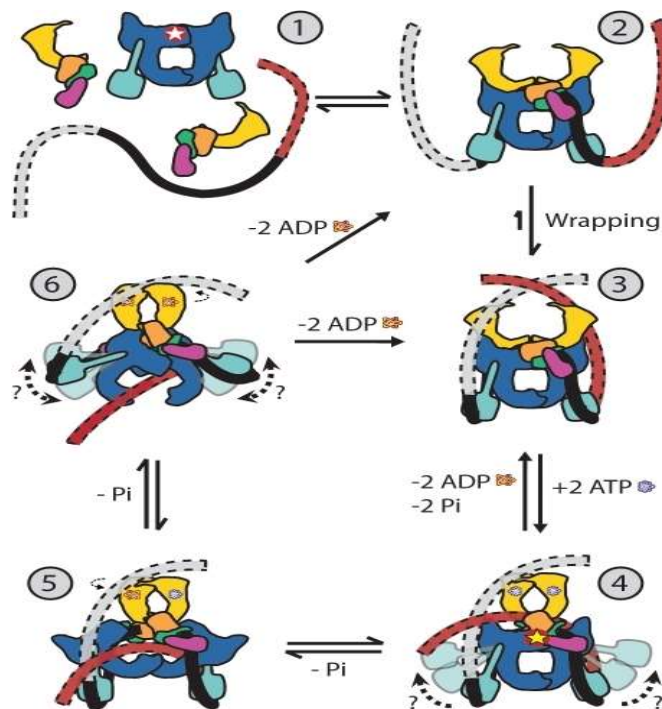
**Ábra 1.:** A kinolonok és fluorokinolonok kémiai szerkezete – A C6-os pozícióba helyezett fluor atom, illetve a C7-es pozícióban látható piperazinyl gyűrű- és származékai hozták létre a fluorokinolonokat<sup>(19)</sup>



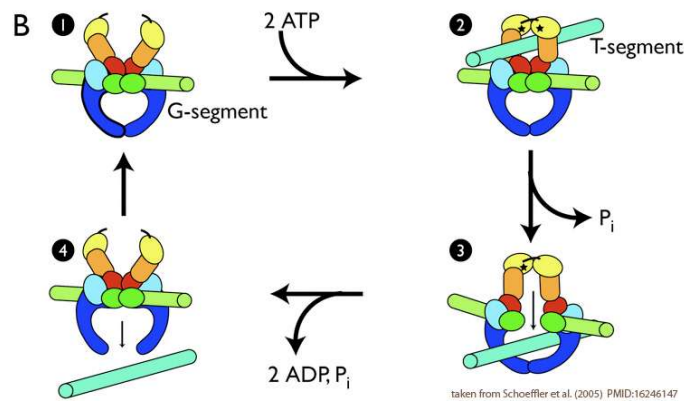
**Ábra 2.:** Az új fejlesztésű delafloxacin kémiai szerkezete – A molekulában elhelyezett klór atom a delafloxacin sajátja<sup>(20)</sup>

A kinolonok támadáspontjai a **DNS giráz és DNS topoizomeráz IV** enzimek, melyek esszenciálisak a bakteriális DNS szintézisben.<sup>(21)</sup>

A DNS giráz és topoizomeráz IV nagy méretű, összetett enzimek 2-2 pár alegységgel. A giráz alegységei a GyrA és a GyrB fehérjék. A GyrA egy 97 kiloDalton nagyságú protein, melyet a *gyrA* gén kódol; a GyrB 90 kDa nagyságú, *gyrB* gén által kódolva. A topoizomeráz IV enzim alkotói a ParC és a ParE alegységek, melyek 75 illetve 70 kDa nagyságú proteinjeit a *parC* valamint a *parE* gének kódolják. A giráz és topoizomeráz IV enzimek képesek negatív szuperspirálokat létrehozni a DNS láncban, eltávolítani a pozitív és a negatív szuperspirálokat, valamint összefűzni és kibontani a zárt cirkuláris molekulákat. A topoizomeráz IV nagyobb hatékonysággal bont fel zárt cirkuláris molekulákat, mint a giráz enzim. A kettő együttműködésben segíti a különböző bakteriális sejtbioológiai folyamatokat, nevezetesen a replikációt, a transzkripciót, a rekombinációt és a DNS reparációt. Átmenetileg eltörik a dupla szálú DNS mindkét szálát, majd ATP-dependens módon a törés magasságában történik meg a DNS átírása, így egy új, kettős szálú DNS molekula szabadulhat fel.<sup>(22)</sup> (Ábra 3 és 4)

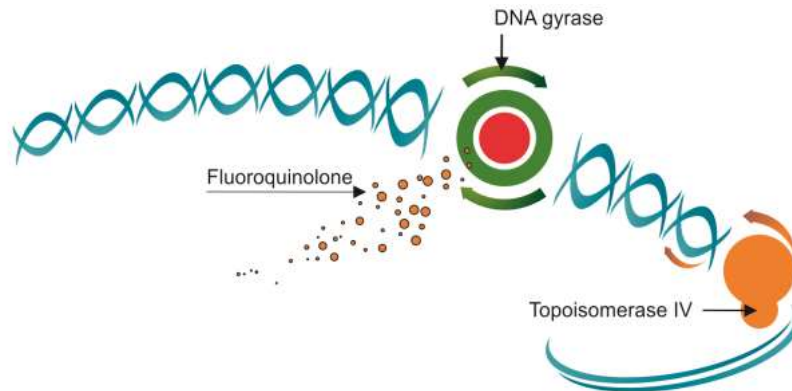


Ábra 3.: GyrA és GyrB működési mechanizmusa - A DNS átíráshoz szükséges szuperspirálok kibontása, majd újra spiralizálása, melyet ATP dependens módon a giráz és a topoizomeráz IV katalizál<sup>(23)</sup>



Ábra 4.: Topoizomeráz IV működése - A DNS átíráshoz szükséges szuperspirálok kibontása, majd újra spiralizálása, melyet ATP dependens módon a giráz és a topoizomeráz IV katalizál<sup>(24)</sup>

A kinolonok ezeket a reakciókat állítják le. A girázt és a topoizomeráz IV-et gyógyszer-enzim-DNS komplexbe zárják, amely letális dupla szálú DNS töréseket hoz létre.<sup>(25)</sup> (Ábra 5)



Ábra 5.: A fluorokinolonok a DNS girázhoz kötődnek, így a DNS átírás akadályozott, letális DNS törések jönnek létre<sup>(26)</sup>

A fluorokinolonok koncentráció függően fejtik ki hatásukat. Baktericid hatásuk gyorsan kialakul: amint eléri a csúskoncentrációjukat, majd egész addig fenn is marad, míg a koncentráció meghaladja a MIC-értéket.<sup>(27)</sup>

A fluorokinolonok három-hat óráig terjedő *in vitro* post antibiotikus hatással rendelkeznek Staphylococcusok, Enterobacterales törzsek és *P. aeruginosa* esetén. Azon

mikroorganizmusok esetében, melyek rapidan eliminálódnak, (*Haemophilus spp.*, *E. coli* vagy a *Klebsiella spp.*), gyakorlatilag nem jelentkezik az *in vitro* postantibiotikus effektus. *Enterococcus faecalis* esetén a hatás kisebb mértékű. Ezen túl, a kinolonok megakadályozzák az endotoxinok *in vitro* felszabadulását, mindannak ellenére is, hogy a baktériumokat rapidan elpusztítják. Ez a jelenség *in vivo* megnyilvánulhat kisebb mértékű gazdaszervezeti reakció képében.<sup>(28)</sup>

A fluorokinolonok hatástani szempontból csoportokba, illetve generációkba oszthatók, bár egységes csoportosításuk nincs. Az alábbi táblázatban a fluorokinolonok legfőbb farmakológiai tulajdonságai láthatók: (Táblázat 1)<sup>(29,30)</sup>

**Táblázat 1.:** A fluorokinolonok generációi és főbb farmakológiai tulajdonságai

Generáció	Hatóanyag	Hatásspektrum	Indikáció
0.	nalidixsav, oxolinsav	Enterobacterales	húgyúti infekció
1.	norfloxacin	Gram negatív bélbaktériumok	nem komplikált húgyúti fertőzések, gastrointestinalis fertőzések
2.	ciprofloxacin, pefloxacin, ofloxacin	Gram negatív és Gram-pozitív baktériumok	húgyúti fertőzések, bőr-és lágyrész infekciók, osteomyelitis, gastrointestinalis fertőzések
3.	levofloxacin	Gram negatív, Gram pozitív, intracellularis baktériumok	szisztémás fertőzések, alsó- és felső légúti fertőzések

4.	moxifloxacin	Gram negatív, Gram pozitív, intracellularis baktériumok, anaerob baktériumok	
új fejlesztés	delafloxacin	Gram negatív, Gram pozitív	szisztémás fertőzések, alsó- és felső légtúti fertőzések

**A fluorokinolonok lehetséges mellékhatásai a következők:**

- Gasztrointesztinális: hányinger, hányás, diszkomfort érzet
- Központi idegrendszeri: fejfájás, hányinger, szédülés, görcsroham, eszméletvesztés, pszichózis, nyugtalanság
- Kötőszöveti elváltozások: maradandó porckárosodás, ínsérülés. A magzatban és gyerekekben fog és csont fejlődési zavar lehet, ezért **terheseknek** nem ajánlott a fluorokinolon kezelés.
- Renalis: crystalluria, obstruktív uropathia, acut veseelégtelenség, interstitialis nephritis, nem specifikus nephritis
- Glükóz metabolizmus: hypoglikaemia
- Kardiovaszkuláris: QT-megnyúlás, ritmuszavarok (beleértve TdP tachycardiát is)
- Egyéb: fototoxicitás

Kiemelendő a fluorokinolonok alkalmazása húgyúti infekciókban. Magyarországon a klinikai gyakorlatban a ciprofloxacin sokáig elsőként választandó antibiotikum volt ezen fertőzések kezelésében. Jelenleg az egyre inkább elterjedő rezisztencia, valamint a dysbacteriosist okozó, így infekciókhoz vezető következmények miatt (pl. *Clostridium difficile* fertőzés) korlátozott az alkalmazása, esetenként

használatának mellőzése a jellemző. Különböző, nem Magyarországon leírt terápiás rezsimek a ciprofloxacín helyett főként a trimetoprim alkalmazását javasolják.<sup>(31)</sup>

Mindezek ellenére természetesen a ciprofloxacín továbbra is **klinikai alkalmazásban** maradt. Eltérő **indikációkban** más és más antibiotikum rezsimek és lehetőségek állnak rendelkezésünkre. Az alábbiakban angolszász ajánlásokat mutatunk be:

- **Cystitis és nem komplikált húgyúti infekció** esetén ajánlható trimetoprim, amoxicillin, nitrofurantoin, cefalexin, ciprofloxacín, illetve amoxicillin-klavulánsav is. A kezelést nők esetében 3, férfiak esetében 10 napig javasolt folytatni.
- Ugyanezen esetben **terheseekben** cefalexint vagy amoxicillint alkalmazhatunk, 7 napig.
- **Prophylaxisra** trimetoprim, nitrofurantoin vagy amoxicillin-klavulánsav alkalmazandó.
- **Pyelonephritis és komplikált húgyúti infekció** esetén 10 napos amoxicillin-klavulánsav vagy ciprofloxacín terápia javasolt, kivéve súlyos klinikai státusz esetén. Ekkor cefuroxim vagy gentamycin adható parenteralisan 7-14 napig.
- **Epididymitis** vagy **orchitis** esetén, amennyiben Chlamydia fertőzés kizárható, ciprofloxacín az elsődlegesen választandó, 14 napos kúrában.
- **Akut prostatitis** esetén 28 napos trimetoprim vagy ciprofloxacín kúra szükséges.<sup>(31)</sup>

A fluorokinolonok *per os* és intravénás kezelésben is elérhetők. A fluorokinolonok igen jelentős mértékben felszívódnak a béltraktusból így a *per os* adagolás megfelelő. Biológiai elérhetőségük 80-95%. Kis mértékben metabolizálódnak az emberi szervezetben, metabolitjaik közt aktívak és inaktívak is találhatóak. Vesén át ürülnek, féléletidejük 3-11 óra, mindezek miatt beszűkült vesefunkció mellett a dózis csökkentése, esetleg antibiotikumváltás javasolt. A fluorokinolonok dializálhatók. Máj- és veseműködés együttes csökkenésekor minden fluorokinolon kumulálódik a szervezetben, ekkor szintén dóziscsökkentés, avagy gyógyszerelváltás javasolt. Szöveti penetrációjuk kitűnő, egyedül a liquorban nem biztosítható megfelelő koncentráció.<sup>(29)</sup>

A fluorokinolonok **gyógyszerinterakciói** között klinikailag jelentősek találhatóak, melyeket minden esetben figyelembe kell venni alkalmazásukkor. A két- és három vegyértékű kationokkal oldhatatlan kelátot képeznek, mely miatt csökkent mértékben szívódnak fel a szerek a bélrendszerből. Ilyen szerek pl. az antacidok, vagy a vastartalmú

készítmények. Xantinszáramazékok, melyek közül kiemelendő az igen elterjedten használt theophyllin, esetén figyelembe veendő, hogy a ciprofloxacín gátolja a máj mikroszomális enzimrendszerében a lebontásukat, ezáltal intoxikációt hozhatnak létre. A fluorokinolonok növelik a warfarin eliminációs felezési idejét, ezáltal INR megnyúlást hozhatnak létre, mely a vérzéses szövődmények kockázatát növeli. Fluorokinolon terápia esetén a tizanidine májban történő metabolizációja gátolt, így szérumkoncentrációja akár tízszeresére emelkedhet. A tizanidin intoxikáció lehetséges következményei a következők: letargia, bradycardia, hypotensio, agitáció, zavartság, hányás, szélsőséges esetben kóma.

A köszvényellenes szerek közül a probenecid az elsősorban vesén át ürülő fluorokinolonok felezési idejét növeli, tehát a ciprofloxacínét és a levofloxacínét, melyek túldozírozása acut tubularis necrosist, illetve tubulointerstitialis nephritist okozhatnak.<sup>(29,27)</sup>

### 1.3 Fluorokinolon rezisztencia

Az EUCAST szerint rezisztensnek tekintünk egy baktériumot egy meghatározott antibiotikummal szemben, amennyiben az adott országban használatos rezsimek alapján a baktérium MIC értéke, az aktuálisan érvényben lévő rezisztencia határt túllépi. Ekkor alkalmazásától klinikai javulás természetesen nem várható, más antibiotikum alkalmazása szükséges.

Fluorokinolonok esetén, valamint egyéb antibiotikumok esetén is, a rezisztencia kialakulásának kulcsa a baktériumok mutációs képessége. Mutációk a giráz és topoizomeráz enzimekben konformáció változást idéznek elő, ezáltal csökkentve a fluorokinolonok érzékenységet ezen molekulák iránt. Ahhoz, hogy rezisztens törzsek kisselektálódjanak több mutációra együttesen szükség van. Tekintettel arra, hogy egy spontán mutáció nagyságrendileg egyszer jelentkezik minden  $10^7$  számú sejtosztódás során, a lehetősége annak, hogy több mutáció is egyszerre létrejöjjön korábban elhanyagolhatónak tűnt. A rezisztencia gének kialakulása jellemzően nagymértékben függ attól, hogy a természetben mennyi antibakteriális hatóanyaggal találkozik az adott mikroorganizmus, így a fluorokinolonok szintetikus jellege miatt nem tartották valószínűnek, hogy a természetben ezen hatóanyagokkal érintkezhetnek a baktériumok.<sup>(6)</sup> Később mégis számos mechanizmust találtak, mely a fluorokinolon rezisztencia



kialakulásához vezetett: **mutációk a girázt és topoizomerázt kódoló génekben**, efflux pumpák upregulációja, vagy külső membrán porinok csökkent expressziója. Mindegyik esetben a rezisztencia kialakulása mutációkon alapszik adott törzsből, melyek az utódsejtekben is jelen lesznek.<sup>(32,33)</sup>

**A plazmidon közvetített fluorokinolon rezisztenciát (PMQR)** 1998-ban írták le először, melyet elneveztek Qnr determinánsnak.<sup>(34)</sup>

Leírása óta számos Qnr gént detektáltak transzferábilis rezisztencia determinánsként, úgymint *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrE*, *qnrS*, valamint *qnrVC*.<sup>(35,36)</sup>

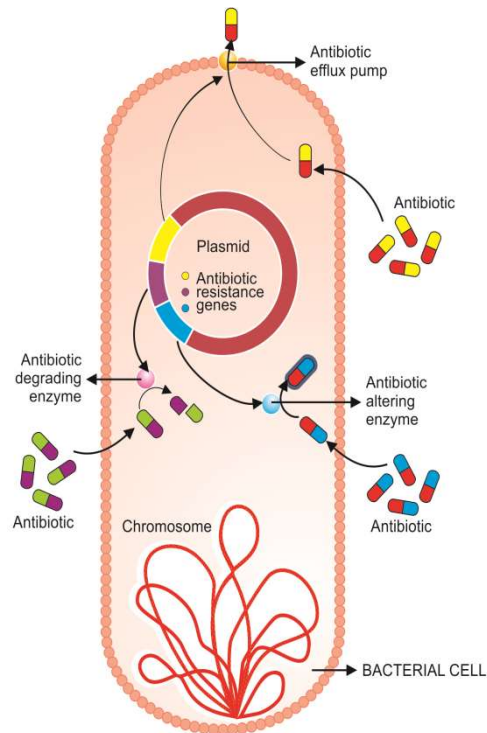
További plazmidon kódolt rezisztencia génként azonosításra került az *aminoglikozid-acetiltransferáz-(6')-Ib-cr* gén, valamint a QepA és OqxAB efflux pumpák génjei is.<sup>(6,37,38)</sup>

A plazmidon közvetített rezisztencia determinánsok Enterobacterales törzsekben önmagukban alacsony szintű fluorokinolon rezisztenciát eredményeznek. Ekkor a minimális gátló koncentráció (MIC) értéke magasabb, mint a vad típusú fenotípusé de még mindig az aktuálisan elfogadott rezisztencia érték határa alatt van. Az ezen állapotban lévő baktériumokban megemelkedik a mutációs frekvencia ( $1/10^8$  -ról  $1/10^6$ -ra) a kromozómális génekben, mely hozzájárul a magas szintű rezisztencia kialakulásához.<sup>(34)</sup>

A PMQR-ok közül a *qnrA*, *qnrB* és *qnrS* gének széles körben elterjedtek különböző Enterobacterales fajokban, ezzel szemben a *qnrC* gént eddig alig pár esetben azonosították.<sup>(39-42)</sup>

A *qnrD* gént elsőként *Salmonella spp.*-ben<sup>(43,44)</sup> majd *E. coli*-ban detektálták.<sup>(45)</sup> Később számos vizsgálatban leírásra került, hogy a Morganellaceae család fajai gyakrabban hordozzák a *qnrD* gént kisméretű, nem transzferábilis plazmidokon.<sup>(46-51)</sup>

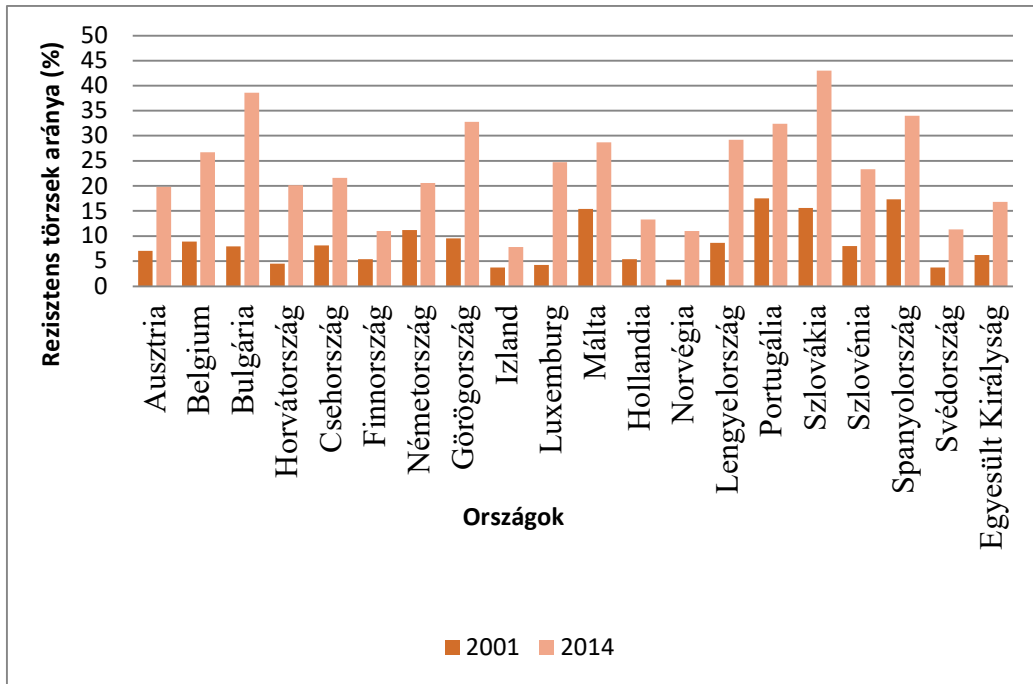
A *qnrE1*-et egy *K. pneumoniae* konjugábilis, kb. 185 kilobázispáros plazmidján mutatták ki, mely 25%-ban különbözött a *qnrB* alléljaitól.<sup>(52)</sup>



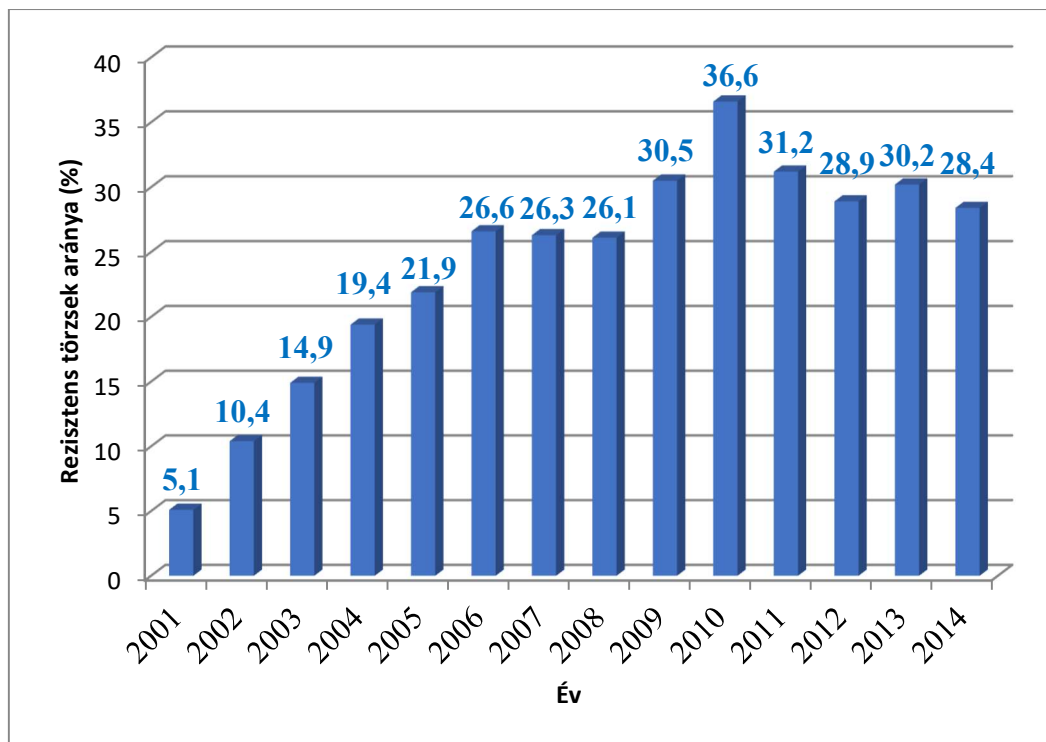
Ábra 6.: A fluorokinolon rezisztencia lehetséges mechanizmusai - kromoszómális mutációk vagy PMQR-ok<sup>(53)</sup>

Ahogy az ábrán látható, adott baktérium kromoszómális mutáció kialakításával, valamint plazmidon közvetített rezisztencia determinánsokkal (efflux pumpák, antibiotikum módosító enzimek, antibiotikum lebontó enzimek, valamint a plazmidon kódolt rezisztencia gének) védekezhet a fluorokinolonnak szemben. (Ábra 6)

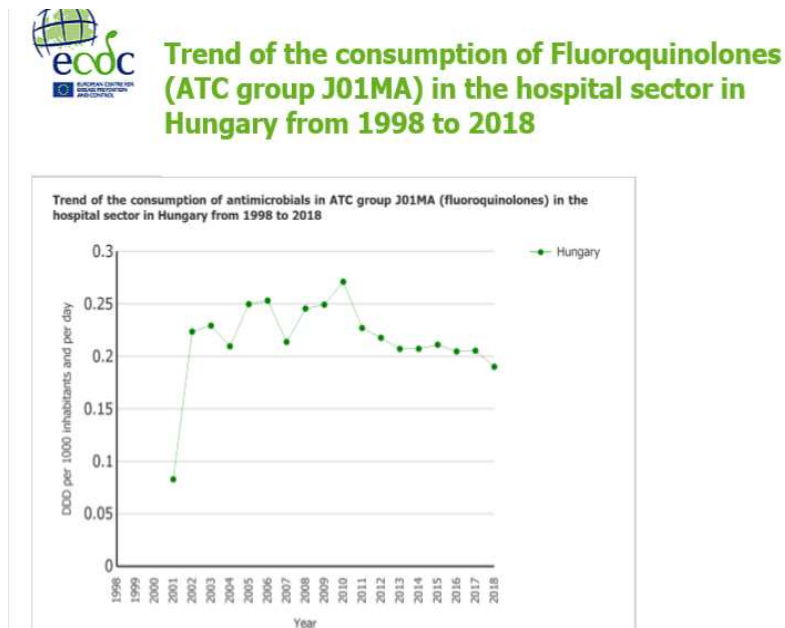
A fluorokinolon rezisztencia arányát *E. coli* törzsekben Magyarország és Európa országainak esetében a European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) adatbázis alapján az alábbi grafikonokon elemeztük. (Ábra 7, 8, 9 és 10)<sup>(54)</sup>



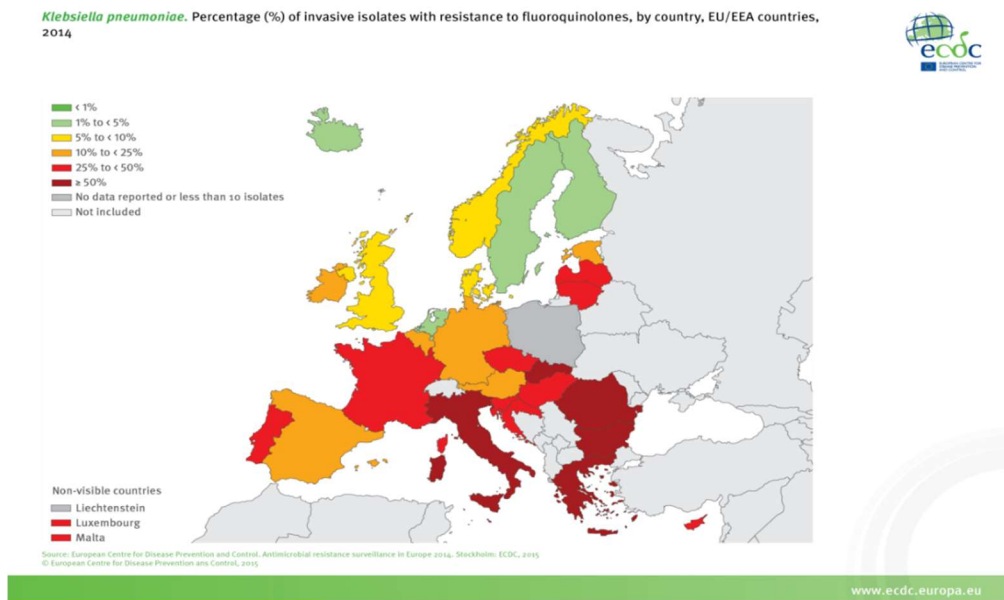
Ábra 7.: A rezisztens *E.coli* törzsek aránya nagymértékben emelkedett 2001-2014 között Európaszerte.<sup>(54)</sup>



Ábra 8.: A rezisztens *E.coli* törzsek aránya Magyarországon 2001-2014 között szintén jelentős emelkedést mutatott, a rezisztens törzsek arányának eddigi csúcsát 2010-ben detektálták.<sup>(54)</sup>



Ábra 9.: A fluorokinolon felhasználás aránya Magyarországon, csúcsa 2010-ben detektálható, mely korrelál a rezisztencia arányok alakulásával (ECDC)<sup>(54)</sup>



Ábra 10.: Fluorokinolon rezisztens *K. pneumoniae* törzsek aránya 2014-ben Európában (ECDC)<sup>(54)</sup>

## 1.4 Rezisztencia mechanizmusok

### 1.4.1 Kromoszómális rezisztencia mechanizmusok

A Gram-negatív baktériumokban a giráz enzim érzékenyebb a fluorokinolonok hatására, mint a topoizomeráz IV. Ennek megfelelően, Gram-negatívok esetén a mutáció elsősorban a *gyrA*-ban, később pedig a *parC*-ben következik be. Ezen mutációk az ún. kinolon-rezisztencia-determináns régióban előforduló aminosav szubsztitúciók. A változások az enzimek DNS kötő felszínét érintik.<sup>(55)</sup>

Az első mutációt követően, miután ez már csökkentette a giráz affinitását, újabb mutációk a *gyrA*, *gyrB* vagy *parC* génekben tovább növelhetik a rezisztenciát. Az antibiotikum érzékenység csökkenésének egy kézenfekvő magyarázata, hogy az aminosav változás affinitáscsökkenéssel jár. Ezen kívül a mutációk a célenzim funkcióját is csökkenthetik, gátolva az enzim-DNS komplexek, valamint a letális kettős szálú törések kialakulását.<sup>(56,57)</sup>

Figyelembe véve a bakteriális sejtek felépítését, a target elérése érdekében a fluorokinolonoknak a Gram-negatívok esetén a külső membránon és a citoplazmatikus membránon is át kell haladniuk. A Gram-negatív baktériumok azonban képesek regulálni külső membránjuk átjárhatóságát a membránproteinek expressziójának változtatásával, ezáltal újabb akadályt képezve az antibiotikumokkal szemben. Ezen fehérjék a passzív diffúzió számára csatornát képeznek. Mindemellett efflux rendszerek (pl.: AcrAB) is léteznek, melyek közül néhány folyamatosan jelen van, továbbiak szabályozó rendszerek által kontrolláltak, mások mutációk segítségével indukálhatók.<sup>(12)</sup> Példaként a *P. aeruginosa* több efflux pumpával rendelkezik, melyek a ciprofloxacint és egyéb antibiotikumokat eliminálják az intracelluláris térből.<sup>(58,59)</sup>

Az efflux pumpák specificitásának hiánya azt jelenti, hogy többféle anyagra adott válasz is aktiválhatja őket. Ezáltal aktiválódhatnak a kinolonok mellett pl. nem kinolon antibiotikumok, antiszeptikumok, detergensok vagy akár a nátrium-szalicilát által is.<sup>(60)</sup>

Még aktivált és működő efflux rendszer mellett is egyetlen mutáció a *gyrA* génben önmagában csekély MIC-emelkedést okoz, így ezen törzsek klinikailag érzékenyek tekintendők. Egy második mutáció ebben a génben, vagy egy más rezisztencia

meghatározó génben, okoz oly mértékű MIC-emelkedést, mely már eléri a klinikai rezisztencia határát.<sup>(61-63)</sup>

Általánosságban elmondható, hogy minél magasabb az adott törzs kinolon MIC-értéke, annál több mutációt tartalmaznak a *gyrA*, *gyrB*, *parC* és *parE* gének.<sup>(64)</sup>

A baktériumok bizonyos határok között kontrollálni képesek saját mutációs frekvenciájukat. Ha a frekvencia túlságosan magas, káros mutációk szaporodhatnak fel. Kevéssel az átlag feletti ráta esetén, a baktérium túlélése növekszik, hiszen ez a rezisztencia kialakulásának kedvez.<sup>(65)</sup>

A kinolonok önmagukban aktiválni képesek az SOS-response rendszert, mely szintén emelkedett mutációs rátához vezet a baktérium túlélése érdekében.<sup>(66)</sup>

A következő táblázat mutatja a különböző *gyrA*, *gyrB* és *parC* génekben bekövetkező mutációkat követő aminosav változásokat, melyek eltérő mértékű kinolon rezisztenciát okoznak. Ezek a mutációk specifikus szekvenciákon jelentkeznek, amelyeket kinolon rezisztencia determináló régióknak (QRDR) neveznek. A vad típusú *E. coli* esetén a giráz enzim 83-as szerin aminosava és a topoizomeráz IV esetén a 80-as szerin aminosav poláros hidroxil csoporttal rendelkeznek. Ezen aminosavakhoz a fluorokinolonok nagy affinitással kötődnek. A poláros aminosavak szubsztitúciója apoláros aminosavakra viszont csökkent fluorokinolon kötődést eredményez, amely rezisztenciához vezet. Látható, hogy a C4-es törzs esetében csupán a *gyrA* génben történt mutáció (Leu83) önmagában alacsony szintű fluorokinolon rezisztenciát okozott (MIC = 0,25 µg/ml). A *parC* génben egy második mutáció (Arg80, Ile80, Val84, Lys84), valamint az 1363-as törzs esetén a *gyrB* génben egy harmadik mutáció (Glu447) már definitív ciprofloxacinnal rezisztenciát váltott ki. Azon törzsek MIC-értéke, melyek legalább kettő mutációt tartalmaztak mind rezisztensnek minősültek.<sup>(67)</sup> (Táblázat 2)

**Táblázat 2.:** A mutációk száma és a rezisztencia közti összefüggés – minél több a mutáció, annál valószínűbb a rezisztens fenotípus kialakulása<sup>(67)</sup>

<b>Törzs</b>	<b>Ciprofloxacin MIC (µg/ml)</b>	<b><i>gyrA</i></b>	<b><i>gyrB</i></b>	<b><i>parC</i></b>
<b>C20</b>	0.007	Ser83... Asp87	Lys447	Ser80...Glu84
<b>C1</b>	0.06	Ser83... Asp87	Lys447	Ser80...Glu84
<b>C8</b>	0.125	Ser83... Asp87	Lys447	Ser80...Glu84
<b>C5</b>	0.25	Ser83... Asp87	Lys447	Ser80...Glu84
<b>C4</b>	0.25	<b>Leu83...Asp87</b>	Lys447	Ser80...Glu84
<b>C10</b>	1	<b>Leu83...Asp87</b>	Lys447	<b>Arg80...Glu84</b>
<b>1327</b>	2	<b>Leu83...Asp87</b>	Lys447	<b>Ile80...Val84</b>
<b>1289</b>	4	<b>Leu83...Asp87</b>	Lys447	<b>Arg80...Glu84</b>
<b>1363</b>	4	<b>Leu83...Asp87</b>	<b>Glu447</b>	Ser80...Lys84
<b>1273</b>	8	<b>Leu83...Tyr87</b>	Lys447	Ser80...Lys84
<b>1331</b>	8	<b>Leu83...Asn87</b>	Lys447	Ser80...Lys84
<b>1574</b>	8	<b>Leu83...Asn87</b>	Lys447	<b>Ile80...Glu84</b>
<b>1283</b>	16	<b>Leu83...Asn87</b>	Lys447	<b>Arg80...Glu84</b>
<b>1334</b>	16	<b>Leu83...Asn87</b>	Lys447	<b>Ile80...Glu84</b>
<b>1360</b>	32	<b>Leu83...Tyr87</b>	Lys447	Ser80...Lys84
<b>1416</b>	32	<b>Leu83...Asn87</b>	Lys447	<b>Ile80...Glu84</b>
<b>1323</b>	64	<b>Leu83...Asn87</b>	Lys447	<b>Ile80...Glu84</b>
<b>1319</b>	64	<b>Leu83...Asn87</b>	Lys447	<b>Ile80...Val84</b>
<b>1383</b>	128	<b>Leu83...Tyr87</b>	Lys447	<b>Ile80...Lys84</b>

### 1.4.2 Plazmidon közvetített rezisztencia mechanizmusok

A plazmidok 2.000-400.000 bázispárból álló cirkuláris DNS molekulák. A gazdasejt kromozómális DNS-étől függetlenül replikálódnak, sok esetben hordoznak rezisztencia géneket.<sup>(30)</sup>

A plazmidon kódolt fluorokinolon rezisztenciáért felelős gének a PMQR-ok: a *qnr*-géncsalád (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qnrE1*), az *aminoglikozid-acetiltransferáz-(6')-Ib-cr* [*aac-(6')-Ib-cr*], valamint a *qepA* és *oqxAB* efflux pumpa gének<sup>(68,35)</sup>

Kiemelt jelentőségüknek megfelelően, a továbbiakban részletesen tárgyalásra kerülnek a különböző PMQR-ok.

### 1.4.3 QNR-ok

#### 1.4.3/a Felfedezésük

Az első PMQR-t az 1990-es években írták le egy FOX5 béta-laktamázt termelő multirezisztens *K. pneumoniae* törzs plazmidját vizsgálva. Ezen plazmiddal transzkonjugáns baktérium tözseket hoztak létre, amelyekben emelkedett kinolon (nalidixsav) MIC értéket és csökkent fluorokinolon érzékenységet azonosítottak, sőt azt találták, hogy ezen transzkonjugánsokban a mutációs frekvencia a kromozómális génekben megemelkedett és ennek hatására a magasabb szintű fluorokinolon rezisztencia kialakulása felgyorsult.<sup>(34)</sup> A vizsgált plazmidon egy 657 bázispáros open reading frame-et azonosítottak, amely a kinolon rezisztenciát okozó fehérjét kódolta. A fehérjét elnevezték Qnr-nak<sup>(69)</sup>, később ez a determináns a **QnrA1** nevet kapta, tekintettel a továbbiakban felfedezett hasonló proteinekre, melyeket a QnrA2-A8-ba sorolták.<sup>(70-73)</sup>

2003-ban *Shigella flexneri* enterocolitis járványból Japánban nyolc törzset izoláltak. Ezek közül egy törzs volt fluorokinolonra rezisztens, amelyből izoláltak egy plazmidot, amin egy 218 aminosavból álló fehérjét kódoló szekvenciát azonosítottak. Ez a fehérje 59%-ban egyezett a QnrA1 szekvenciájával és a **QnrS1** nevet kapta. Később több QnrS variánst is felfedeztek (QnrS2-QnrS9).<sup>(74-76)</sup>

Indiában QnrA-t nem kódoló *K. pneumoniae* törzseket vizsgálva több is képesnek bizonyult átadni alacsony szintű kinolon rezisztenciát. Az ezen törzsekből izolálásra került PMQR gén egy 214 aminosavból álló fehérjét kódolt, amely a **QnrB1** elnevezést



kapta. Az évek során számos QnrB fehérje került leírásra (QnrB2-QnrB88) és napjainkban a PMQR-ok közül a *qnrB* gén rendelkezik a legtöbb variánssal.<sup>(74,6)</sup>

A *qnrC1* gént első alkalommal Sanghaiban izolálták egy *Proteus mirabilis* törzs plazmidján<sup>(39)</sup> és a napjainkig elvégzett vizsgálatok alapján elmondható hogy a QnrC egy ritkán detektált PMQR, azonban néhány klinikai izolátumokból származó *E. coli*-ban, *K. pneumoniae*-ban és *Shigella sonnei*-ben azonosították.<sup>(40-42)</sup>

Négy *Salmonella enterica* törzs Kínában csökkent érzékenységet mutatott ciprofloxacinnra, amelyből egy plazmidot egy *E. coli* TG1 és DH10B törzsbe sikeresen elektroporáltak. Ezen transzformált *E. coli* törzsek a fluorokinolonokkal szemben alacsony szintű rezisztenciát mutattak (0,125-0,25 mg/L). A vizsgált plazmid egy 214 aminosavas fehérjét kódolt, mely a **QnrD** nevet kapta.<sup>(43)</sup>

Argentínában 2007-ben egy 78 éves nő vizeletéből nyert *K. pneumoniae* törzs egy vad típusú kinolon rezisztencia régiót hordozott a *gyrA* gént tekintve, illetve alacsony szintű fluorokinolon rezisztenciát mutatott. A törzs azonban PCR vizsgálatokkal az addig detektálásra került *qnr* génekre negatív eredményt mutatott, mely egy addig ismeretlen *qnr* gén jelenlétére utalt. Ezen *K. pneumoniae* törzs plazmidját *E. coli*-ba transzferálták és a transzkonjugánsban tizenhatszoros fluorokinolon MIC érték emelkedést azonosítottak, mely alapján elmondható, hogy a törzs egy konjugábilis plazmidon kódolt kinolon rezisztencia determinánst hordozott. A determináns a **QnrE1** nevet kapta.<sup>(52)</sup>

#### 1.4.3/b Eredetük

Klinikai és környezeti mintákból származó 48 Gram-negatív baktérium törzs (Enterobacterales, Aeromonadaceae, Pseudomonas csoport, Xanthomonadaceae, Moraxella és Shewanellaceae) elemzése kapcsán a *qnrA* ösét egy *Shewanella algae* törzs kromoszómális génjeiben identifikálták. A *S. algae* a természetes vizekben elterjedt baktérium, ritkán okoz humán megbetegedést.<sup>(73)</sup>

Egy QnrS-szerű fehérjét azonosítottak *Vibrio splendidus*-ban, mely a baktérium törzsben kromoszómálisan kódolt. A protein 84-88%-os hasonlóságot mutat a QnrS1, valamint QnrS2 aminosav szekvenciájával.<sup>(77)</sup> A *Vibrio* család egyéb tagjai, mint a *V. vulnificus*, *V. fisheri*, *Photobacterium profundum*, szintén rendelkeznek kromoszómálisan kódolt Qnr-szerű rezisztencia determinánsokkal, melyek szekvenciája 40-67%-os hasonlóságot mutat a plazmidon-kódolt *qnr* génekkel.<sup>(73)</sup>

Annak érdekében, hogy felderítsék az új plazmidon kódolt kinolon rezisztencia determinánsok megjelenésének és terjedésének valószínűségét patogén baktériumok között, jelenlétüket közel 1000 törzs genomában, illetve metagenomában vizsgálták. Nagy számban detektáltak új, valószínűsíthetően *qnr* géneket vízi baktériumok kromoszómáiban és tengeri organizmusok metagenomában. Továbbá, a *Stenotrophomonas maltophilia* plazmidon kódolt *Smqnr* génje *E. coli*-ban expresszáldva kinolon rezisztenciát okozott. Mindezek megerősítik, hogy vízi baktériumok lehetnek a plazmidon kódolt Qnr-ok forrásai. Ezen túl kiemelendő a *S. maltophilia* valószínűsített kulcsszerepe a Qnr determinánsok eredeztetésében.<sup>(78)</sup>

*Serratia marcescens*-ből azonosították az SmaQnr pentapeptid repeat protein-t, mely *E. coli*-ban expresszáldva csökkentette mind a fluorokinolon, mind a nalidixsav érzékenységet. Az SmaQnr fehérje aminosav szekvenciája 80% egyezést mutat a QnrB1-el. Az *smqnr* géntől upstream egy LexA kötőhely található, melynek a génexpresszió regulációjában van jelentős szerepe az SOS-response rendszerrel kapcsolatosan. Az eredmények rámutatnak, hogy számos Gram-negatív baktérium hordoz Qnr-szerű kinolon rezisztencia géneket.<sup>(79)</sup>

Több Qnr-szerű fehérjét azonosítottak Gram-pozitív baktériumok kromoszómáiban, úgymint *E. faecalis*, *E. faecium*, *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, vagy *B. subtilis* törzsekben. A kromoszómáisan kódolt pentapeptid repeat fehérjék szerepe a törzsek intrinsic fluorokinolon rezisztenciájának kialakításában van.<sup>(80,81)</sup> Annak ellenére, hogy ezek a fehérjék csupán 16-22%-ban azonos aminosav szekvenciát mutatnak a QnrA1, QnrB1 valamint QnrS-el, *E. coli*-ban megjelent rekombináns plazmiduk csökkentette a nalidixsav és ciprofloxacín érzékenységet. A törzsek MIC-értékét akár a kiindulási, plazmidot nem hordozó törzseknek megfelelő érték tizenhatszorosára (0,008 – 0,25 µg/ml) emelték. Mindebből következik, hogy mind a Gram-pozitív mind a Gram-negatív baktériumok lehetnek a plazmidon közvetített Qnr-szerű proteinek forrásai.<sup>(81)</sup>

### 1.4.3/c Szerkezet és hatásmechanizmus, hatásuk a MIC-re és az MPC-re

A Qnr-ok a pentapeptid repeat fehérjecsaládba tartoznak. Ezen család tagjai, nevüknek megfelelően, 5 aminosavból álló tandem ismétlődést mutatnak. Aminosav szekvenciájuk a következő: [Ser, Thr, Ala vagy Val] [Asp vagy Asn] [Leu vagy Phe] [Ser, Thr vagy Arg] [Gly].<sup>(82)</sup>

Legtöbb esetben a pentapeptid repeat fehérjék természetes funkciója ismeretlen, annak ellenére, hogy ma már több mint 1000 tagja ismert. Kinolon rezisztenciában két fehérjének tulajdonítottak szerepet: az MfpA-nak és az McbG-nek. Az MfpA génjét először *Mycobacterium smegmatis* kromoszómális génjei között azonosították. A fehérje aminosav szekvenciája 18,9%-ban azonos a QnrA-val.<sup>(83)</sup> Az *mfpA* gén multicopy plazmidon expresszálandó a ciprofloxacinnal szemben négy- vagy akár nyolcszorosra képes emelni. Az *mfpA* inaktiválása *M. smegmatis*-ban növelte a ciprofloxacinnal szembeni érzékenységet. A gén egy variánsa *M. tuberculosis*-ban közvetlenül az enzimhez kötődve gátolta a giráz aktivitását. Mindebből következik, hogy az MfpA kompetícióban áll a giráz enzim DNS kötőhelyéért a DNS molekulával. Az MfpA-hoz kötött giráz nem tud részt venni a kinolon-giráz-DNS komplex kialakításában, így a kinolonok hatástalanná válnak.<sup>(84)</sup>

Az McbG egy pentapeptid fehérje, amely megvédi a DNS girázt néhány kinolonnal és a microcin B17-tel szemben.<sup>(85,86)</sup> A microcin B17 egy bakteriális toxin, ami a giráz enzim gátlója<sup>(87)</sup> és azon mikroorganizmusok melyek B17-et termelnek, egyidejűleg McbG-t is szintetizálnak.<sup>(85,86)</sup>

A Qnr-ok hatásmechanizmusának megértése érdekében a QnrA1 működését elemezték részletesen. A DNS szuperspirálok kialakulásának gátlása ciprofloxacinnal dózis-dependens módon visszafordítható volt tisztított QnrA-val. A QnrA önmagában azonban nem volt hatással a szuperspirálok kialakulására, bár egy QnrB variáns igen magas koncentrációban már kifejtett ilyen jellegű hatást.<sup>(69,6)</sup>

Később ismertté vált, hogy a QnrA képes az *E. coli* DNS girázhoz és topoizomeráz IV-hez közvetlen módon kötődni.<sup>(88)</sup> A QnrA kötődése a girázhoz relaxált DNS, ciprofloxacinnal és ATP hiányában történik, tehát az enzim-DNS-kinolon komplex kialakulása nem szükséges a működéséhez. Továbbá, az enzim-QnrA interakcióban a DNS és giráz kötődés erőssége csökken; így lehetséges, hogy az intermedier reakciót a QnrA a giráz katalitikus működésének korai szakaszában ismeri fel. Ekkor a giráz a DNS-

el lépne kölcsönhatásba, a kinolonok viszont ehhez képest később kötődnek, tehát a QnrA redukálhatja a holoenzim-DNS célpontokat a kinolonok számára.<sup>(69, 88)</sup>

Mindebből következik, hogy a QnrA girázhoz vagy topoizomeráz IV-hez kötődve minimalizálja annak a lehetőségét, hogy kialakulhasson a stabil letális giráz-DNS-kinolon komplex. Az, hogy a QnrA hogyan képes hatását kifejteni *in vivo* a giráz enzimen anélkül, hogy *in vitro* lényegesen gátolná annak aktivitását, egyelőre nem ismert. Valószínűsíthetően a rezisztencia kialakulásában szerepe van az expresszió szintjének, valamint az aminosav szekvenciában történő változásoknak is. Transzkonjugáns plazmidok, melyek *qnr* gént tartalmaztak ugyanis igen eltérő kinolon rezisztenciát mutattak, melynek valószínű oka a különböző szintű Qnr expresszió, valamint az ezt érintő nukleotid változások a promoter régiókban.<sup>(89-90)</sup>

Rodriguez és munkatársai vizsgálatai során a klinikai izolátumokban a *qnrAI* kópiák száma nem egyezett a vizsgált törzsekben, ezáltal a **gén kópiaszám és a rezisztencia** viszonyának meghatározása problémás volt. Figyelembe véve, hogy egyéb determinánsok is jelen lehetnek adott törzsben még inkább problematikusnak tekintették a rezisztenciaviszonyok meghatározását. Ugyanakkor *E. coli* transzkonjugánsokban nem mutatkozott *qnrAI* kópiaszámában különbség, viszont a **gén expresszió mértékében** igen. Pozitív összefüggést találtak mind ciprofloxacinnal, mind pedig moxifloxacinnal rezisztencia és a bazális, illetve a kinolon-indukált *qnrAI* expresszió kapcsolatában.<sup>(89)</sup>

Adott rezisztencia gén fluorokinolonok elleni védelme mértékének vizsgálatára általánosan a MIC-értékek összehasonlítása szolgál. Az *E. coli* törzsekben a QnrA, QnrB és QnrS esetében négyszeres MIC-érték emelkedést tapasztaltak (0,125-0,5 µg/ml) nalidixsav és ciprofloxacinnal.<sup>(91)</sup> A *qnr*-pozitív *non-typhi Salmonella* izolátumban illetve később egyéb bélbaktériumokban is csökkent ciprofloxacinnal érzékenységet azonosítottak, míg a törzsek nalidixsavra érzékenyek voltak.<sup>(92-94)</sup> QnrC (0,008 – 0,25 µg/ml), QnrA (0,002 – 0,125 µg/ml) és QnrD (0,002 – 0,06 µg/ml) esetén harminckétszeres, valamint hatvannégyszeres fluorokinolon MIC-érték emelkedést azonosítottak *E. coli*-ban.<sup>(39,43)</sup>

Bármely antibiotikum aktivitásának értékelése történhet a **mutáció prevenciós koncentráció** (MPC) segítségével. Az MPC az a legalacsonyabb antibiotikum koncentráció, mely ahhoz szükséges, hogy a rezisztens mutánsok ne jelenjenek meg egy  $10^{10}$  számú baktérium törzset tartalmazó kiindulási inokulumban. Mindaddig, amíg az

antibiotikum koncentrációja az MPC értéke felett marad, rezisztens mutánsok nem jelennek meg. Az MPC értéke egy vad típusú *E. coli* J53 esetén 0,125 µg/ml, míg egy *qnrA* plazmidot hordozó *E. coli* J53 esetén ez az érték ennek nagyjából tízszerese fluorokinolok esetén.<sup>(95)</sup>

Ebből az adatból arra lehet következtetni, hogy a QnrA fehérje nem közvetlen a baktériumok azonnali túlélését szolgálja, hanem a **rezisztens mutánsok kisselektálódásának** kedvez az adott populációban. A plazmidon közvetített rezisztencia rendkívül fontos eszköz a magas szintű bakteriális rezisztencia kialakulásában is. Az MPC értékek ciprofloxacinnra, levofloxacinnra és moxifloxacinnra nézve a *qnrA1* jelenlétében ugyanis a terápiás szérumszintű csúcskoncentrációhoz közeli értéket mutattak. Az MPC értékek pedig még tovább emelkedtek szimultán egyéb rezisztencia determináns jelenlétében.<sup>(96)</sup>

#### 1.4.3/d Plazmidok, inzerációs szekvenciák szerepe

A kinolon rezisztencia gének plazmidjai igen nagy méretbeli variabilitást mutatnak (2 - 320 kilobázispár) és számos rezisztencia determinánst is hordozhatnak egyidejűleg. Mindebből az következik, hogy a különböző plazmidok elterjedésének fontos szerepe van a világszinten elterjedt rezisztencia kialakulásában.<sup>(68)</sup>

A *qnrA* és *qnrB* egy komplex *sull*-típusú integron részei, mely tartalmaz egy feltételezett rekombinázt is, az *ISCR1*-et. A rezisztencia géneket tartalmazó integronok egy 59 bázispáros rekombinációs hellyel állnak kapcsolatban, közvetlen a 3'- régióban.<sup>(6)</sup> Ennek hiánya a *qnrA* esetében azt jelentheti, hogy egy egyedi mechanizmus mobilizálja a gént és integrálja azt a plazmidba. Ezt az elrendeződést a világ számos különböző pontján, az elmúlt 25-30 évben ugyanígy azonosították, mely arra enged következtetni, hogy a *qnrA* elterjedésének közös forrása lehet. A *qnrB* gén szintén kapcsolatban áll az *ISCR1*-el, ugyanúgy, mint egy feltételezett rekombinázzal, az Orf1005-el, valamint nem rezisztenciát kódoló génekkel is.<sup>(6)</sup>

Mindezzel ellentétben a *qnrS* gének nem minden esetben hozhatók kapcsolatba az *ISCR1*-el vagy integronokkal. Plazmidjai változatos méretűek és számos Enterobacterales faj hordozza őket.<sup>(74,97-101)</sup> A *qnrA*- és *qnrB*-pozitív plazmidok gyakran hordoznak más antibiotikum rezisztencia determinánst, pl. béta-laktám, aminoglikozid, chloramphenicol, tetracyclin, szulfonamid, trimetoprim vagy rifampicin rezisztencia

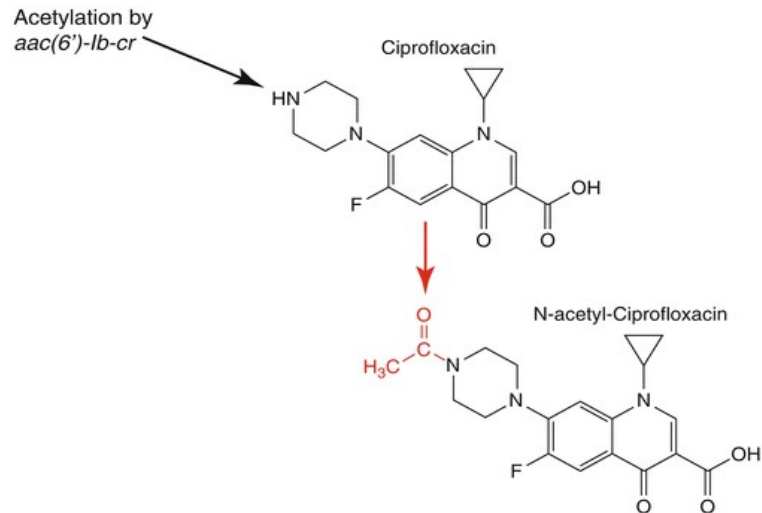
géneket. Az antibiotikum rezisztencia gének együttes megjelenése magyarázza a sokszor multidrog rezisztenciát mutató fenotípust QnrA-t, illetve QnrB-t termelő törzsekben.<sup>(102-105, 89)</sup>

A különböző antibiotikum rezisztencia mechanizmusok közül kiemelendő a béta-laktamázok és a fluorokinolon rezisztencia közötti kapcsolat, melyet világszerte leírtak. Nagyszámú plazmidot és mobilis genetikai elemet azonosítottak, melyek PMQR gént és béta-laktamáz géneket hordoztak: *qnrB19*, *bla<sub>KPC-3</sub>*, *bla<sub>SHV-11</sub>*, *bla<sub>TEM-1</sub>* és *aac-(6')-Ib-cr* gént hordozó plazmidot detektáltak *K. pneumoniae*-ben,<sup>(106)</sup> *qnrS1*-et és *bla<sub>VIM-1</sub>*-et hordozó plazmidot pedig *K. oxytoca*-ban.<sup>(107)</sup> Magyarországon ESBL-termelő Enterobacterales törzsekben azonosítottak QnrA, QnrB, QnrS és Aac-(6')-Ib-cr rezisztencia determinánsokat.<sup>(108)</sup>

A *qnr* és a *béta-laktamáz* géneket általában különböző integronokban azonosították. Ez alapján valószínűsíthető, hogy egymástól függetlenül integrálódtak a plazmidokba. Mindazonáltal detektálásra került már egyetlen integronban lévő *qnrA* és *VEB-1* béta-laktamáz gén is.<sup>(109)</sup>

#### 1.4.4 Az aminoglikozid-acetiltransferáz-(6')-Ib-cr

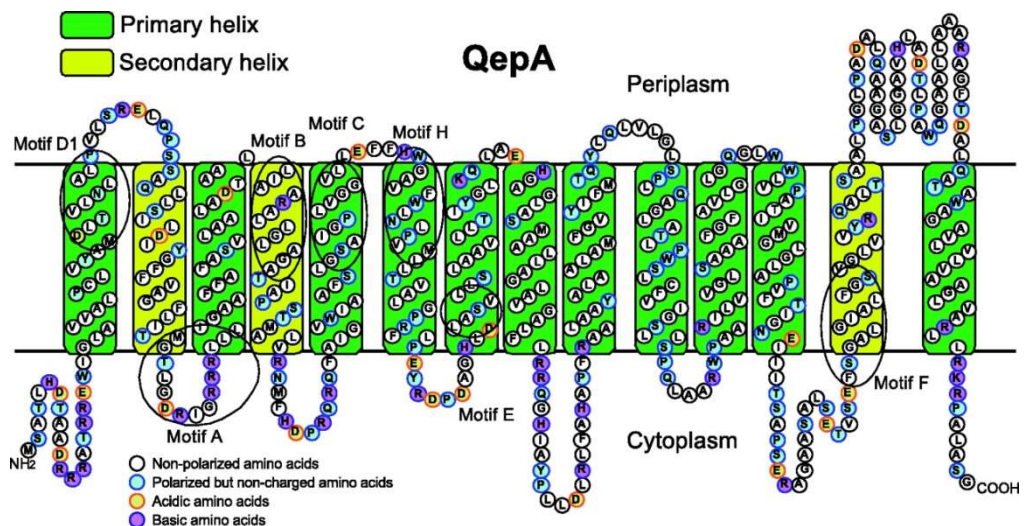
Az aminoglikozid-acetiltransferáz-(6')-Ib-cr [AAC-(6')-Ib-cr] enzim szintén a PMQR-ok közé tartozik. Eredetileg az aminoglikozidokkal (tobramycin, amikacin és kanamycin) szemben okozott rezisztenciát, azonban a vad típusú enzimben az *aac-(6')-Ib* génszekvenciájában két kodon cseréje (Trp102Arg valamint Asp179Tyr), szükségesnek és elegendőnek bizonyult a ciprofloxacin rezisztens fenotípus kialakulásához, így ezt az enzimvariánst AAC-(6')-Ib-cr-nek nevezzük. Az enzim a ciprofloxacin és a norfloxacin acetilálását végzi a piperazinyl gyűrűn lévő aminonitrogéneken és ezzel a módosulással inaktiválja ezen antibiotikumokat. (Ábra 11) Azon fluorokinolonokat, amelyek nem rendelkeznek piperazinyl gyűrűvel az enzim nem tudja acetilálni, ezáltal működése szelektív ciprofloxacinra és norfloxacinra. Az AAC-(6')-Ib-cr által okozott MIC-emelkedés kisebb mértékű, mint Qnr-ok esetén, de *E. coli* törzsekből izolálva, négyszeres ciprofloxacin MIC-érték emelkedést (0,02 – 0,08 µg/ml) tud elérni.<sup>(6)</sup>



Ábra 11.: AAC-(6')-Ib-cr acetilálja a ciprofloxacin molekulát<sup>(110)</sup>

#### 1.4.5 QepA efflux pumpa

A QepA efflux pumpa is a PMQR-ok közé tartozik és első alkalommal húgyúti mintából izolált *E. coli* plazmidján detektálták Japánban. A *qepA* gén egy 511 aminosavból álló proteint kódol, mely 14-transzmembrán transzporter fehérjéből áll és a Major facilitator superfamily (MFS) fehérje szupercsalád tagja. (Ábra 12) *E. coli*-ban ez az efflux pumpa harminckétszeres ciprofloxacin (0,004 - 0,125  $\mu\text{g/ml}$ ), hatvannégyszeres norfloxacin (0,016 – 1  $\mu\text{g/ml}$ ) és kétszeres nalidixsav (1 -2  $\mu\text{g/ml}$ ) MIC-érték emelkedést okozott.<sup>(37)</sup>



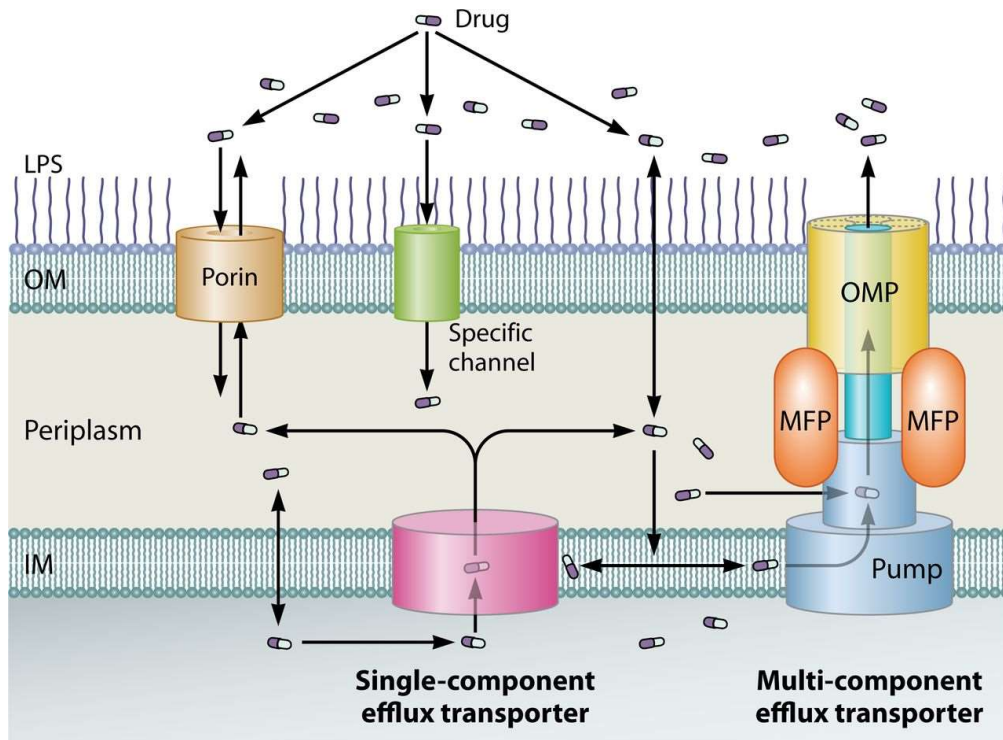
Ábra 12.: QepA efflux pumpa 14 transzmembrán fehérje szerkezete.<sup>(37)</sup>

#### 1.4.6 OqxAB efflux pumpa

Az OqxAB is a PMQR-ok közé tartozó efflux pumpa, amelyet elsőként egy *E. coli* törzs plazmidján detektáltak, amely olaquinox rezisztens volt. Az olaquinox egy quinoxalin derivátum, amely a mezőgazdaságban használt fluorokinolon antibiotikum és a haszonállatok (pl.: sertések) növekedésének fokozására alkalmazzák. Az OqxAB multidrog efflux pumpa a Resistance-Nodulation-Division (RND) fehérjecsald tagja és az olaquinox mellett a humán gyógyászatban használt fluorokinolonok közül norfloxacinnal és ciprofloxacinnal szemben is rezisztenciát tud kialakítani. Az OqxAB efflux pumpát kódoló gének, nevezetesen az *oqxA* és *oqxB*, *K. pneumoniae*-ben kromoszómáisan lokalizálódnak, eltérő expressziós aránnyal, mely korrelációt mutat a törzs olaquinox rezisztenciájával.<sup>(111)</sup> Egy az 1990-es évek végén végzett vizsgálatban Dániában és Svédországban, az *E. coli* törzsek csupán megközelítőleg 2%-a hordozta az OqxAB-t, ezzel szemben 90%-uk mutatott *qnrA* pozitivitást.<sup>(112,113)</sup>

Az RND efflux pumpa családba tartozó fehérje komplexek általános felépítése a következő: egy általában nagy méretű periplazmatikus domémből (ez esetben az OqxA), egy transzmembrán csatorna fehérjéből, valamint egy periplazmatikus adapter domémből (OqxB) állnak. (Ábra 13) Feladatuk többféle antibiotikum, valamint kemoterápiás ágens kipumpálása a bakteriális sejtéből. Aktív efflux rendszer mellett az antibiotikum ugyan bejut a baktérium periplazmatikus terébe, illetve cytoplasmájába, onnan azonban a periplazmatikus adapter protein és a transzmembrán csatorna eltávolítja azt. Így az adott antimikrobiális ágens ineffektívvé válik a baktériummal szemben. Az efflux pumpa fluorokinolonokat, penicillineket, cefalosporinokat is képes eliminálni a bakteriális sejtéből. Megjegyzendő, hogy *K. pneumoniae*-ben az OqxB önmagában is képes elvégezni az efflux pumpa feladatát.<sup>(113)</sup>





Ábra 13.: Az efflux pumpák működési elve –porinokon keresztül ugyan bekerülnek az antibiotikumok a periplazmatikus térbe, az efflux pumpa azonban transzmembrán doménjén keresztül kipumpálja azokat a sejtből<sup>(114)</sup>

#### 1.4.7 A PMQR-ok detektálása

Az első PMQR felfedezését követően a Qnr és egyéb kinolon rezisztencia determinánsok világszerte identifikálásra kerültek, eltérő prevalenciákat mutatva 1 és 50% között a vizsgált organizmustól és rezisztencia mechanizmustól függően. Ahogy az eddigiekből következtetni lehet, a PMQR-ok elterjedtségének megítélése nehézkes, hiszen önmagában a csökkent ciprofloxacín rezisztencia nem megbízható markere a PMQR-ok jelenlétének. Ugyan önmagukban a PMQR-ok valóban alacsony szintű fluorokinolon rezisztenciát hoznak létre, azonban olyan bélbaktériumok, melyek többféle rezisztencia determinánst hordoznak, előfordulhat, hogy akár magas szintű rezisztenciát mutatnak. A PMQR-ok tesztelése legtöbbször PCR alapú vizsgálatokkal történik. A *qnr* gének szűrése történhet multiplex PCR-rel, majd amennyiben ez pozitív eredményt mutat, szimplex PCR-rel az egyes *qnr* gének azonosításával folytatódhat a vizsgálat. Utóbbi eljárást Robicsek és munkatársai alkalmazták először.<sup>(6,68)</sup>

## 1.5 EUCAST és CLSI

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok elvégzésére és rezisztencia értékek interpretálására használatos két legelterjedtebb protokollt az EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) illetve a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) határozza meg. Magyarországon jelenleg az EUCAST által megadott protokollt követik.

Az alábbi két fő szervezet által meghatározott MIC és rezisztencia határértékek (breakpointok) jelentősége a klinikumban perdöntő, hiszen az adott izolált kórokozó baktérium törzs esetén ezek alapján születik meg a döntés, miszerint a törzs érzékeny vagy rezisztens az adott antibiotikumra, illetve az alkalmazható antibiotikum terápiát is ez alapján lehet meghatározni. Emiatt rendkívül fontos, hogy adott mikrobiológiai laboratórium naprakész guideline-okkal dolgozzon.

Az évek során számos törekvés volt a CLSI és az EUCAST protokollok harmonizálásra azonban így is több különbség van a két szervezet protokolljai között.<sup>(115, 116)</sup>

Az EUCAST breakpointok online felületen bárki számára ingyenesen elérhetők, a CLSI dokumentumok hozzáféréséhez azonban 350-től 500 dollárig terjedő feliratkozási díjat szükséges fizetni évente, mely az anyagilag hátrányos helyzetben lévő mikrobiológiai laboratóriumok számára problémát okozhat. Továbbá, a döntéshozatali folyamat részletei a CLSI esetén nem elérhetők a nyilvánosság számára, sőt az FDA-nek (Food and Drug Administration) nagymértékű befolyása van a breakpointok meghatározására, ugyanis mind a tudományos szakemberek, mind pedig a gyógyszeripar képviselői részt vehetnek a döntéshozatalban. Az EUCAST esetében az iparnak kizárólag konzultációs szerepe van és az EUCAST úgynevezett NAC-ok (National Antimicrobial Susceptibility Testing Committees), nemzeti antimikrobiális érzékenységi tesztelést végző szervezetek létrehozását szorgalmazza, melyek egy-egy képviselőt delegálhatnak a nemzetközi csoportba, ahol a döntést közösen hozzák meg. A protokollokban szereplő antibiotikumok között különbség van, mert azon antibiotikumok, melyek az Egyesült Államokban nem engedélyezettek, Európában viszont igen, a CLSI guideline-okba nem kerülnek bele.<sup>(117)</sup>

Az EUCAST az elmúlt években több alkalommal is módosította a kinolon és fluorokinolon érzékenységi és rezisztencia határértékeket. 2011-ben a nalidixsavat

kivették a rutin tesztelendő hatóanyagok közül és mind a mai napig csak a szűréshez lehet használni. Ezt követően az Enterobacterales törzsekben, kivételt képezve ez alól a *Salmonella* spp.-t, a ciprofloxacin érzékenyégének meghatározása esetén 2016-ig az érzékenységi határ 0,5 mg/L volt, a rezisztencia határa pedig 1 mg/L értékben volt meghatározva. 2017. január elsejétől, ezen breakpointokat csökkentették: érzékenynek kell tekinteni 0,25 mg /L-es MIC érték alatt a törzset, míg 0,5 mg/L felett rezisztensnek kell tekinteni. 2020. január 1-jétől az EUCAST a delafloxacin rezisztencia határértékét is meghatározza (0.125 mg/L)<sup>(118)</sup>

## 2. Célkitűzések

Első vizsgálatunk során a PMQR-ok prevalenciáját húgyúti mintákból izolált Enterobacterales törzseken elemeztük. Célunk a törzsek fluorokinolon, béta-laktám és aminoglikozid antibiotikum érzékenységének megállapítása, valamint a kromoszómális és plazmidon kódolt rezisztencia determinánsok jelenlétének felderítése volt.

Azon *E. coli* törzsek esetén, melyek legalább 1 *qnr* determinánst hordoztak, 6 fontos virulenciafaktor jelenlétének meghatározását terveztük.

Az első vizsgálatunk során alkalmazott 214 Enterobacterales törzs közül kettő olyan *K. pneumoniae* törzs került kiválasztásra, melyek ciprofloxacinnal MIC-értéke a 2016-ban elfogadott EUCAST irányelvek alapján az érzékeny tartományba tartozott, tehát 1 mg/L alatti volt. Ezen kívül a korábban vizsgált ciprofloxacinnal rezisztencia determinánsok közül egyedül az OqxAB efflux pumpa génjeit hordozták, de más PMQR génre nézve negatívak voltak. A két törzs esetén célunk az OqxAB efflux pumpa génexpressziójának vizsgálata volt ciprofloxacinnal expozíció hatására és ezen efflux pumpa szerepének vizsgálata magasabb szintű fluorokinolon rezisztencia kialakulásában. Célunk volt továbbá ezen *K. pneumoniae* törzsek 7 housekeeping génjének szekvenálása alapján az MLST típus meghatározása.

A *qnrD*-t hordozó *M. morganii* törzs esetén célunk volt a *qnrD*-t hordozó plazmid szekvenálása, valamint Genbank-i adatok alapján a már ismert *qnrD* plazmidok szekvenciájával való összevetése. Ezt követően a plazmid szekvenciák filogenetikai elemzését terveztük. Vizsgálataink során a *qnrD*-t hordozó *M. morganii* esetén ciprofloxacinnal expozíció hatására a *qnrD* gén expresszió változásának meghatározását terveztük.

### 3. Módszerek

#### 3.1 PMQR prevalencia meghatározása és fluorokinolon rezisztencia felmérés

##### 3.1.1 Törzsek

Vizsgálataink során összesen 214 Enterobacterales törzset analizáltunk, amelyeket a Semmelweis Egyetemen izoláltak húgyúti mintákból 2013 és 2014 között. A vizsgált törzsek taxonómiai eloszlása az Enterobacterales renden belül a következőképpen alakult:

- Enterobacteriaceae család:
  - 99 *E. coli*
  - 32 *Klebsiella* spp.
  - 20 *Enterobacter* spp.
  - 6 *Citrobacter* spp.
- Morganellaceae család:
  - 36 *Proteus* spp.
  - 5 *Morganella* spp.
  - 1 *Providentia stuartii*
- Yersiniaceae család:
  - 15 *Serratia* spp.

A baktérium törzsek identifikálása MALDI-TOF/MS (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight/mass spectrometry) módszerrel történt. A törzsek fluorokinolonokkal szembeni érzékenységének interpretálása az akkor érvényes EUCAST ajánlás szerint történt. A törzsek ezen túlmenő, részletes elemzése vizsgálataink során történt, a vizsgálat kezdetén csupán identifikálásuk volt adott, valamint érzékeny, mérsékelt érzékeny vagy rezisztens fenotípusuk volt ismert, melyet korong diffúziós módszerrel állapítottak meg.

### 3.1.2 MIC meghatározás

Antibiotikum érzékenységi vizsgálatot végeztünk ciprofloxacinnra, cefotaximra, ceftazidimre, ceftriaxonra, amikacinra és tobramycinre mikrodilúciós módszerrel 96 lyukú microplate-ben Mueller-Hinton tápoldatban. Az eredmények értékelése az aktuális, 2014-ben érvényben lévő, EUCAST előírásoknak megfelelően történt.<sup>(32)</sup>

A MIC meghatározáshoz Müller-Hinton (cation adjusted) Beckton Dickinson táptalajt alkalmaztunk. Az antibiotikumok a Semmelweis Egyetem gyógyszer-tárából kerültek beszerzésre, ezeket 0,06 és 128 mg/L közötti koncentráció tartományban alkalmaztuk. A MIC vizsgálathoz használt baktériumtörzsek overnight tenyésztést követően kerültek a vizsgálatra, 0,5 McFarland denzitású oldatból, 100 mikroliter inokulumot mérve 100 mikroliter leveshez. A törzseket 37°C-on, konvencionális termosztátban inkubáltuk, a növekedés leolvasása pedig szabad szemmel történt.

### 3.1.3 PMQR detektálás

A PMQR gének detektálása PCR-rel történt. DNS előkészítést végeztünk minden tesztelt törzsön. Az adott baktérium szintenyészetének 2-3 telepét 0,5 ml-es összetérfogatú bidesztillált (Milipore) vízben feloldottuk majd 100°C-on 15 percig tartó hőkezelést követően 13000 rpm-en 4°C-on centrifugálást végeztünk és a szupernatánst használtuk DNS templátnak a PCR vizsgálathoz.

A PCR-hez az alábbi összetevőket használtuk:

- 1x PCR puffer {10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl} (Sigma-Aldrich)
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich)
- 200 mM mindegyik deoxy nukleotid trifoszfátból: dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Sigma-Aldrich)
- 1 egység Taq polimerázt (Sigma-Aldrich)
- egyenként 20 pmol-t minden oligonukleotid primerből
- bakteriális DNS templát

A *qnrA*, *qnrB* és *qnrS* gének vizsgálatát multiplex PCR-el végeztük, specifikus primer párokkal, melyek közül a *qnrA* fwd és *qnrA* rev, *qnrB* fwd és *qnrB* rev, *qnrS* fwd és *qnrS* rev primer párok egyenként 516, 540 és 417 bázispár nagyságú fragmenteket amplifikáltak.

Az amplifikálás a következő PCR program szerint történt: 10 min 95°C, majd 32 ciklus amplifikáció mely 45 sec 94°C, 45 sec 53 °C és 1 min 72°C ciklusokból állt, majd további 10 min 72 °C-on folyt a reakció.<sup>(6,77)</sup>

A *qnrC* és *qnrD* esetén szimplex PCR-t végeztünk, szintén specifikus primer párokkal. A PCR vizsgálatot *qnrC* fwd és *qnrC* rev, *qnrD* fwd és *qnrD* rev primerek esetén az alábbi profil szerint végeztük el: 94°C 5 min; majd 30 ciklus 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min; végül 72°C 10 min zajlott a reakció. A *qnrC* és *qnrD* primer párok 447 illetve 550 bp termékeket amplifikáltak.<sup>(39,43)</sup>

Az *aac-(6')-Ib-cr* gént PCR-rel amplifikáltuk a következő hőmérsékleti profillal: 94°C 45 sec, 55°C 45 sec és 72°C 45 sec, 34 cikluson át. Eredményképpen 482 bp terméket kaptunk. Tekintettel arra, hogy az alkalmazott oligonukleotid primerpár [*aac(6')-Ib* fwd és rev] az aminoglikozid acetiltranszferáz enzim vad típusát AAC-(6')-Ib valamint az AAC-(6')-Ib-cr kódoló gént is amplifikálja ezért, minden pozitív PCR terméket tovább vizsgáltuk BstF5I restrikciós enzimmel (New England Biolabs, Ipswich, MA). Az *aac-(6')-Ib-cr* génben hiányzik a BstF51 restrikciós helye, a vad típusában viszont jelen van.<sup>(119)</sup>

A *qepA* 199 bp-os fragmentjét szintén PCR-rel amplifikáltuk *qepA* fwd és *qepA* rev primerekkel. A következő hőmérsékleti profilt alkalmaztuk: denaturáció 96°C 1 min; majd 30 ciklus amplifikáció 96°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min; végül 72°C 5 min.<sup>(37)</sup>

Az *oqxAB* rezisztencia determinánsokat specifikus *oqxA* fwd és *oqxA* rev, valamint *oqxB* fwd és *oqxB* rev primerpárok segítségével PCR-rel vizsgáltuk az alábbiak szerint:

- *oqxA* esetén: 94°C 45 sec, 57°C 45 sec és 68°C 60 sec 34 cikluson keresztül
- *oqxB* esetén: 94°C 45 sec, 64°C 45 sec és 72°C 60 sec 32 cikluson át.

Az *oqxA* egy 392 bp-os, az *oqxB* pedig 512 bp-os terméket amplifikált.<sup>(38)</sup>

A vizsgált gének amplifikációját a MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler-en végeztük. A PCR termékeket elektroforézissel vizsgáltuk 1,5%-os agaróz gélben (Sigma-Aldrich), 120 V-on 20 percig 1xTAE pufferben {40mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM acetát és 1 mM EDTA}. A DNS ampikonokat 0,05 mg/L GelRed festékkel (Biotum) detektáltuk UV-transzilluminátorral.

A vizsgálatához használt primer párokat táblázatban foglaltuk össze (Táblázat 3)

**Táblázat 3.:** A fent részletezett vizsgálatokhoz használt primer párokat az alábbi táblázatban összegeztük:

<b>primer név</b>	<b>szekvencia</b>	<b>hivatkozás</b>
<i>qnrA</i> fwd	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	6
<i>qnrA</i> rev	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	6
<i>qnrB</i> fwd	ATGACGCCATTACTGTATAA	6
<i>qnrB</i> rev	GATCGCAATGTGTGAAGTTT	6
<i>qnrS</i> fwd	ACGACATTCGTCAACTGCAA	6
<i>qnrS</i> rev	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	6
<i>qnrC</i> fwd	GGGTTGTACATTTATTGAATC	39
<i>qnrC</i> rev	TCCACTTTACGAGGTTCT	39
<i>qnrD</i> fwd	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	43
<i>qnrD</i> rev	AACAAGCTGAAGCGCCTG	43
<i>qepA</i> fwd	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	37
<i>qepA</i> rev	CTTCCTGCCCGAGTATCGTG	37
<i>oqxA</i> fwd	CTCGGCGCGATGATGCT	38
<i>oqxA</i> rev	CCACTCTTCACGGGAGACGA	38
<i>oqxB</i> fwd	TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC	38
<i>oqxB</i> rev	CTCGGCCATTTTGGCGCGTA	38
<i>aac-(6')-Ib</i> fwd	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	119
<i>aac-(6')-Ib</i> rev	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	119

### 3.2 Virulencia faktorok detektálása *E. coli* törzsekben

Összesen 8 db *E. coli* törzs került kiválasztásra, melyek mindegyike legalább 1 *qnr* génre pozitívítást mutatott a korábbi PCR vizsgálatok során. A virulencia faktorok detektálása szintén PCR-el történt. A következő virulencia faktorok jelenlétét teszteltük:

- afimbriális adhezinek (afa)
- S és FIC fimbriák (sfa/foc)
- pyelonephritis asszociált pilus (pap)
- K-antigén (kpsMT)
- P-fimbria (pil)



Minden vizsgált baktérium törzsből néhány izolált telepet 500 µL bidesztillált vízben 100 °C-on 10 percig hővel kezeltük. Ezt követően 15 percen át kerültek centrifugálásra 13000 rpm sebességgel, 4 °C-on. Centrifugálást követően a felülúszóból 3 µL használatával 200 ng DNS templátot alkalmaztunk, melyet nanodroppal ellenőriztünk, a PCR vizsgálatához a következő összetevőkkel 50 µL teljes volumenben: 1,25 U Taq DNS polimeráz (Sigma-Aldrich); 0,5 µM minden virulencia faktor oligonukleotid primeréből; 0,2 mM dNTP mix (Sigma); 2,5 mM Mg<sup>2+</sup> puffer (Sigma-Aldrich).

A reakció a következő szerint zajlott le: 30 ciklus 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1,5 min, majd ezt követően 7 perc elongáció 72 °C-on.

Az amplikonok analízise elektroforézissel történt 1,5%-os agaróz gélen (Sigma-Aldrich), 120 V-on 25 percig 1xTAE pufferben {40mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM acetát és 1 mM EDTA}, melyet követően 15 perces GelRed festékkel (Biotum) történt festésük. Az eredményeket UV-transzilluminátorral detektáltuk.

A fent részletezett vizsgálatokhoz használt primer párokat az alábbi táblázatban összegeztük: (Táblázat 4)

Táblázat 4.: A fenti vizsgálat során használt primerek

Primer	Szekvencia	Hivatkozás
<i>afa fwd</i>	5'-GCGGGCAGCAAACCTGAAACTCTC-3'	141
<i>afa rev</i>	5'-CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG-3'	
<i>sfa/foc fwd</i>	5'-CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC-3'	
<i>sfa/foc rev</i>	5'-CGGAGGAGTAAATTACAAACCTGGCA-3'	
<i>pap fwd</i>	5'-GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT-3'	
<i>pap rev</i>	5'-AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA-3'	
<i>kpsMT fwd</i>	5'-CCATCGATACGATCATTGCACG-3'	142
<i>kpsMT rev</i>	5'-ATTGCAAGGTAGTTCAGACTCA-3'	
<i>pil fwd</i>	5'-CATTCGCCTGTAAAACCGCC-3'	143
<i>pil rev</i>	5'-ATAACACGCCCGCCATAAGCC-3'	

### 3.3 Az *oqxAB* efflux pumpa génexpressziós vizsgálata *K. pneumoniae* törzsekben

#### 3.3.1 Vizsgált törzsek

A további vizsgálatokhoz két *K. pneumoniae* törzset választottunk ki, melyek a korábbiakban OqxAB efflux pumpát hordozónak bizonyultak, míg más PMQR-t nem azonosítottunk esetükben. Mindkét törzs az aktuálisan, tehát 2016-ban érvényben lévő EUCAST irányelvek szerint érzékenynek bizonyult ciprofloxacinra. (Táblázat 5) A ciprofloxacin rezisztencia határértékét 2017 január elsejétől csökkentették Enterobacterales esetén, mely szerint a 0,5 mg/L-es MIC érték immáron és azóta nem tekintendő fluorokinolon érzékenynek.

### 3.3.2 Ciprofloxacin expozíció

A két vizsgált törzsből egyenként 0,5 McFarland denzitású baktérium szuszpenziót készítettünk Mueller-Hinton tápoldatban, majd ezeket kezdetben a saját MIC értéküknek megfelelően 0,06, illetve 0,5 mg/L-es ciprofloxacin expozícióba helyeztük 37 °C-on 24 órára. A szuszpenziókból 30, 60, 90 és 120 perc, majd 24 óra múlva vett mintákból RNS extrakciót végeztünk. A baktérium szuszpenziókat ezt követően 0,5 McFarland denzitásúra hígítottuk és 1, 2, 4, illetve 8 mg/L-es koncentrációjú, fokozatosan emelkedő ciprofloxacin oldatba helyeztük. Minden egyes inkubáció 37°C-on 24 órán át történt. Minden esetben az emelkedő ciprofloxacin koncentrációban történt 24 órás inkubálás után RNS extrakció történt az *oqxAB* efflux pumpa expresszió szintjének megállapítására.

### 3.3.3 Kvantitatív reverz-transzkriptáz PCR analízis

A vizsgálat során alkalmazott mintákból az adott időpontokban RNS-kivonást Qiagen RNeasy Mini Kit-tel végeztük. Első lépésként az adott baktériumtörzs szuszpenziót Eppendorf-csőbe helyeztük, majd 5000 x g értéken centrifugáltuk 10 percen keresztül és az így kapott felülúszót lepipettáztuk. A centrifugálással nyert baktérium törzs pelletét 20 µL Proteináz K és 200 µL lyozim tartalmú Tris-EDTA (pH:8) pufferben feloldottuk. 25 °C-on történő inkubáció és vortexelés után hozzáadtuk az RLT puffert, majd 700 µL-t a mintából átmértünk RNeasy Mini spin oszlopba és 8000 x g mellett 15 sec-ig centrifugáltuk. Ezt követte a 700 µL RW1 puffer és 8000 x g 15 sec centrifugálás, majd 500 µL RPE puffer és 8000 x g 15 sec centrifugálás és újabb 500 µL RPE-puffer és 8000 x g 2 min centrifugálás. Az utolsó centrifugálás után a mintát egy új Eppendorf csőbe helyeztük, majd 50 µL RNáz-mentes vizet pipettáztunk a Qiagen oszlopban lévő membrán felszínére és 8000 x g 1 min centrifugálással eluáltuk az RNS mintát.

Az RNS minták vizsgálatához Step One Real-Time PCR System-et (Applied BioSystems, Thermo Fisher Scientific) az alábbi protokollal alkalmaztuk: 60°C 30 sec, 50°C 5 min 95°C 10 min és [95°C 15 sec 60°C 1 min] x 40 ciklus és 60°C 30 sec.

Az *oqxA* és az *oqxB* gének expressziójának szeparált vizsgálatához oligonukleotid primereket valamint FAM és VIC jelölésű próbákat terveztünk. Kontrollként az *rpoB*

housekeeping gén expresszióját használtuk. Minden a kvantitatív RT-PCR vizsgálatban használt primert és próbát a Primer Express 3.0 programmal terveztük. (Táblázat 5)

Minden vizsgálatot három párhuzamos tesztben végeztünk. A gének Ct értékeit az *rpoB* housekeeping gén Ct értékére normalizáltuk ( $\Delta\Delta C_t$ ), és a relatív expressziót a  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  értékében állapítottuk meg.<sup>(120)</sup>

**Táblázat 5:** A vizsgálat során használt oligonukleotid primerek és próbák. Mindegyik oligonukleotidot ebben munkában terveztünk a Primer Express 3.0 program segítségével

Primer vagy próba	Szekvencia
<i>gyrA</i> fwd	CAGCCCTTCAATGCTGATG
<i>gyrA</i> rev	CGCTTTTACTCCTTTTCTGTTC
<i>parC</i> fwd	CTCAATCAGCGTAATCGCC
<i>parC</i> rev	AATCCTCAGCCGATCTCAC
<i>Kpn.rpoBF1</i> fwd	GTCGCGGCTGAACAAGCT
<i>Kpn.rpoBF1</i> rev	AACGGCCACTTCGTAGAAGATC
<i>Kpn.rpoBF1</i> -VIC probe	CTACGGCAGGTAACC
<i>oqxAF1</i> fwd	GTCGACGGCTTACAAAAGTGTT
<i>oqxAR1</i> rev	GCAACGGTTTTGGCGTTAA
<i>oqxAPI</i> -FAM probe	ATGCCGGGTATGCC
<i>oqxBF1</i> fwd	CTGGATTTTCCGTCCGTTTAAC
<i>oqxBR1</i> rev	TTGCCTACCAGTCCCTGATAGC
<i>oqxBPI</i> -FAM probe	CTGCGCAGCTCGAA

### 3.3.4 Mutációk azonosítása a *gyrA* és *parC* génekben

A *gyrA* és *parC* génekben történő mutációk kialakulását a ciprofloxacinnal való expozíció során nyert bakteriális szuszpenziókból PCR-rel és nukleinsav szekvenálással vizsgáltuk. A ciprofloxacinnal kezelt törzsek néhány telepét 500  $\mu$ L bi-desztillált vizet (Milipore) tartalmazó Eppendorf csőbe helyeztük, majd 100°C-on 10 percig forraltuk. Ezt követően 15 percig 4°C-on 13000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk. Ennek az elegynek 3  $\mu$ L szupernatánsát DNS templátként használtunk PCR-hez a következő komponensekkel

együtt: 1.25 U RedTaq DNS polymeráz (Sigma-Aldrich), 0.5  $\mu\text{M}$  a *gyrA* fwd és rev, valamint a *parC* fwd és rev oligonukleotid primerből, 0.2 mM dNTP mix (Sigma-Aldrich), 2.5 mM puffer  $\text{Mg}^{2+}$  (Sigma-Aldrich), 50  $\mu\text{l}$  végtérfogatban. Az alábbi PCR protokollal amplifikáltunk: denaturáció 95°C 3 min; majd 95°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1 min 30 cikluson át; végül 72°C 5 min.

### 3.3.5 Multilocus szekvencia tipizálás (MLST)

Mindkét vizsgált *K. pneumoniae* törzs esetén multilocus szekvencia tipizálást végeztünk a 7 housekeeping gén PCR termékének nukleinsav szekvencia analízise alapján. A hét housekeeping gén mindegyike olyan enzimeket kódol, amelyek a bakteriális sejt metabolikus aktivitásához szükségesek:

- *rpoB*: RNS polimeráz béta alegysége
- *gapA*: gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz
- *mdh*: malát dehidrogenáz
- *pgi*: phosphoglucose izomeráz
- *phoE*: phosphorine E
- *infB*: transzlációs iniciációs faktor 2
- *tonB*: periplazmatikus energia transzducer<sup>(119)</sup>

Az MLST vizsgálathoz a housekeeping gének tekintetében az alábbi primer párokat használtuk: (Táblázat 6)

Táblázat 6.: Az MLST vizsgálathoz használt housekeeping gének oligonukleotid primereinek szekvenciái<sup>(119)</sup>

Locus	fwd primer szekvencia	rev primer szekvencia
<i>rpoB</i>	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC
<i>gapA</i>	TGAAATATGACTCCACTCACGG	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT
<i>mdh</i>	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG
<i>pgi</i>	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT
<i>phoE</i>	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT
<i>infB</i>	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC
<i>tonB</i>	CTT TATACCTCGGTACATCAGGTT	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG

A housekeeping gének PCR vizsgálata az alábbi protokoll szerint történt: 95°C 3 min; 95°C 1 min, 60°C (*gapA* esetén) vagy 50°C (*rpoB*, *mdh*, *pgi*, *phoE* és *infB* esetén) vagy 45°C (*tonB* esetén) 1 min, 72°C 1 min 30 cikluson át; 72°C 5 min.<sup>(119)</sup>

Mind a *gyrA* és *parC* génekben, mind az MLST vizsgálatoknál a DNS amplikonok analízise elektroforézissel történt 1,5%-os agaróz gélen (Sigma-Aldrich), 120 V-on 20 percig 1xTAE pufferben {40mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM acetát és 1 mM EDTA}. A DNS amplikonokat 0,05 mg/L GelRed festékkel (Biotum) detektáltuk UV-transzilluminátorral. A PCR pozitív amplikonok tisztítása QIAquick PCR Purification Kit segítségével történt. A nukleinsav szekvenálást a BIOMI Kft végezte, Sanger-féle szekvenálási módszerrel.

### 3.3.6 Statisztikai elemzés

Az *oqxA* és *oqxB* gén expresszió szintjében kialakult különbségeket 2 mintás t próbával elemeztük.

## 3.4 A *qnrD* plazmidot hordozó *M. morganii* vizsgálata, illetve a *qnrD* plazmidok filogenetikai elemzése

### 3.4.1 Törzsek

A korábban vizsgált 214 törzsből 1 *M. morganii* hordozta a *qnrD* gént. Ezen törzset, illetve plazmidot elemeztük.

### 3.4.2 A *qnrD* plazmid szekvenciájának elemzése

A *qnrD* determináns azonosítása PCR-el történt, a korábban leírtaknak megfelelően. Pozitív kontrollként egy *qnrD*-t hordozó *E. coli* törzs szolgált. A PCR termékek tisztítása szintén Qiagen PCR Purification Kit segítségével történt. Inverz PCR-t végeztünk a *qnrD* pozitív törzseken, a *qnrD* fwd és a *qnrD* rev primerek komplementer antiparallel szálaival annak érdekében, hogy amplifikáljuk a *qnrD*-t hordozó plazmid externális részeit. A következő hőmérséklet profilt alkalmaztuk: denaturáció 95°C 2 min; 30 ciklus 94°C 30 sec, 53 °C 30 sec, 72°C 5 min; elongáció 72°C 10 min.<sup>(46)</sup>

A további plazmid DNS részeket általunk tervezett primerpárokkal amplifikáltuk, melyeket online primertervező program segítségével terveztük (Eurofins Genomics; <http://www.eurofinsgenomics.eu>). Ezen primerpárok a következők voltak: PL1D fwd és PL2D rev, PL3D fwd és PL4D rev, PL5D fwd és PL6D rev, PL7D fwd és PL8D rev. (Táblázat 7) Ezen primer párokat külön PCR vizsgálatban alkalmaztuk, az előbbieken részletezett protokoll szerint.

A pozitív PCR termékeket Qiagen PCR purification Kit segítségével megtisztítottuk, majd szekvenáltattuk (BIOMI KFT, Gödöllő). A plazmid szekvenciáját az NCBI adatbázisban jegyzett plazmidok szekvenciáival hasonlítottuk össze.

Táblázat 7.: A *qnrD* plazmid analízishez használt primerek

Primer	Oligonukleotid szekvencia	Hivatkozás
<i>qnrD</i> fwd	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	43
<i>qnrD</i> rev	AACAAGCTGAAGCGCCTG	
INVDF/rev	TATTCCCCGTAAATTGATCTCG	46
INVDR/fwd	CAGGCGCTTCAGCTTGTT	
PL1D fwd	ATTCAATCCGCAACGCTC	A vizsgálatban tervezett primerek
PL2D rev	ATGCCACTCATTCTGGAC	
PL3D fwd	ACCACATTTTTGAGCGACC	
PL4D rev	CCATTCCAGCGATTTTCCC	
PL5D fwd	GCATCGAACATCACTAATAACG	
PL6D rev	AGAGCACCAATCAACGGAC	
PL7D fwd	CCAGCCGAAGAAAATAGCC	
PL8D rev	CGAAAGAAGCCCAACCTAAC	

### 3.4.3 A kinolon rezisztencia determináns régió analízise

A topoizomeráz gén kinolon rezisztencia determináns régióinak, vagyis QRDR-einek, amplifikálása PCR-el történt, az ampikonok elemzéséhez pedig DNS szekvenálást végeztünk. A *gyrA* és *parE* esetén a felhasznált primer párokat az Eurofins MWG Operon honlapon terveztük. (Táblázat 8) A PCR protokoll az alegységek detektálásához a következő volt: 95 °C 2 min; 30 ciklus 94 °C 30 sec, 50 °C 30 sec, 72 °C 1 min; majd 72 °C 5 min.

Táblázat 8.: A QRDR-ok detektálásához használt primerek

Primer	Oligonukleotid szekvencia	Hivatkozás
<i>gyrA fwd</i>	ATGCCAAAGAAATCTTGCCC	Ebben a munkában tervetük
<i>gyrA rev</i>	AGTTACCCTGACCATCCACC	
<i>parE fwd</i>	AGAACGTCTCTCATCACGCC	
<i>parE rev</i>	TGCTTAAATCGTCGCTGTCC	
<i>gyrB fwd</i>	CTGCCGGGCAAACCTGGCAGA	121
<i>gyrB rev</i>	TCGACGTCCGCATCGGTCAT	
<i>parC fwd</i>	AAGAAATCCGCCCCGTACCGT	
<i>parC rev</i>	CGGTGCCCCCAGTTCCCCT	

A *gyrB* és *parC* alegységekben történt esetleges mutációkat PCR-el vizsgáltuk az alábbiak szerint: 5 percig tartó 94 °C-os kezdeti denaturáció, majd 35 cikluson keresztül 30 másodpercig 94 °C, 30 másodpercig primer kötődés 40 °C *gyrB* esetén, 45 °C a *parC* esetén és 30 másodpercig 72 °C, végül 5 percig tartó 72 °C-os elongáció.<sup>(121)</sup>

A PCR termékek tisztítása Qiagen PCR Purification Kit-el történt, majd szekvenálásra kerültek. A szekvencia analízist a BLAST (basic local alignment search tool) programmal végeztük, az NCBI Genbank-i adatok alapján.



### 3.4.4 A *qnrD* plazmidok összehasonlítása és filogenetikai elemzése

Az SE10MM nevű törzs *qnrD* plazmid szekvenciáját a Genbank-i adatokkal hasonlítottuk össze. A plazmid szekvenciák csoportosítása és filogenetikai besorolása a Geneious 9.0.5 szoftver csomaggal történt. Ahhoz, hogy több szekvenciát csoportosítsunk a ClustalW nevezetű applikációt használtuk. Ennek eredménye alapul szolgált a filogenetikai fa felépítéséhez, melyhez a Geneious Tree Builder-t alkalmaztuk. Neighbor joining beállítást használtunk a filogenetikai fa elkészítéséhez, valamint Jukes-Cantor genetikai távolság modellt az ágak hosszának becsléséhez.

### 3.4.5 Konjugációs vizsgálatok

A vizsgálathoz az SE10MM törzset használtuk, mint *qnrD* plazmid donort, valamint recipiensként egy *E. coli* J53 Azide<sup>R</sup> törzset.

Mindkét törzs esetén 0,5 McFarland denzitású inoculumot készítettünk a reakcióba lépéshez. Három különböző donor:recipiens arányt alkalmaztunk: 1:2, 1:4, illetve 1:10 rátát, 5mL-es Luria-Bertani (LB) tápoldatban. A reakcióhoz a törzseket 37°C-on inkubáltuk rázás nélkül 5 órán át. Ezen reakciókból 80 µL-nyit helyeztünk szelektív LB agar közegbe, mely 100 mg/L nátrium-azidot és 0,06 mg/L ciprofloxacint tartalmazott. 24 órás inkubálást követően 37 °C-on vizsgáltuk a transzkonjugánsokat.

### 3.4.6 A *qnrD* expresszió analízis és a *qnrD* plazmid kópia szám elemzése kvantitatív reverz-transzkriptáz PCR-el

A *M. morganii* SE10MM törzs 0,5 McFarland denzitású szuszpenzióját 24 órás 1mg/L-es ciprofloxacinnal expozícióba helyeztük MH tápoldatban, hogy megállapítsuk a *qnrD* gén expressziójának és a plazmid kópiaszámának változását. A baktérium törzs növekedését 0, 2, 4, 6, 8, 12 és 24 óra múlva monitoroztuk spektrofotométerrel (OD<sub>640</sub>). Ugyanazon törzs 0,5 McFarland denzitású szuszpenzióját ciprofloxacinnal expozíció nélkül alkalmaztuk negatív kontrollként.

Minden megadott időpontban teljes RNS extrakció történt a vizsgált törzsekből a Qiagen RNeasy Mini Kit-tel a fentebb már részletezett protokoll szerint. A kvantitatív reverz transzkriptáz PCR Step One RT-PCR-rel történt. A *qnrD* gén és a *qnrD* plazmid specifikus szekvenciára oligonukleotid primereket és 6-FAM és VIC jelzésű próbákat terveztünk a Primer Express 3.0 programmal. A plazmidon a szekvencia a *qnrD* gén és

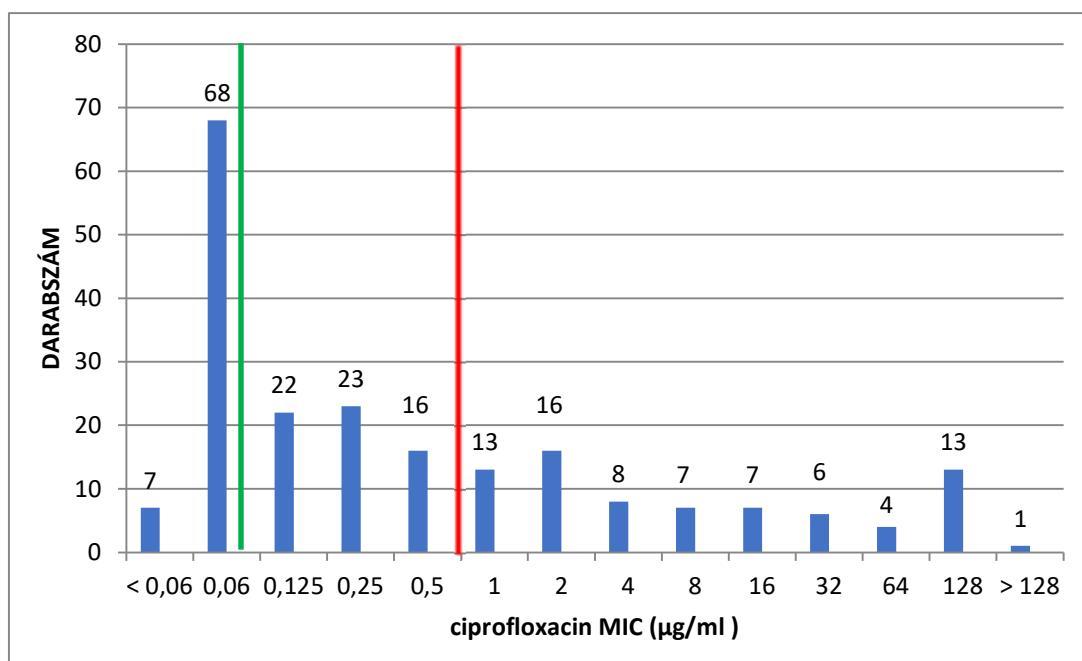
az invert repeat right szekvencia között helyezkedik el. A *recA* gént is vizsgáltuk, mint az SOS-response rendszer egyik regulátor génjét. Housekeeping gén kontrollként a kromoszómális *rpoB* gént használtuk. Minden primert és próbát a Primer Express 3.0 programmal terveztük. Minden tesztet triplikátumban végeztünk. A gének Ct értékeit az *rpoB* housekeeping gén Ct értékére normalizáltuk ( $\Delta\Delta Ct$ ), és a relatív expressziót a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  értékében állapítottuk meg a Livak-Schmittgen dupla delta Ct módszert alkalmazva.<sup>(120)</sup> Az expresszió szintek különbségeit t próbával elemeztük.

## 4. Eredmények

### 4.1 PMQR gének prevalenciája húgyúti fertőzésekből izolált Enterobacterales törzsekben

A kollekciónhoz tartozó 214 törzs ciprofloxacinnal MIC-értéke 0,06 és 128 µg/ml között oszlott meg. 75 törzs vad típusú fenotípust mutatott, 61 alacsony szintű rezisztenciával rendelkezett, 75 pedig rezisztensnek bizonyult, ahogy a következő diagramon is látható:

(Ábra 14)



Ábra 14.: A vizsgált törzsek ciprofloxacinnal MIC érték szerinti számszerű eloszlása -75 vad típusú, 61 alacsony szintű rezisztens és 75 rezisztens fenotípust azonosítottunk.

A 214 vizsgált törzsből 38 hordozott valamilyen PMQR-t, akár egyetlen egyet, vagy többféle PMQR kombinációját is. A tesztelt törzsekben így összességében 17,7%-os PMQR prevalenciát azonosítottunk. A 38 törzs közül 15 mutatott *qnr* pozitívítást, köztük 8 *qnrS*-t, 6 *qnrA*-t, 2 *qnrD*-t, valamint 1 *qnrB*-t. (Táblázat 9)

Táblázat 9.: A PMQR-ok eloszlása a törzsekben

Törzs	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac</i> -(6')- <i>Ib-cr</i>	<i>oqxA</i>	<i>oqxB</i>
<i>E. coli</i>	2	1	-	-	8	8	5	-
<i>Proteus spp.</i>	4	-	-	-	-	2	3	-
<i>Klebsiella spp.</i>	-	-	-	-	-	7	6	1
<i>Enterobacter spp.</i>	-	-	-	-	-	4	1	1
<i>Serratia spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter spp.</i>	-	-	-	-	-	2	-	-
<i>M. morgani</i>	-	-	-	2	-	1	1	-
<i>P. stuartii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

Két *E. coli* törzs mind *qnrA*-t, mind pedig *qnrS*-t hordozott, ámbar ciprofloxacín MIC értékük alapján a vad típusú fenotípust mutatták. Két *M. morgani* törzs esetén *qnrD* pozitivitást azonosítottunk, emellett 4 *P. mirabilis* hordozott *qnrA*-t. Összesen 19 törzs esetén azonosítottunk *oqxA* és *oqxB* gén együtthordozását, nevezetesen 18 *K. pneumoniae* és 1 *E. aerogenes* kapcsán. Mindazonáltal az *oqxA* és *oqxB* géneket külön-külön hordozó törzsek is detektálásra kerültek:

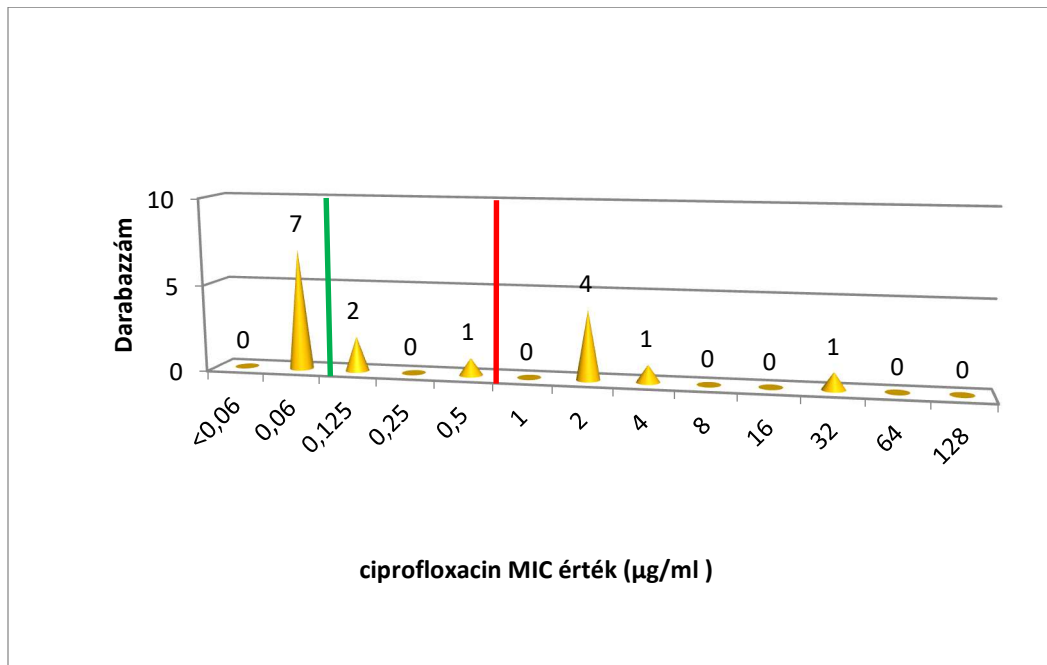
- összesen 20 esetben észleltünk kizárólagos *oqxA* hordozást, nevezetesen 13 *E. coli*, 3 *P. mirabilis*, 3 *Klebsiella spp.* és 1 *M. morgani* esetén
- kizárólagos *oqxB* hordozást 5 esetben észleltünk: 4 *Enterobacter spp.* és 1 *K. oxytoca* esetében.

Vizsgálatunk során sem *qepA* sem *qnrC* nem került detektálásra.

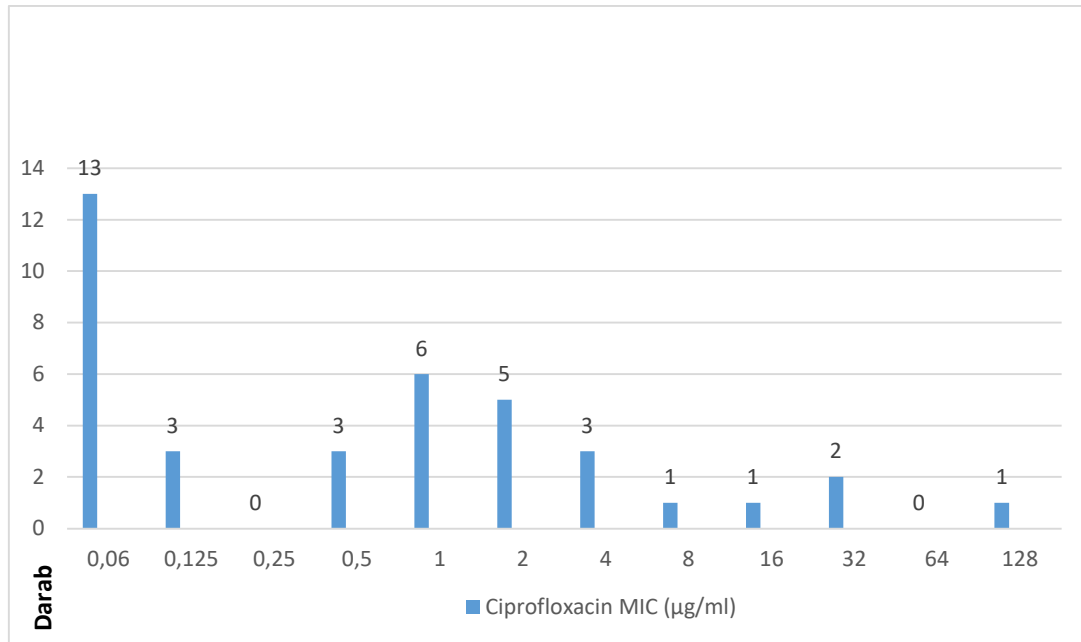
A 23 *aac*(6')-*Ib-cr* gént hordozó törzsek BstF51 restrikciós enzim analízise alapján 9 *aac*(6')-*Ib-cr* variánst igazolt. A gént *E. coli*-ban, *M. morgani*-ban, *Klebsiella spp.*-ben, illetve *Enterobacter spp.*-ben azonosítottuk.

A 38 PMQR pozitív törzsből, melyből 16 hordozott valamilyen *qnr* gént, 25 MIC értéke nem érte el a ciprofloxacín rezisztencia határértéket a 2016-ban érvényes EUCAST

adatok szerint (a vizsgálat során ez volt aktuális). A *qnr* determinánsokat hordozók közül 7 vad típusú, 3 alacsony szintű rezisztens és 6 rezisztens törzset azonosítottunk. (Ábra 15) A PMQR hordozó törzsekből összesen 6 alacsony szintű rezisztens (MIC 0,5-1 mg/L között), 13 vad típusú (MIC  $\leq$  0,06mg/L) és 19 rezisztens (MIC  $>$ 1 mg/L) fenotípust mutatott. (Ábra 16) Mindazonáltal mindegyik érzékeny volt ceftriaxonra, egy *E. coli* és két *K. pneumoniae* kivételével. Imipenemre minden törzs érzékenynek bizonyult, a *M. morgani* törzsek imipenem esetén ismert intrinsic rezisztenciájukat mutatták. (Táblázat 10)



Ábra 15.: A különböző *qnr* géneket hordozó törzsek ciprofloxacin MIC-értékei szerinti megoszlása -7 vad típusú, 3 low-level rezisztens és 6 rezisztens törzset azonosítottunk



**Ábra 16.:** A különböző PMQR-t hordozó törzsek ciprofloxacin MIC-érték szerinti eloszlása – 13 vad típusú, 6 low-level rezisztens és 19 rezisztens törzset azonosítottunk.

A ciprofloxacin, ceftriaxon és imipenem antibiotikumok klinikailag jelentősek a húgyúti infekciók, illetve a húgyúti kiindulású septicus folyamatok kezelésében. 2016-ban ezen antibiotikumok esetén a baktériumok érzékenységi szintje a következő MIC értékben volt megállapítva:

- ciprofloxacin: 1 mg/L
- ceftriaxon: 2 mg/L
- imipenem: 8 mg/L

Az alábbi táblázatban a PMQR hordozó törzsek ciprofloxacin, ceftriaxon és imipenem antibiotikum érzékenységét mutatjuk be: **(Táblázat 10)**

**Táblázat 10.:** A PMQR hordozó törzsek ciprofloxacín, ceftriaxon és imipenem MIC értékei – a MIC érték alapján rezisztens fenotípus esetén a MIC értéket félkövér betűtípussal jelöltük

Sorszám	Törzs	PMQR	ciprofloxacín MIC (mg/L)	ceftriaxon MIC (mg/L)	Imipenem MIC (mg/L)
1	<i>E. coli</i>	<i>qnrB</i>	<b>1,0</b>	0,06	0,25
2	<i>E. coli</i>	<i>qnrS</i>	0,5	0,06	0,25
3	<i>E. coli</i>	<i>qnrS</i>	0,06	0,06	0,5
4	<i>E. coli</i>	<i>qnrS</i>	0,125	0,06	0,25
5	<i>E. coli</i>	<i>qnrS</i>	<b>2,0</b>	0,06	0,25
6	<i>E. coli</i>	<i>qnrS</i>	0,06	0,06	0,25
7	<i>E. coli</i>	<i>qnrS, aac(6')- Ib-cr</i>	<b>32</b>	<b>128</b>	0,25
8	<i>E. coli</i>	<i>qnrA, qnrS</i>	0,06	0,06	0,125
9	<i>E. coli</i>	<i>qnrA, qnrS</i>	0,06	0,06	0,125
10	<i>M. morgani</i>	<i>qnrD</i>	<b>2,0</b>	0,06	4,0
11	<i>M. morgani</i>	<i>qnrD, aac(6')- Ib-cr</i>	<b>2,0</b>	0,06	4,0
12	<i>P. mirabilis</i>	<i>qnrA</i>	<b>4,0</b>	0,06	2,0
13	<i>P. mirabilis</i>	<i>qnrA</i>	<b>2,0</b>	0,06	4,0
14	<i>P. mirabilis</i>	<i>qnrA</i>	<b>4,0</b>	0,06	4,0
15	<i>P. mirabilis</i>	<i>qnrA</i>	0,06	0,06	4,0
16	<i>E. aerogenes</i>	<i>oqxAB</i>	0,125	0,06	0,25
17	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	<b>8,0</b>	0,25	0,25
18	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	0,06	0,5	0,25
19	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	<b>128</b>	0,06	0,5

20	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	0,06	0,06	0,125
21	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	0,06	0,06	0,125
22	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	0,5	0,06	0,125
23	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	0,06	0,06	0,125
24	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	0,06	<b>128</b>	0,25
25	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	0,125	0,5	0,25
26	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	0,06	0,25	0,25
27	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	<b>1,0</b>	1,0	0,25
28	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	0,06	0,06	0,25
29	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	<b>16</b>	0,125	0,25
30	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	0,06	0,25	0,125
31	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB</i>	0,5	1,0	0,125
32	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB, aac(6')-Ib-cr</i>	<b>1,0</b>	<b>128</b>	0,25
33	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB, aac(6')-Ib-cr</i>	<b>2,0</b>	0,5	0,25
34	<i>K. pneumoniae</i>	<i>oqxAB, aac(6')-Ib-cr</i>	<b>4,0</b>	0,25	0,5
35	<i>K. oxytoca</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<b>32</b>	1,0	0,25



36	<i>K. pneumoniae</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	1,0	0,06	0,25
37	<i>E. kobei</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	1,0	0,125	0,5
38	<i>E. cloacae</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	1,0	0,25	0,25

#### 4.2 Virulencia faktorok detektálása *E. coli* törzsekben

A virulencia faktorok vizsgálatára kiválasztott *E. coli* törzsekben a *pil* gént sikerült minden esetben azonosítanunk, míg a többi faktor eltérő mértékű megjelenést mutatott.

(Táblázat 11)

Táblázat 11.: A virulencia faktorok eloszlása a kiválasztott *E. coli* törzsekben

Törzs	<i>afa</i>	<i>pap</i>	<i>pil</i>	<i>sfa/foc</i>	<i>kpsMT</i>
<i>E. coli</i> 15	x	x	pozitív	x	x
<i>E. coli</i> 38	x	pozitív	pozitív	pozitív	pozitív
<i>E. coli</i> 177	x	pozitív	pozitív	pozitív	pozitív
<i>E. coli</i> 178	x	x	pozitív	x	pozitív
<i>E. coli</i> 180	pozitív	x	pozitív	x	pozitív
<i>E. coli</i> 184	x	x	pozitív	pozitív	pozitív
<i>E. coli</i> 193	x	x	pozitív	x	pozitív
<i>E. coli</i> 199	x	pozitív	pozitív	pozitív	pozitív

#### 4.3 *Klebsiella pneumoniae* *oqxAB* effluxpumpa szerepe fluorokinolon rezisztenciában

A továbbiakban a táblázatban részletezett két *K. pneumoniae* törzssel folytattuk vizsgálatainkat. A törzsek ciprofloxacinnal érzékenynek minősültek, valamint egyéb PMQR gént nem hordoztak az *oqxAB*-n kívül. (Táblázat 12)

**Táblázat 12.:** A vizsgált *K. pneumoniae* törzsek ciprofloxacin MIC értékei, illetve PMQR PCR eredményei – a törzsek érzékenynek minősültek és csak az *oqxAB* gént hordozták

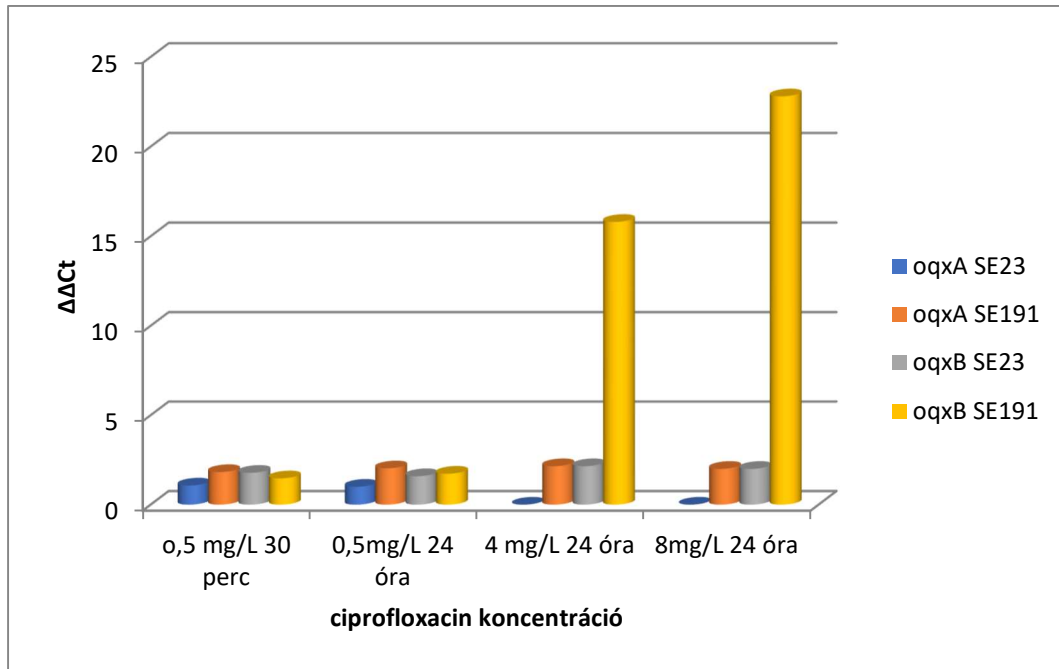
	<i>K. pneumoniae</i> 23 (SE23)	<i>K. pneumoniae</i> 191 (SE191)
<b>MIC (mg/L)</b>	0,06	0,5
<b><i>qnr A,B,C,D,S</i></b>	negatív	negatív
<b><i>aac-(6')-Ib-cr</i></b>	negatív	negatív
<b><i>qepA</i></b>	negatív	negatív
<b><i>oqxAB</i></b>	<b>pozitív</b>	<b>pozitív</b>

A vizsgált két *K. pneumoniae* törzset emelkedő ciprofloxacin koncentrációban történő inkubáció során az SE23 törzs esetén a 0,5 mg/L-es koncentrációnál magasabb értékeken növekedést nem detektáltunk. Az SE191 törzset azonban sikeresen szoktattuk a magasabb ciprofloxacin koncentrációkhoz, így egy rezisztens törzset kisselektálva.

Kvantitatív RT-PCR-rel vizsgáltuk az *oqxA* és *oqxB* gének expresszióit, a 30. percben vett minta esetén 0,5 mg/L-es ciprofloxacin expozícióban, valamint a 4 és 8 mg/L-es ciprofloxacin expozíció esetén is. Minden esetben a *rpoB* housekeeping gén kontroll mellett elemeztük a kapott adatokat.

A számított adatok szerint a 0,5 mg/L koncentrációjú ciprofloxacinnak 30 percig kitett törzsek *oqxA* normalizált expressziós rátája az SE23 esetén 1,07, az SE191 esetén pedig 1,82 volt. A 24 órás inkubálást követően az adatok 1,0-nak, valamint 2,03-nak bizonyultak. A 4, illetve 8 mg/L-es koncentrációban az SE191 *oqxA* expressziója 2,15, illetve 2,0 volt. A látott eredmények érdemi expresszióváltozást nem jelentenek.

Az expresszió változása az SE191-ben *oqxB* esetén lényegesen jelentősebb volt. A kezdeti 30 perces érték 1,47 volt ezt követően, a 4, illetve 8 mg/L-es expozícióban viszont 15,8 és 22,8 értékeket mutatott. (Ábra 17)



**Ábra 17.:** Az *oqxA* és *oqxB* expressziós rátája az SE23 és SE191 törzsekben – a vizsgálatok jelentős *oqxB* emelkedést detektáltak emelkedő ciprofloxacin koncentrációkban. Az expressziós vizsgálatok t-teszt eredménye alapján:  $t = 1,88$ ;  $p = 0,04$ .

A törzsek *gyrA* és *parC* génjeiben esetlegesen létrejövő mutációkat PCR módszerrel ellenőriztük. Az SE191 *gyrA* génjében egy szerin-tirozin aminosav cserét detektáltunk a 83-as pozícióban a vizsgálat kezdetén, új mutációt ciprofloxacin expozíció következményeként azonban a vizsgálat során nem detektáltunk. Az SE23-ban mutációt nem észleltünk.

MLST vizsgálatot végeztünk mindkét törzs esetén. Az SE191-es törzs ennek eredményeként az ST274-es ST típusba tartozott, az SE23 azonban egy korábban nem detektált ST típust mutatott, ez az ST2567. Az új ST típus egy új *tonB* allél variánst hordozott, nevezetesen a 371-es *tonB* variánst, mely 2 mutációt tartalmazott a hozzá legközelebb álló, 87-es variánshoz képest: C48A és G61C. Az SE23 további housekeeping génjeinek adatai: *gapA* 4, *infB* 31, *mdh* 13, *pgi* 1, *phoE* 1, *rpoB* 1. Az új *tonB* allél nukleinsav szekvenciája és az ST2567 szekvenciája a *K. pneumoniae* adatbázisba feltöltésre került. Amennyiben a *tonB* allélban lévő mutáció nem lenne jelen, úgy a vizsgált törzs a 87-es *tonB* allél alapján ST2387 lett volna.

#### 4.4 *Morganella morganii qnrD* determináns szerepe fluorokinolon rezisztenciában

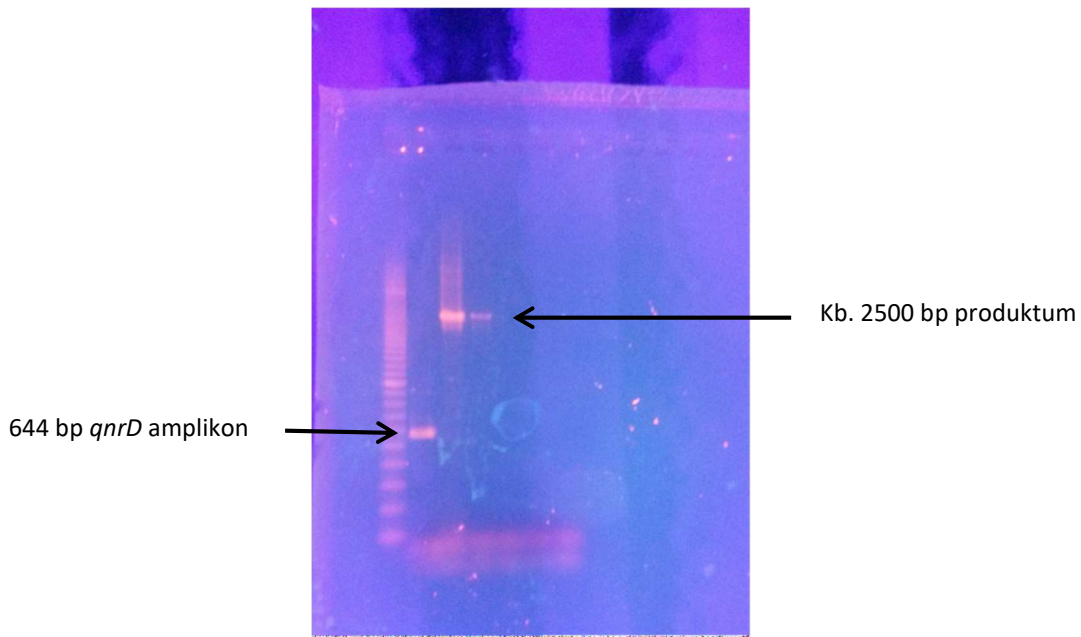
Az SE10MM nevezetű *M. morganii* törzs került vizsgálatra a továbbiakban. A törzs célzott PCR vizsgálattal *qnrD* pozitivitást mutatott, egyéb PMQR-t nem hordozott. Nalidixsavra, norfloxacinra, ofloxacinra és ciprofloxacinra rezisztensnek bizonyult, míg a tesztelt cefalosporinokra és meropenemre is érzékeny volt. Low-level rezisztens fenotípust mutatott imipenemre, illetve szintén rezisztensnek bizonyult tobramycinnel és amikacinnal szemben. A törzs a *gyrB* és *parC* génekben 1-1 aminosav cserét hordozott.

(Táblázat 13)

Táblázat 13.: Az SE10MM főbb tulajdonságai. (MIC értékek mg/L-ben megadva)

	<i>M. morganii</i> 10 (SE10MM)
ciprofloxacin MIC	2
nalidixsav MIC	128
norfloxacin MIC	2
cefotaxim MIC	0,06
ceftazidim MIC	0,06
ceftriaxon MIC	0,06
meropenem MIC	0,06
imipenem MIC	4
amikacin MIC	32
tobramycin MIC	64
<i>qnr</i> pozitívitas	<i>qnrD</i>
<i>gyrB</i>	S463A
<i>parC</i>	S80I
<i>aac-(6')-Ib-cr</i>	negatív

Az SE10MM *qnrD* plazmidja szekvenálásra került. A 2662 bázispár hosszúságú plazmidból, vagyis a pSE10MM-ből, a kivitelezett inverz PCR technikával egy 2500 bázispáros produktumot tudunk nyerni a szekvenáláshoz. (Ábra 18)

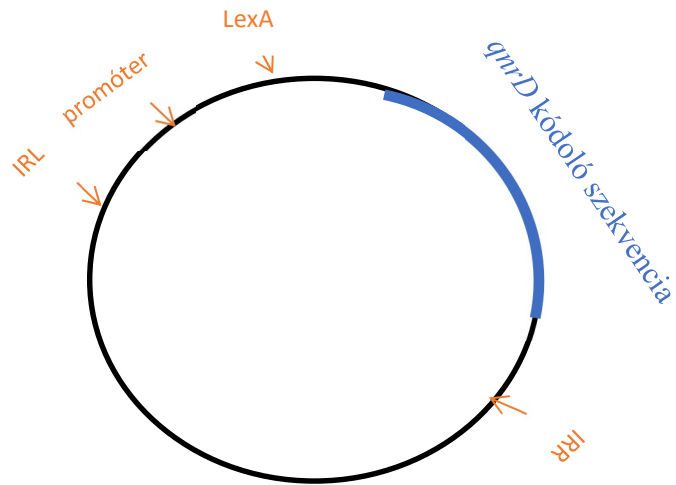


**Ábra 18.:** A *qnrD* vizsgálatok során nyert gél elektroforézis eredménye, melyen a kb. 2500 bp-os plazmid és a *qnrD* amplikon látható

A vizsgálathoz új primer párokat terveztünk, hogy az 500-1000 bázispáros fragmenteket, a köztes régiókkal együtt amplifikálni tudjuk. A kapott plazmid DNS fragmentumok összeszerkesztése a BLAST (basic local alignment search tool) segítségével történt. A pSE10MM szekvenciája a KU160530-as azonosítószám alatt került feltöltésre a Genbank-ba. A plazmid 94-99%-os azonosságot mutat egyéb *qnrD* plazmidokkal. Egy open reading frame-et azonosítottunk a plazmidon, ami *qnrD* gént kódolt, és mobile insertion cassette-ekkel volt körbevéve, nevezetesen:

- Invert repeat left (IRL): AAACAAGTTTGTGACTTTCAGCG
- Invert repeat right (IRR): CGCCGCAAGGCGTGAAGTT

A *qnrDI* kódoló gén egy 644 bázispár hosszú régió, mely egy 214 aminosavból álló fehérjét kódol. A promotor régióban egy LexA kötőhely található, mely az SOS response rendszer regulátor fehérjéje. Az ezektől externálisan, az IRL és IRR régiótól up- és downstream elhelyezkedő szekvencia nem mutatott szignifikáns kapcsolatot egyetlen korábban ismert *qnrD* plazmiddal sem a Genbank-i adatokkal összevetve. Más kódoló régió vagy open reading frame nem került azonosításra. (Ábra 19 és 20)



Ábra 19.: Az SE10MM sematikus szerkezete – a plazmidon detektáltuk a *qnrD* kódoló szekvenciát, valamint a LexA kötőhelyet, a promóter régiót és az IRR és IRL szekvenciákat

promóter régió

895 ttttatagggtgaacgtgccttaaaatcgtttgaggggcttaatgggggtaacgggcggttt

961 cgctaactaactcgcccgttaacataaaagggtgatgaatcaatttagctagagt

lexA kötőhely

1021 ttaaggtgttcaaattaatgtacaatgattgcactgtataaataaccaggttagcatg

*qnrD1* kódoló szekvencia

1081 tatggaaaaagcactttatcaatgaaaagt.....

Ábra 20.: A pSE10MM kiemelt szekvenciái – nukleinsav szintű elemzés, valamint az előbb látott szekvenciák nukleinsav szintű képe

A *qnrD1* plazmidok szekvencia alapú elemzése alapján a plazmidokat alapvetően 2 csoportba tudtuk besorolni. Ámbár 1 plazmid, a pM60, egyik csoportba sem illett bele, tekintve, hogy ez esetben a *qnrD* fordított kódolási irányban látható.

Azon plazmidok, melyek több mint 62%-os szekvencia azonosságot mutattak, közös klaszterbe kerültek besorolásra. A pSE10MM a „B” klaszterbe tartozott, 72-100%-os hasonlósággal a csoport többi tagjához. Ezen nagyobb csoportban mind humán, mind állati plazmidok megtalálhatók, változó nagyságban, döntő többségben *Proteus* spp.-ben hordozva a plazmidot.

Ezzel ellentétben az „A” klaszter diverzebbnek mutatkozott baktériumtörzseket tekintve, illetve csak nagyobb méretű, tehát 4,2 kbp nagyság feletti plazmidokat tartalmazott.

(Ábra 21)



**Ábra 21.:** A *qnrDI* plazmidok filogenetikai besorolása – A baktériumtörzseket tekintve diverzebb, nagyobb méretű plazmidokat tartalmazó „A” klaszter, illetve a döntően *Proteus spp.*-ben látott plazmidok „B” klasztere. A pM60 nem került besorolásra, tekintve a fordítottan látható nukleotid szekvenciára

A pSE10MM *E. coli* J53 recipiensbe nem volt transzferálható, annak ellenére, hogy többször, különböző arányú (1:2, 1:4, 1:10) donor:recipiens rátát alkalmaztunk.

A külön rezisztencia determináns régiókban (QRDRs) különböző aminosav szubsztitúciót észleltünk. Minden mutációt a Genbank-ba töltöttünk fel. (Táblázat 14)

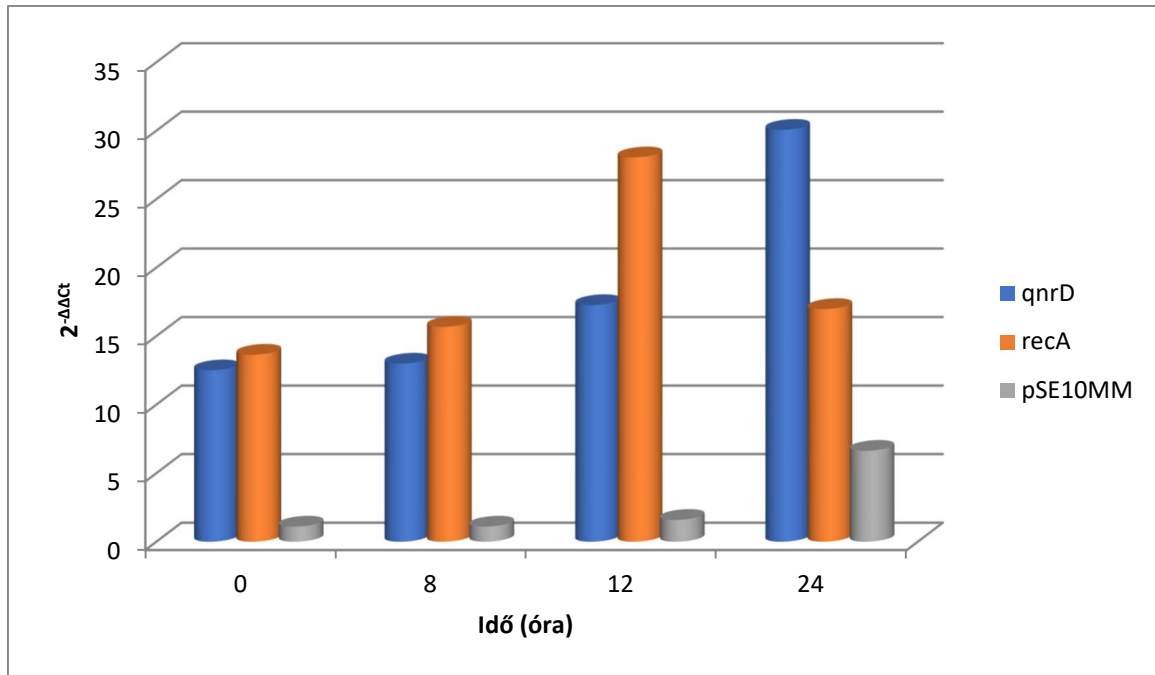


Táblázat 14.: Aminosav szubsztitúciók a QRDR-okban, illetve Genbanki elérésük

QRDR	Mutáció	Genbank elérés
GyrA	S83I	MH986719
GyrB	S463A	MH986720
ParC	S80I	MH986721

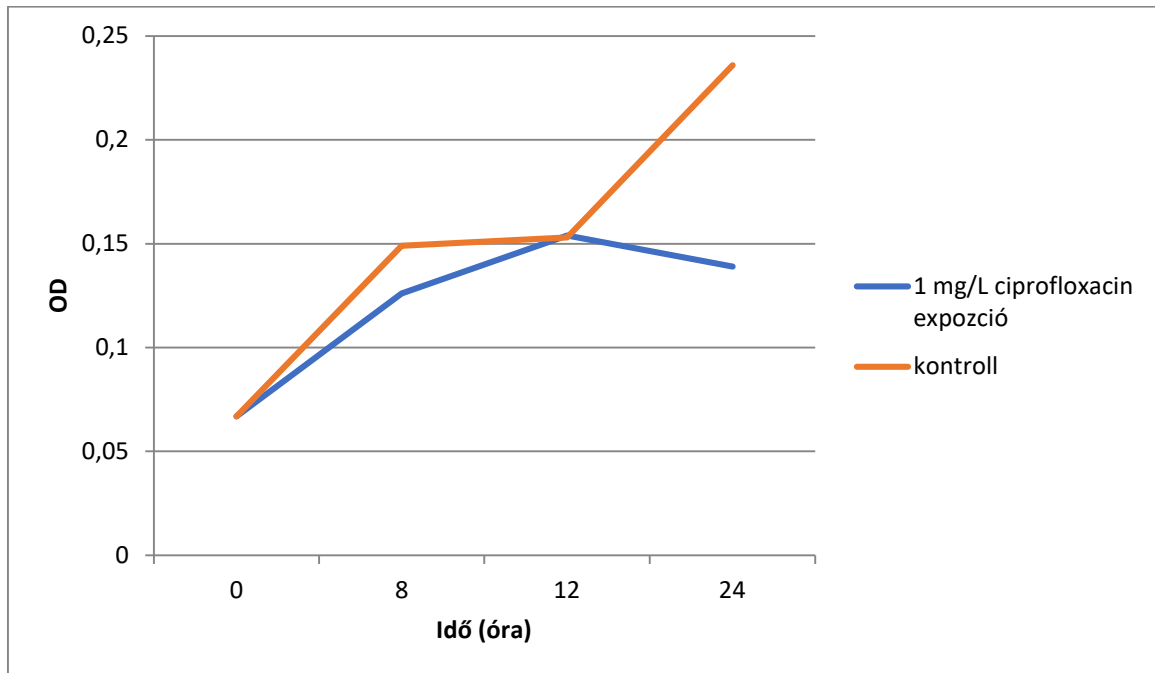
Ezen aminosav szubsztitúciók jelen voltak az eredeti *M. morganii* törzsben, az alkalmazott antibiotikumos inkubálás előtt, 24 óra elteltével 1 mg/L-es ciprofloxacin koncentráció mellett nem jelent meg újabb mutáció.

A vizsgálat során a *qnrD* gén expresszióját is vizsgáltuk, illetve a pSE10MM plazmid sokszorozódását 1mg/L koncentrációjú ciprofloxacin expozícióban. A vizsgálat kezdetén, a kezeletlen törzsben a *qnrD* expressziós szintje, az *rpoB* housekeeping gén expressziós szintjére normalizálva, 12,5-nek bizonyult, mely a folyamatos ciprofloxacin expozíció következtében fokozatos emelkedést mutatott. 24 óra elteltével ugyanezen érték 30,06 volt. Mindeközben a *qnrD* plazmidok száma is emelkedett 1,1-ről 6,63-ra. A *recA* expressziója ugyanezen körülmények között jól korrelált a *qnrD* értékekkel. (Ábra 22) A *recA* és *qnrD* értékekre t próbát végezve a t értéke 0,76, a p értéke 0,22 volt, mely szerint a két érték változása között szignifikáns eltérés nincs.



Ábra 22.: A *qnrD*, a *recA* és a pSE10MM *rpoB*-re normalizált expressziós rátája 1 mg/L-es ciprofloxacin koncentrációjú szuszpenzióban, adott időpontokban (óra) – A *recA* és a *qnrD* expressziója jól korrelál egymással

Ezzel szemben, összességében az SE10MM növekedési rátája az alkalmazott 1mg/L-es ciprofloxacin expresszióban csökkenő tendenciát mutatott. (Ábra 23)



Ábra 23.: Az SE10MM növekedési rátája ciprofloxacin expozícióban, illetve anélkül – összességében a ciprofloxacin expozícióban az SE10MM növekedési rátája csökkent 12 óra elteltével

## 5. Megbeszélés

### 5.1 PMQR detektálás

Vizsgálataink során a 214 Enterobacterales törzs közül 38 hordozott valamilyen PMQR gént. Ezek közül 9 törzs alacsony szintű fluorokinolon rezisztenciájú volt, 13 vad típusú fenotípust hordozott, illetve 3 esetben a MIC értéke 0,125 mg/L-nek bizonyult.

Az előbb felsorolt 25 törzs az aktuális EUCAST irányelveknek megfelelően érzékenynek volt tekintendő ciprofloxaccinnal szemben. A 2016-os előírásoknak megfelelően adott Enterobacterales törzset akkor tekintettek fluorokinolonra érzékenynek, amennyiben MIC értéke 0,5 mg/L alatt volt, 1 mg/L feletti MIC érték esetén pedig rezisztensnek kellett tekinteni. A kettő közötti tartomány az úgy nevezett alacsony szintű fluorokinolon rezisztenciát jelenti. A vad típusú fluorokinolon fenotípus 0,06 mg/L-es MIC érték alatt értelmezendő. 2017 január elsejétől azonban a határértékeket revideálták, ezen értékek jelenleg is érvényben vannak. Aktuálisan érzékenynek tekintünk egy Enterobacterales törzset ciprofloxaccinnal szemben 0,25 mg/L-es MIC érték alatt, a rezisztencia határát pedig 0,5 mg/L-ben állapították meg. Ezen változtatás eredményeinkkel jól korrelál, minthogy a 0,5 mg/L-es MIC értéket mutató törzsek könnyedén kiszelektálódhatnak és rezisztenssé válhatnak az antibiotikummal szemben. Utóbbi a PMQR-ok esetleges jelenlétének is lehet az eredménye, terápiás kihíváshoz vezetve.

Ugyanakkor megjegyzendő, hogy számos vad-típusú fenotípusú törzs hordozott valamilyen PMQR gént. Ezen esetekben lehetséges, hogy a determinánsok génjei nem expresszálódnak, így nem okoznak rezisztenciát.

Eredményeink alapján elmondható, hogy a ciprofloxacin MIC érték meghatározása önmagában nem elegendő a rezisztencia megállapítására. Pontosabb felmérésre a PMQR gének, leginkább a *qnr*-ok, detektálása szolgálhatna, molekuláris biológiai vizsgálatokat alkalmazva. Mindezek tükrében megfontolandó lehet az alacsony rezisztenciát mutató törzsek esetén rutinszerűen PMQR detektálást elvégezni, az esetleges kiszelektálódásra hajlamos törzsek kizárása céljából.

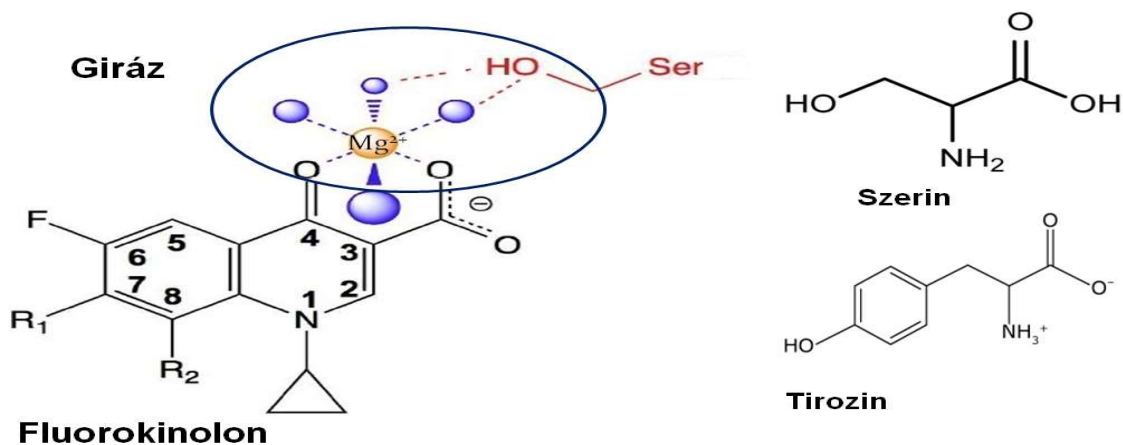
Kutatásunk során a PMQR pozitív törzsek prevalenciája 17,7%-nak bizonyult a 214 húgyúti mintából származó Enterobacterales törzs esetében. Emellett Magyarországon elsőként detektáltuk a *qnrD* rezisztencia determinánst. Korábbi magyar vizsgálatokban ESBL (extended-spectrum beta-lactamase) termelő *E. coli* és *Klebsiella spp.* törzsekben

*qnrA*, *qnrB*, *qnrS* és *aac(6')-Ib-cr*-t detektáltak.<sup>(108, 122)</sup> Vizsgálatunkban a húgyúti mintákból származó Enterobacterales törzsekben az ESBL és a PMQR jelenlétének korrelációját nem elemeztük részletesen, azonban az adatok alapján nem valószínűsíthető, hogy szoros kapcsolat lenne, tekintettel arra, hogy a 38 PMQR pozitív törzsből összesen 3 mutatott rezisztenciát harmadik generációs cefalosporinnal szemben.

A *qnrD* gént két *M. morganii* esetén detektáltuk, mely összesen 1%-os prevalenciát jelent az Enterobacterales törzsek között, azonban a törzskollekcióhoz tartozó *M. morganii* törzsek között 40%-os prevalenciát mutatott. Az eredmény jól korrelál a nemzetközi adatokkal is, mely szerint a *qnrD* determináns a Morganellaceae család tagjai közt, így *Morganella spp.*-ben is gyakrabban detektálható.<sup>(46,50,51)</sup> A vizsgálatok alapján azt is láttuk, hogy a húgyúti infekciót okozó, *qnr*-pozitív *E. coli* törzsek közt a P fimbria jelenléte gyakori.

## 5.2 *K. pneumoniae oqxAB* efflux pumpa vizsgálatok

Vizsgálatunk rávilágított az OqxAB efflux pumpa fontos szerepére a fluorokinolon rezisztencia kialakulásában. Az SE23 és az SE191 jelölésű *K. pneumoniae* törzsek különböző ST típusokba tartoztak MLST vizsgálat alapján: ST2567 és ST274. Bár mindkét törzs hordozta az *oqxAB* gént, mégis másképp adaptálódtak az emelkedő ciprofloxacinnal szembeni rezisztenciához. A két törzs ciprofloxacinnal szembeni MIC értékében is eltérés volt látható: 0,06 illetve 0,5 mg/L volt, melyek a 2016-os EUCAST irányelvek szerint érzékenyek voltak ciprofloxacinnal szemben. Az emelkedő koncentrációban alkalmazott ciprofloxacinnal szemben az ST274 esetén rezisztens törzs szelektálódott ki. A törzs a kiinduláskor is hordozott egy mutációt a *gyrA* génben, mely egy Ser83Tyr aminosav cseréhez vezet, a vizsgálat végére azonban új mutáció nem jelentkezett. A szerin-tirozin aminosav csere jelentősége a ciprofloxacinnal szembeni affinitásának csökkenése a giráz enzimhez. A fluorokinolonok egy magnézium ionon keresztül kapcsolódnak a giráz enzim szerin aminosavának hidroxil csoportjához. Amennyiben a szerin egy pontmutáció következtében tirozinra cserélődik, úgy a fluorokinolonnak a giráz enzim szerinjének hidroxil csoportja helyett a tirozin fenol csoportjához kellene kapcsolódnia. A fenol csoport azonban reakcióba nehezebben vonható, mint a hidroxil csoport, ezáltal a fluorokinolon kötődése az enzimhez akadályozott. (Ábra 24)<sup>(123)</sup>



**Ábra 24.:** A fluorokinolonok kapcsolódása a giráz enzimhez, illetve a szerin és tirozin aminosavak szerkezete – a fenol csoporthoz való csatlakozás csökkenti a fluorokinolonok affinitását<sup>(123)</sup>

Az emelkedő ciprofloxacin koncentrációban az *oqxB* gén upregulációját észleltük, a 0,5 mg/L-es szinthez képest, a 8 mg/L-es koncentráció mellett 22,8-szoros emelkedést láttunk. Az upreguláció és a rezisztens törzs szelekciója klonális szelekciót mutathat, hiszen az SE23 esetén egyik sem volt kimutatható. Az SE191 esetén az efflux pumpa upregulációja a törzs fitnesséhez járulhat hozzá, minthogy ez a törzs az ST274-hez tartozik, amely klónt szélesebb körben izolálták kórokozóként mind újszülött, mind pedig felnőtt kórházi osztályokon.<sup>(124)</sup>

Ahogy az előzőekben is, ez esetben is korrelálnak eredményeink az EUCAST irányelvek változásával. Az SE191 0,5 mg/L-es ciprofloxacin MIC értéke a vizsgálatkor még érzékenynek minősült, a törzs azonban sikeresen túlélte az emelkedő antibiotikum koncentrációban. Míg a 0,06mg/L-es MIC értéket mutató SE23, bár hordozta az *oqxAB* géneket, mégsem történt rezisztens törzs kisselektálódása. A jelenlegi EUCAST határértékek alapján 0,5 mg/L ciprofloxacin MIC értékkel az SE191-es törzs már nem érzékeny fenotípusúnak minősül.

A vizsgálatban egy új *K. pneumoniae* szekvencia típust sikerült azonosítanunk, nevezetesen az SE23 esetén az ST2567-et. Az új ST típust egy mutáció okozta a *tonB* allélban, mely mutáció hiányában az ST2387-es ST típust detektálhattuk volna. Az új ST típust a *K. pneumoniae* MLST adatbázisba feltöltöttük.<sup>(125)</sup>

Az ST2567 esetén a *tonB* allél a 371-es sorszámúként fellelhető az MLST adatbázisban. A *tonB* szekvenciák 390-432 bázispár közötti nagyságúak, a 371-es 420 bázispáros. A 371-eshez legközelebbi szekvenciák 2016-ban az alábbiak voltak: 17, 19, 21. Ezekkel 97-98%-os nukleotid szekvencia azonosságot láthatunk. Aminosav szekvenciában szintén 97%-os azonosság fedezhető fel. 2020-ban ismét megfigyelve, számos egyéb allélvariáns került feljegyzésre, melyek közül szintén számos 420 bázispár hosszú, sok esetben 99%-os egyezést mutatva a 371-es alléllal. Az alábbi ábrákon a 17-es, illetve egy 420 bázispáros 99%-os egyezést mutató (654), illetve egy szintén 420 bázispáros, csupán 88%-os hasonlóságot mutató (613) *tonB* allélok nukleotid- és az ez alapján szintetizálódó aminosav szekvenciák összehasonlítása látható: (Ábra 25-28)

371 1 ATGGTGGCGCCGGCCGATCTTGAGCCGCCTCCGGCGGCGCAGCCTGTAGTGGAGCCCGTT 60  
17 1 ATGGTGGCGCCGGCCGATCTTGAGCCGCCTCCGGCGGCGCAGCCTGT<sup>C</sup>GTGGAGCCCGTT 60  
654 1 ATGGTGGCGCCGGCCGATCTTGAGCCGCCTCCGGCGGCGCAGCCTGT<sup>C</sup>GTGGAGCCCGTT 60

371 61 CTTGAACCCGAACCCGAACCTGAGCCGGAGCCAGAGGTAGTGCCTGAACCGCCGAAAGAG 120  
17 61 <sup>G</sup>TT-----GAACCCGAACCTGAGCCGGAGCCAGAGGTAG<sup>C</sup>GCCTGAACCGCCGAAAGAG 114  
654 61 <sup>G</sup>TTGAACCCGAACCCGAACCTGAGCCGGAGCCAGAGGTAGTGCCTGAACCGCCGAAAGAG 120

371 121 GCGCCGGTGGTGATCCATAAACCGGAACCTAAGCCGAAGCCCAAACCTAAACCCAAGCCT 180  
17 115 GCGCCGGTGGTGATCCATAAACCGGAACCTAAGCCGAAGCCCAAACCTAAACCCAAGCCT 174  
654 121 GCGCCGGTGGTGATCCATAAACCGGAACCTAAGCCGAAGCCCAAACCTAAACCCAAGCCT 180

371 181 AAGCCGGAGAAAAAGGTTGAACAGCCGAAGCGGGAAGTGAAGCCGGCAGCAGAGCCGCGT 240  
17 175 AAGCCGGAGAAAAAGGTTGAACAGCCGAAGCGGGAAGTGAAGCCGGCAG<sup>C</sup>TGAGCCGCGT 234  
654 181 AAGCCGGAGAAAAAGGTTGAACAGCCGAAGCGGGAAGTGAAGCCGGCAG<sup>C</sup>TGAGCCGCGT 240

371 241 CCGGCCTCGCCGTTTAAAAACAACAATACGGCGCCGGCGCGTACAGCGCCAAGCACCTCG 300  
17 235 CCGGCCTCGCCGTTTAAAAACAACAATACGGCGCCGGCGCGTACAGCGCCAAGCACCTCG 294  
654 241 CCGGCCT<sup>T</sup>GCCGTTTAAAAACAACAATACGGCGCCGGCGCGTACAGCGCCAAG<sup>T</sup>ACCTCG 300

371 301 ACCGCAGCGGCTAAACCCACCGTTACTGCTCCAAGCGGCCCGGGCGATCAGCCGCGTT 360  
17 295 ACCGCAGCGGCTAAACCCACCGTTACTGCTCC<sup>G</sup>AGCGGCCCGGGCGATCAGCCGCGTT 354  
654 301 ACCGCAGCGGCTAAACCCACCGTTACTGCTCC<sup>G</sup>AGCGGCCCGGGCGATCAGCCGCGTT 360

371 361 CAGCCGTCTATCCGGCGCGGCTCAGGCGCTGCGCATTGAAGGGACGGTACGGGTGAAG 420  
17 355 CAGCCGTCTATCC<sup>A</sup>GC GCGGCTCAGGCGCTGCGCAT<sup>A</sup>GAAGGGACGGTACGGGTGAAG 414  
654 361 CAGCCGTCTATCCGGCGCGGCTCAGGCGCTGCGCATTGAAGGGACGGTACGGGTGAAG 420

Ábra 25.: A 371-es *tonB* allél nukleotid szekvenciáinak összehasonlítása a 17-es, illetve a 654-es *tonB* allélével. A mutációk pirossal kiemelve.



371 1 ATGGTGGCGCCGGCCGATCTTGAGCCGCCTCCGGCGGCAGCCTGTAGTGGAGCCCGTT 60  
613 1 ATGGTGGCGCCGGCCGATCTTGAGCCGCC**CCGGCGGCACAACCGT**CGTG**C**AGCCCGTT 60  
371 61 CTTGAACCCGAACCCGAACCTGAGCCGGAGCCAGAGGTAGTGCCTGAACCGCCGAAAGAG 120  
613 61 **G**TTGAA-----A—CCGAACC**A**GAGCCGGA**A**CTGAGGT**G**GT**C**CTG**A**GACGCCGAAAGAG 114  
371 121 GCGCCGGTGGTGTATCCATAAACCGGAACCTAAGCCGAAGCCCAAACCTAAA-----CCC 174  
613 115 GCGCCGGTGGTGTATCCATAAACCG**A**AACCTAAGCCGAAGCCCAAACCTAAA**CCGAAG** CCC 174  
371 175 AAGCCTAAGCCGGAGAAAAAGGTTGAACAGCCGAAGCGGGAAGTGAAGCCGGCAGCAGAG 234  
613 175 AAGCC**C**AAGCCGGAGAAAAAGGTTG**A**GAGCCT**A**AGCGGG**A**CGT**C**AAGCCGGCAGC**G**GAG 234  
371 235 CCGCGTCCGGCCTCGCCGTTTAAAAACAACAATACGGCGCCGGCGGTACAGCGCCAAGC 294  
613 235 CCGCGTCCGGC**T**T**C**ACCGTTTAAAAACAACAATAC**A**CGCC**A**GCGCG**C**ACCGCGCC**G**AGC 294  
371 295 ACCTCGACCGCAGCGGCTAAACCCACCGTACTGCTCCAAGCGGCCCGGGCGATCAGC 354  
613 295 ACCT**C**ACCGCAGCG**C**CAAACCCACCGT**C**ACTG**C**CC**G**AGTGGCCCGGG**C**ATCAGC 354  
371 355 CGCGTTCAGCCGTCCTATCCGGCGCGCGCTCAGGCGCTGCGCATTGAAGGGACGGTACGG 414  
613 355 **C**GT**G**T**C**AGCC**A**CTATCC**A**CGCGCGCTCAGGCGCTGCGCATTGAAGGGACGGT**G**CGG 414  
371 415 GTGAAG 420  
613 415 GTGAAG 420

Ábra 26.: A 371-es *tonB* allél nukleotid szekvenciáinak összehasonlítása a 613-as *tonB* allélal. A mutációk pirossal kiemelve.

371 1 MVAPADLEPPPAQPVVEPVLEPEPEPEPEPEVPEPPKEAPVVIHKPEPKPKPKPKPKP 60  
17 1 MVAPADLEPPPAQPVVEPV**V**PEPEPEPEPE---**V**APEPPKEAPVVIHKPEPKPKPKPKPKP 58  
654 1 MVAPADLEPPPAQPVVEPV**V**PEPEPEPEPEPEVPEPPKEAPVVIHKPEPKPKPKPKPKP 60  
371 61 KPEKKVEQPKREVKPAAEPRPASPFENNTAPARTAPSTSTAAAKPTVTAPSGPRAISRV 120  
17 59 KPEKKVEQPKREVKPAAEPRPASPFENNTAPARTAPSTSTAAAKPTVTAPSGPRAISRV 118  
654 61 KPEKKVEQPKREVKPAAEPR**P**AL**P**FENNTAPARTAPSTSTAAAKPTVTAPSGPRAISRV 120  
371 121 QPSYPARAQALRIEGTVRVK 140  
17 119 QPSYPARAQALRIEGTVRVK 138  
654 121 QPSYPARAQALRIEGTVRVK 140

Ábra 27.: A 371-es *tonB* allél aminosav szekvenciájának összehasonlítása a 17-es és a 654-es *tonB* allél aminosav szekvenciáival. A mutációk pirossal kiemelve.

371 1 MVAPADLEPPPAQPVVEPVLEPEPEPEPEPEVPEPPKEAPVVIHKPEPKPKPK----PKP 58  
 613 1 MVAPADLEPPPAQPVVQPVVETETEPEPEPEVW---PETPKEAPVVIHKPEPKPKPKPKPKPKP 58  
 371 59 KPKPEKKVEQPKREVKPAAEPRPASPFFENNNTAPARTAPSTSTAAAKPTVTAPSGPRAIS 118  
 613 59 KPKPEKKVEQPKRDVKPAAEPRPASPFFENNNTTPARTAPSTSTAAAKPTVTAPSGPRAIS 118  
 371 119 RVQPSYPARAQUALRIEGTVRVK 140  
 613 119 RVQPTYPTRAQUALRIEGTVRVK 140

**Ábra 28.:** A 371-es *tonB* allél aminosav szekvenciájának összehasonlítása a 613-as *tonB* allél aminosav szekvenciáival. A mutációk pirossal kiemelve.

A fent részletezett 3 *tonB* variánst emeltük ki, az áttekintett 63-ból. Összességében elmondható, hogy nukleotid szekvencia szintjén a 371-es *tonB* variánshoz képest 88-99%-os hasonlóságokat észleltünk, míg aminosav szekvencia szintjén 91% alatti azonosság nem fordult elő, illetve a nukleotid szekvenciában történt mutáció nem feltétlenül járt aminosav cserével. Mutációkat jellemzően az aminosav kód első harmadában lehet észlelni, emellett a szekvencia első és utolsó néhány aminosava sem mutatott mutációkat az áttekintett 63 variáns esetében.

Korábban végzett vizsgálatok során *OqxAB* efflux pumpát mutattak ki ESBL termelő és fluorokinolon rezisztens magas rizikójú *K. pneumoniae* klónokból.<sup>(126-128)</sup> Magyarországon *oqxAB*-t hordozó *K. pneumoniae*-t korábban véráram-fertőzésből izoláltak.<sup>(129)</sup> Mindezen esetekben a vizsgált törzsek flourokinolonra rezisztensek voltak. Az általunk végzett vizsgálatok rávilágítottak az *oqxAB* efflux pumpa szerepére a rezisztens *K. pneumoniae* klónok kisselektálódásában. Mindkét törzs érzékeny fenotípust mutatott fluorokinolonokra, ciprofloxacín expozíció következtében azonban a *gyrA* mutációt tartalmazó törzs képes volt kisselektálódni. Tekintve, hogy egyéb mutáció nem történt, illetve a túlélő törzsben az *oqxAB* génnek emelkedett expresszióját láttuk, így elmondhatjuk, hogy a szelektálódást önmagában az *oqxAB* génnek expresszáásával volt képes a baktérium végbevenni. A törzseket összességében maximálisan 8 mg/L-es ciprofloxacín koncentrációnak tettük ki, ugyanis humán szövetekben ennél magasabb koncentráció nem érhető el egy per os ciprofloxacín terápia esetén. Ezáltal a vizsgálat egy per os fluorokinolon terápia modellezésének megfelelő lehet.

### 5.3 *qnrD* vizsgálatok

Összesen 30 komplett *qnrD* plazmid szekvencia volt elérhető a Genbank-ban, melyekből 29 *qnrD1* plazmid volt. Ezen plazmid szekvenciákat hasonlítottuk a pSE10MM szekvenciájához. A legtöbb plazmidot *Proteus spp.*-ből izolálták, néhányat egyéb Enterobacterales törzsben igazoltak, úgy mint: *E. coli*, *M. morganii*, *P. rettgeri*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, vagy *Salmonella enterica serovar Bovismorbificans*. A humán eredetű törzsek javarészt húgyúti fertőzésből származó mintákból kerültek izolálásra, míg az állati eredetű törzseket egészséges egyedekben detektálták. A plazmidok nagysága 2,6-5,9 kilobázispár között volt. A plazmid nagysága és a baktériumhordozó között nem látszott összefüggés. (Táblázat 15)

Táblázat 15.: A *qnrD1* plazmidok megoszlása baktérium törzs és minta eredete alapján

<i>qnrD1</i> plazmid	Baktériumtörzs	Minta eredete	plazmid mérete (kbp)	Genbank elérés
pRS12-189	<i>P. mirabilis</i>	humán	2,656	KF364956
pLRB12-304	<i>P. mirabilis</i>	humán	2,658	KF364957
pRS12-11	<i>P. mirabilis</i>	humán	2,683	KF364953
pRS12-104	<i>P. mirabilis</i>	humán	2,683	KF364955
pEAD1-2	<i>P. mirabilis</i>	humán vizelet	2,669	KF498971
pCGP180	<i>P. mirabilis</i>	humán	4,270	JX982605
pCGH40	<i>P. mirabilis</i>	humán	4,270	JX982606
pCGS49	<i>P. mirabilis</i>	állati	2,683	JQ776507
pCGH15	<i>P. mirabilis</i>	állati	2,683	JQ776508
p1042	<i>P. mirabilis</i>	csirke	2,682	KP330456
pPmZXF	<i>P. mirabilis</i>	csirke	2,683	KP313759
pCGP248	<i>P. mirabilis</i>	kutya széklet	2,683	JQ776503
pM150	<i>P. mirabilis</i>	házipoly	2,683	KJ190020
p3M-2B	<i>Proteus spp.</i>	garnélarák	5,903	JX514066
pRS12-78	<i>P. vulgaris</i>	humán vizelet	4,286	KF634954
pMB18	<i>P. vulgaris</i>	műtési seb	2,683	KF498970

<b>pCGS13</b>	<i>E. coli</i>	állati	2,687	JQ776506
<b>pCGP246</b>	<i>E. coli</i>	állati	4,270	JQ776501
<b>pCGP169</b>	<i>E. coli</i>	állati	4,270	JQ776502
<b>pCGB40</b>	<i>E. coli</i>	galamb széklet	4,269	JQ776504
<b>pM60</b>	<i>M. morganii</i>	humán	4,683	KF813021
<b>pCGH69</b>	<i>M. morganii</i>	humán vizelet	2,683	JQ776510
<b>pSE10MM</b>	<i>M. morganii</i>	humán vizelet	2,662	KU160530
<b>pDIJ09-518a</b>	<i>P. rettgeri</i>	humán széklet	2,683	HQ834472
<b>pGHS09-090a</b>	<i>P. rettgeri</i>	humán vizelet	2,683	HQ384473
<b>pCGF41</b>	<i>C. freundii</i>	sertés	4,268	JQ776505
<b>pCGH25</b>	<i>K. pneumoniae</i>	humán	4,270	JQ776509
<b>p2007057</b>	<i>S. enterica</i> serovar <i>Bovismorbificans</i>	humán	4,270	FJ228229

A *qnrD1* plazmidokon elvégzett nukleotid szekvencia alapú filogenetikai analízis alapján ezen plazmidok két nagyobb klaszterbe sorolhatók be, különböző specioseket és plazmid méretet tartalmazva. A „B” klaszterbe tartozó, kb. 2,6 kbp nagyságú plazmidok, az SE10MM-el együtt, egy stabil genetikai strukturát mutatnak, mely alapjául a promoter, az IRL és az IRR szekvenciák szolgálnak. Ez a struktúra mindkét klaszter képviselői által gyakorta található meg, bár a plazmidok mérete mindemellett akár a duplája is lehet az „A” klaszter egyes tagjai esetén. A méretbeli növekedés mellett ugyanakkor nem azonosítható ismert funkcionális változás, pusztán feltételezett fehérjéket sejtethünk a *qnrD1* környezetében.

Az „A” klaszterben ezen nagyobb plazmidok többsége található, illetve ezen csoportban egymáshoz közeli rokonságban lévő Enterobacterales képviselőit látjuk: *E. coli*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, vagy épp *S. enterica*. A méret alapú osztályozás alapján feltételezhető, hogy a kisebb plazmidok mintegy *qnrD* plazmid prototípusként szolgálhattak, illetve hogy a genetikai bővülés később következhetett be, a rekombinációval, illetve az új *qnrD* variánsok kiszelektálásával.

A két klaszteren kívül megjegyzendő, hogy a pM60 plazmidban, mely szintén *M. morganii*-ban került detektálásra, a *qnrDI* szekvenciája fordított irányban található meg, mely miatt klaszterbe sorolása nem volt elvégezhető.

Gazdaspecifikusságot tekintve a humán és az állati eredetű minták a klaszterek közt közel azonos eloszlásban láthatók, mely egy közös plazmid eredetre enged következtetni, illetve a különböző gazdák közti átadásra. Az emberi fogyasztásra felhasznált állatokon, illetve háziállatokon kívül a házilégymelendő ki, mely felveti a rovar, mint vektor szerepét a plazmid terjesztésében.

Mindezek ellenére a pSE10MM *E. coli* J53-ba nem volt transzferálható, különböző kondíciók mellett sem a konjugációs kísérletekben. Általában a *qnrD* plazmidokat a Morganellaceae család tagjai, illetve a *Salmonella spp.*-ek hordozzák, a plazmid mégis megtalálható egyéb baktérium törzsekben is, pl. *E. coli*-ban. Egy lehetséges magyarázat a *qnrD* mobilizálására az egyéb baktérium törzsek felé az invert repeat szekvenciák jelenléte, melyek a *qnrDI* gént mobilissá képesek tenni. Ezt alapul véve, az olyan törzsekbe, mint az *E. coli*, *C. freundii* vagy a *K. pneumoniae* a jól ismert változatos rezisztencia plazmidoknak lehetőséget adhatnak az invert repeat szekvenciák az esetleges interplazmidikus rekombinációra. Utóbbi új, konjugált *qnrD* plazmidok megjelenését eredményezheti.

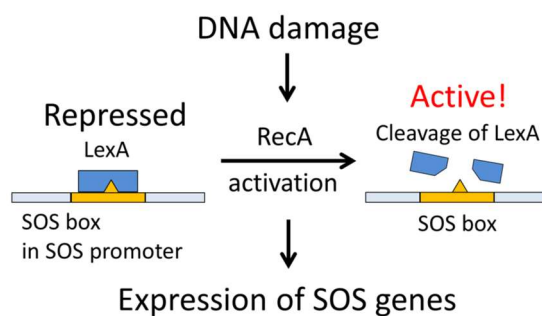
A *qnrD* upregulációja sub-MIC koncentrációjú ciprofloxacinnal szuszpenzióban azt jelenti, hogy ezen koncentráció elősegíti a gén expresszióját. Vizsgálatunk rámutat ennek kiemelkedő szerepére a rezisztens *M. morganii* törzsek kisselektálódásában, a kromoszómális giráz és topoizomeráz IV mutációk mellett.<sup>(130)</sup> Korábbi vizsgálatok alapján a PMQR-ok kiemelt jelentőséggel bírnak a csökkent fluorokinolon érzékenységben, illetve a rezisztens klónok kisselektálódásában.<sup>(131,34)</sup>

Vizsgáltuk továbbá a *qnrD* expresszió SOS response rendszer általi regulációját. A *qnrD* promóter szekvenciájában egy LexA kötőhelyet találtunk. Emellett a *recA* expresszióját is vizsgáltuk, mely az SOS response rendszer regulátor fehérjéje. A LexA kötőhely jelenléte, illetve a *recA* expressziójának és a *qnrD* expressziójának korrelálása arra utal, hogy a *qnrD* SOS response reguláció alatt áll. A sub-MIC koncentrációjú ciprofloxacinnal expozícióban a tesztelt törzs növekedési rátája csökkent 24 óra elteltével, így összességében az emelkedő *qnrD* expresszió protektív tényező lehet stresszreakció jelenlétében, még többszöri kromoszómális mutáció jelenléte mellett is.

Korábbi vizsgálatok a LexA szerepét vizsgálták az SOS response rendszer működésében, mely alapján a LexA egy központi regulátor fehérjének bizonyult DNS károsodás esetén, úgy, mint ciprofloxacín expozícióban. A *qnrB* és *qnrD* gének promóter szekvenciájában rendszerint található LexA kötőhely.<sup>(132-134)</sup>

Mindezek alapján a vizsgált *qnrD* determináns a baktérium túlélésében kiemelt szerepet játszik. Fontos továbbá megjegyezni, hogy a *qnrD* expressziója, illetve szerepe szorosan szabályozott rendszeren keresztül regulálódik, úgymint az SOS response rendszer. Mindezek elősegítik a fluorokinolon rezisztencia kialakulását, illetve a *qnr* determinánsok egyéb hatásait.

Munkánk során sikerült demonstrálni, hogy a *qnrD*-t hordozó *M. morgani* 1 mg/L ciprofloxacín expozíció során a törzs a *qnrD* gén expresszió változással (30-szoros emelkedés) alkalmazkodik, valamint a plazmid kópia szám (6-szoros) emelkedik. A *qnrD* géntől downstream, a promóter régióban egy LexA kötőhelyet azonosítottunk. A LexA az SOS response rendszer részét képezi és egy szupresszor fehérje funkciója van, mely a DNS-hez kötődve a promóter régió átíródását akadályozza. DNS károsodás hatására (pl: fluorokinolon hatás), a RecA aktiválódik, mely a LexA hasítását végzi, így adott promóter régió átírásra kerülhet.<sup>(135)</sup> (Ábra 29) Ezen mechanizmus alapján elmondhatjuk, hogy a *qnrD* az SOS response szabályozása alatt áll, mely vizsgáltunkban detektálásra került. Ugyanakkor eredményeink alapján az is megállapítható, hogy a ciprofloxacín expozíció során a a *qnrD*-plazmidot hordozó *M. morgani* a fluorokinolon rezisztencia kialakítása mellett tovább expresszálja a *qnrD* gént, amely arra enged következtetni, hogy a QnrD fehérjének további védő szerepe van a bakteriális giráz enzimen, illetve jelzi további előnyös hatását a bakteriális sejt túlélésében.



Ábra 29.: Az SOS response működése – DNS károsodás érzékelése esetén a RecA aktiváció hasítja a LexA-t, így az SOS promóter régió aktiválódik, SOS gének átírását eredményezve<sup>(136)</sup>

## 6. Következtetések

A PMQR determinánsok világszerte széleskörben megjelentek klinikai mintákból származó Enterobacterales izolátumokban.<sup>(68)</sup> A nemzetközi adatok alapján ugyanakkor az látható, hogy a PMQR gének jelenléte, nevezetesen a *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* és a *qepA* összfüggést mutat az ESBL termeléssel.<sup>(68,122)</sup>

Munkánk során 17,7% PMQR prevalenciát találtunk húgyúti mintákból származó Enterobacterales törzsekben. Figyelemre méltó, hogy PMQR-t hordozó törzsek mind a fluorokinolon érzékeny, mind a rezisztens tartományban megtalálhatóak. Azon baktériumokból, amelyek hordozzák a PMQR determinánsokat, de fluorokinolonokra érzékeny fenotípust mutatnak egy fluorokinolon terápia során kisselektálódhatnak rezisztens törzsként. Azonban a terápiás lehetőségek számának további csökkenése várható, hiszen a kisselektálódott törzsek körében a fluorokinolon rezisztencia mellett további antibiotikumokkal szemben is kialakíthatnak rezisztenciát (pl.: plazmidok felvételével, efflux pumpa aktiválással), és akár multidrog rezisztencia is kialakulhat.

A *K. pneumoniae* törzsek összesen 4972 szekvencia típusba (ST) sorolhatók az Insitut Pasteur által fenntartott adatbázis alapján. A munkánk során egy új ST variánst az ST2567-et azonosítottuk, amely egy új *tonB* alléllal (371-es) rendelkezett. Szükséges megjegyezni, hogy az irodalomban ismert multirezisztens *K. pneumoniae* klónok néhány ST típushoz tartoznak (ST11, ST14, ST15, ST37, ST101, ST147, ST258, ST307, ST336, ST340 és ST874) és ezekre jellemző, hogy az antibiotikum rezisztenciájukat kromoszómális mutációkkal és számos plazmid felvételével tudják kialakítani.<sup>(137,138)</sup> Tekintettel arra, hogy a kiterjedt antibiotikum használat jelentős szelektációs nyomással rendelkezik és *K. pneumoniae* törzsek nagy gyakorisággal tudnak plazmidokat felvenni, nem kizárt, hogy egyéb ST típusok is kialakíthatnak multidrog rezisztenciát a jövőben.<sup>(139)</sup>

A munkánk során azonosítottunk egy új *K. pneumoniae* szekvencia típust, nevezetesen az ST2567-et, ami az általunk tesztelt antibiotikumokra érzékeny volt és a ciprofloxacinnal történő szokatása során sem lehetett rezisztens törzset kisselektálni. Ebből arra következtetünk, hogy ez a klón nem fog széleskörben elterjedni és nem várható, hogy multirezisztenciát fog kialakítani. Ezzel szemben a vizsgálataink során egy másik *K. pneumoniae* klónt is vizsgáltunk: az ST274-et. Ezen klón esetén ciprofloxacinnal



szoktatás során sikerült rezisztens törzseket kisselektálni, ami az *oqx*B efflux pumpa gén fokozott expressziójával (15,8 és 22,8 szoros emelkedéssel) járt a 4 illetve 8mg/L ciprofloxacín expozíció esetén. Az ST274-es klónról ismert, hogy szélesebb körben elterjedt, több országban leírták már.<sup>(124, 140)</sup>

Korábbi publikációk alapján a *qnrD* determináns jellemzően az Enterobacterales renden belül a Morganellaceae családra jellemző.<sup>(46,36)</sup> A vizsgálatainkból származó eredmények ezzel összhangban vannak, tekintettel arra, hogy a mi munkánk során 214 Enterobacterales törzs elemzése során 2 *M. morganii*-ban sikerült *qnrD* determinánst detektálni, mely a kollekciónhoz tartozó *M. morganii* törzsek esetén 40%-os előfordulást jelentett. A *qnrD* plazmid szekvenálási eredményei alapján elmondható, hogy a *qnrD* plazmidok stabil genetikai szerkezetet mutatnak, tekintettel a nagyfokú (94-99%) hasonlóságukhoz, azonban rekombinációra alkalmas szekvenciák is megtalálhatóak ezen plazmidokon, mely alkalmassá teszi további genetikai elemekkel való rekombinációra és esetleg további bakteriális speciesekben is megjelenhet. A gének mobilizációját a plazmidon jelenlévő IRL és IRR szekvenciák elősegíthetik, melyeket az általunk detektált pSE10MM-ben is beazonosítottunk.

#### **A disszertációban szereplő új megállapítások és új megfigyelések:**

- A munkánk során a vizeletből származó Enterobacterales törzsekben a PMQR prevalencia 17.7%
- A PMQR-ok mind rezisztens, mind érzékeny fenotípusú törzsekben jelen voltak
- Azonosítottunk egy új *K. pneumoniae* szekvencia típust, nevezetesen az ST2567-et, amely egy új *tonB* variánst hordoz, nevezetesen ez a 371-es variáns
- Az *oqx*B expresszió emelkedésével rezisztens törzs tudott kisselektálódni
- Elsőként detektáltunk *qnrD* determinánst Magyarországon
- A *qnrD* plazmid teljes szekvenciáját meghatároztuk, mely a Genbank-ban az alábbi sorszámon elérhető: KU160530
- Filogenetikai elemzéssel sikerült prototípus *qnrD* plazmidokat és a rekombináns *qnrD* plazmidokat meghatározni

- Ciprofloxacin expozíció hatására a *qnrD* génexpresszió 30,06-szorosra; ezzel párhuzamosan a plazmid kópia szám 6,63-szoros emelkedést mutatott. Az expresszió szintjének emelkedésével rezisztens klón tud kisselektálódni
- A pSE10MM rekombinációra alkalmas szekvenciákat is tartalmaz, így később más speciosekben is megjelenhet
- a pSE10MM LexA kötőhelye azt jelenti, hogy a *qnrD* gén átírása SOS response szabályozása alatt áll a plazmidban

## 7. Összefoglalás

Az antibiotikum rezisztencia komoly klinikai kihívást jelent, számos beteg halálát okozva nap mint nap. A fluorokinolonok az utóbbi évtizedekben az alap- és kórházi ellátásban is széles körben alkalmazott antibiotikumokká váltak, tekintettel a széles hastásspektrumukra, kiváló farmakokinetikai tulajdonságaikra, illetve *per os* használhatóságukra. Azonban ahogy használatuk elterjedt, úgy a fluorokinolon és multidrog rezisztens törzsek prevalenciája is emelkedni kezdett. Vizsgálataink során 214 Enterobacterales törzs elemzését végeztük, melyeket húgyúti mintákból izoláltak 2012-2014 között a Semmelweis Egyetemen. Munkánk célja a plazmidon kódolt fluorokinolon rezisztencia determinánsok (PMQR) jelenlétének PCR alapú detektálása és a törzsek antibiotikum érzékenységi profiljának felmérése volt. A további vizsgálatokhoz 2 *K. pneumoniae* törzs került kiválasztásra, melyek esetén az általuk hordozott *oqxAB* efflux pumpa génjeinek indukálhatóságát elemeztük. Törzseink MLST alapján besorolásra kerültek. Ezen kívül egy *M. morgani* törzs részletes vizsgálatát végeztük, mely *qnrD*-t hordozott, valamint a Genbankban található *qnrD* plazmidokkal hasonlítottuk össze. A munkánk során a 214 törzs között 17,7%-os PMQR prevalenciát detektáltunk és számos törzs ezen determinánsokat az aktuálisan érvényben lévő EUCAST irányelveknek megfelelő fluorokinolon érzékeny fenotípus mellett hordozta. A *K. pneumoniae* SE191 törzs esetén indukálható volt az *oqxAB* efflux pumpa expressziója emelkedő fluorokinolon koncentráció mellett, ezzel tudott a törzs az antibiotikum expozícióhoz alkalmazkodni. A *K. pneumoniae* SE23-as törzs esetén egy új ST típust azonosítottunk, mert ez a törzs a *tonB* housekeeping gén új allélalját hordozta. A *M. morgani* SE10MM törzs esetén a *qnrD* gént elsőként detektáltuk Magyarországon. A *qnrD* plazmid teljes szekvenciáját beazonosítottuk, mely egy új plazmidnak bizonyult az NCBI adatbázis alapján. A többi elérhető, állati és humán *qnrD* plazmid szekvenciákat összehasonlítva klasztereket tudtunk létrehozni, melyek alapján a plazmidok rekombinációjára lehet következtetni. A *qnrD* plazmid esetén az SOS response rendszerben résztvevő kódoló szekvenciákat is észleltünk, alátámasztva a PMQR-ok SOS response általi aktiválását. Eredményeink az EUCAST 2017. január elsején kiadott új fluorokinolon rezisztencia határértékekkel korrelálnak, minthogy a kiszelektálódott *K. pneumoniae* törzs, illetve a *qnrD*-t hordozó *M. morgani* is az új irányelvek szerint már rezisztensnek minősül.

## 8. Summary

Antibiotic resistance is a serious clinical challenge, causing the death of many patients each day. Fluoroquinolones due to their broad spectrum, excellent pharmacokinetics and oral administration have become commonly used antibiotics in primary care as well as hospital units throughout the last decades. However, as their consumption has become common, the rate of fluoroquinolone and multidrug resistant strains started to escalate. In our study 214 Enterobacterales strains were analysed, which were isolated from urine samples between 2012-2014 at Semmelweis University. Our aim was to detect the plasmid-mediated quinolone resistance determinants (PMQR) by PCR and to survey the antibiotic resistance profiles of the strains. For further examinations, 2 *K. pneumoniae* strains were selected, which carried the genes of *oqxAB* efflux pump, to investigate the inducibility of the genes. Our strains were classified by MLST. Furthermore, a *M. morganii* strain, which carried a *qnrD* gene was thoroughly analysed and compared with the *qnrD* plasmids in Genbank. Among the strains, we detected a 17.7% PMQR prevalence, whereas in many cases these determinants were found in strains that were susceptible to fluoroquinolones according to the current EUCAST breakpoints in 2016. In case of the *K. pneumoniae* strains, in one strain the expression of the *oqxAB* efflux pump was inducible in increasing fluoroquinolone concentrations, thus the strain survived in the antibiotic exposure. A new ST type was detected in case of SE23, which was caused by a mutation in the *tonB* housekeeping gene. The new ST type was compared with others available in the MLST database. In the *M. morganii* strain, a *qnrD* gene was found, which was detected in Hungary for the first time. The whole *qnrD* plasmid sequence was analysed, which proved to be a novel plasmid. Comparing all available *qnrD* plasmids, from human and animal origin, we could make clusters, that indicate the recombination of plasmids. In the *qnrD* plasmid, we detected coding sequences of SOS response, which proves the activation of PMQRs by the SOS response system. Our results correlate well with the EUCAST guidelines from January 1<sup>st</sup>, 2017, as both the selected *K. pneumoniae* strain and the *M. morganii* carrying *qnrD* is considered resistant from that time on.

## 9. Irodalomjegyzék

- (1) <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/33000-people-die-every-year-due-infections-antibiotic-resistant-bacteria>
- (2) Price R. (2016) O'Neill report on antimicrobial resistance: funding for antimicrobial specialists should be improved. *Eur J Hosp Pharm.*, 23:245-247.
- (3) Sheu CC, Chang YT, Lin SY, Chen YH, Hsueh PR. (2019) Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: An Update on Therapeutic Options. *Front Microbiol.*, 10:80.
- (4) Haidar G, Alkroud A, Cheng S, Churilla TM, Churilla BM, Shields RK, Doi Y, Clancy CJ, Nguyen MH. (2016) Association between the Presence of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and In Vitro Activity of Gentamicin, Tobramycin, Amikacin, and Plazomicin against *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase- and Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacter Species. *Antimicrob Agents Chemother.*, 60:5208-5214.
- (5) Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. (2014) Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 5:643.
- (6) Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. (2006) The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.*, 6:629-640.
- (7) 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.
- (8) Wenzel RP, Sahm DF, Thornsberry C, Draghi DC, Jones ME, Karlowsky JA. (2003) In vitro susceptibilities of gram-negative bacteria isolated from hospitalized patients in four European countries, Canada, and the United States in 2000-2001 to expanded-spectrum cephalosporins and comparator antimicrobials: implications for therapy. *Antimicrob Agents Chemother.*, 47:3089-3098.
- (9) Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, Thornsberry C, Friedland IR, Sahm DF. (2003) Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother.*, 47:1681-1688.

- (10) Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. (2001) Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis.*, 32:94-103.
- (11) Hoban DJ, Doern GV, Fluit AC, Roussel-Delvallez M, Jones RN. (2001) Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.*, 32:81-93.
- (12) 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.
- (13) Garau J, Xercavins M, Rodríguez-Carballeira M, Gómez-Vera JR, Coll I, Vidal D, Llovet T, Ruíz-Bremón A. (1999) Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob Agents Chemother.*, 43:2736-2741.
- (14) Newman LM, Wang SA, Ohye RG, O'Connor N, Lee MV, Weinstock HS. (2004) The epidemiology of fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Hawaii, 2001. *Clin Infect Dis.*, 38:649-654.
- (15) Low DE. Quinolone resistance and its clinical relevance. In: Hooper DC, Rubinstein E, Quinolone antimicrobial agents. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 2003: 355–386.
- (16) Blaettler L, Mertz D, Frei R, Elzi L, Widmer AF, Battegay M, Flückiger U. (2009) Secular trend and risk factors for antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates in Switzerland 1997-2007. *Infection.*, 37:534-539.
- (17) Sanchez GV, Master RN, Karlowsky JA, Bordon JM. (2012) In vitro antimicrobial resistance of urinary *Escherichia coli* isolates among U.S. outpatients from 2000 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother.*, 56:2181-2183.
- (18) Reis AC, Santos SR, Souza SC, Saldanha MG, Pitanga TN, Oliveira RR. (2016) Ciprofloxacin resistance pattern among bacteria isolated from patients with community-acquired urinary tract infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 58:53.
- (19) [https://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011\\_0001\\_524\\_Farmakologia/ch12s02.html](https://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/2011_0001_524_Farmakologia/ch12s02.html)

- (20) Kocsis B, Domokos J, Szabo D. (2016) Chemical structure and pharmacokinetics of novel quinolone agents represented by avarofloxacin, delafloxacin, fleroxacin, zabofloxacin and nemonoxacin. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, 15:34.
- (21) Drlica K, Zhao X. (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 61:377-392.
- (22) Kampranis SC, Bates AD, Maxwell A. (1999) A model for the mechanism of strand passage by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96:8414-8419.
- (23) [https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3025574\\_gkq799f4&req=4](https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3025574_gkq799f4&req=4)
- (24) [http://ecoliwiki.net/colipedia/index.php/Topoisomerase\\_IV](http://ecoliwiki.net/colipedia/index.php/Topoisomerase_IV)
- (25) Hiasa H, Shea ME. (2000) DNA gyrase-mediated wrapping of the DNA strand is required for the replication fork arrest by the DNA gyrase-quinolone-DNA ternary complex. *J Biol Chem.*, 275:34780-34786.
- (26) <https://www.intechopen.com/books/trends-in-helicobacter-pylori-infection/the-mechanisms-of-action-and-resistance-to-fluoroquinolone-in-helicobacter-pylori-infection>
- (27) <http://www.antimicrobe.org/new/d17.asp>
- (28) Nitsche D, Schulze C, Oesser S, Dalhoff A, Sack M. (1996) Impact of different classes antimicrobial agents on plasma endotoxin activity. *Arch Surg.*, 131:192-199.
- (29) Ludwig E. Kinolonok, fluorokinolonok. In: Gyires K., Fürst Zs., *A farmakológia alapjai. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2011: 860-866.*
- (30) Nelson DL, Cox MM. DNA Cloning: The Basics. In: Nelson DL, Cox MM, *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, 2008: 304-315.
- (31) J. Goddard, A.N. Turner, L. H. Stewart. Kidney and urinary tract disease. Urinary tract infection (UTI). In: Colledge NR, Walker BR, Ralston SH, *Davidson's Principles & Practice of Medicine*. Elsevier Ltd., London, 2010: 469-472.
- (32) Hooper DC. Mechanisms of quinolone resistance. In: Hooper DC, Rubenstein E, *Quinolone antimicrobial agents*. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 2003: 41-67.
- (33) Ruiz J. (2003) Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother.*, 51:1109-1117.

- (34) Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.*, 351:797-799.
- (35) Ruiz J. (2018) Analysis of the presence of erroneous Qnr sequences in GenBank. *J Antimicrob Chemother.*, 73:1213-1216.
- (36) Ruiz J. (2019) Transferable Mechanisms of Quinolone Resistance from 1998 Onward. *Clin Microbiol Rev.*, 32: 7-19.
- (37) Yamane K, Wachino J, 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.
- (38) 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.
- (39) 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.
- (40) 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.
- (41) El-Badawy MF, Tawakol WM, El-Far SW, Maghrabi IA, Al-Ghamdi SA, Mansy MS, Ashour MS, Shohayeb MM. (2017) Molecular Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Recovered from Egyptian Patients. *Int J Microbiol.*, 2017:8050432.
- (42) Das A, Natarajan M, Mandal J. (2016) The Emergence of Quinolone Resistant *Shigella sonnei*, Pondicherry, India. *PLoS One.*, 11: 0160290.
- (43) 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.



- (44) Veldman K, Cavaco LM, Mevius DJ, Battisti A, Franco A, Botteldoorn N, Bruneau M, Perrin-Guyomard A, Cerny T, De Frutos Escobar C, Guerra B, Schroeter A, Gutierrez M, Hopkins K, Myllyniemi AL, Sunde M, Wasyl D, Aarestrup FM. (2011) International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, human food and the environment in 13 European countries. *J Antimicrob Chemother*, 66:1278-1286.
- (45) Zhao, J., Chen, Z., Chen, S., Deng, Y., Liu, Y., Tian, W., Huang, X., Wu, C., Sun, Y., Sun, Y., Zeng, Z., & Liu, J. H. (2010) Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54: 4219–4224.
- (46) 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: 46-48.
- (47) Ogbolu DO, Daini OA, Ogunledun A, Alli AO, Webber MA. (2011) High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria. *Int J Antimicrob Agents.*, 37:62-66.
- (48) Mokracka J, Gruszczyńska B, Kaznowski A. (2012) Integrons,  $\beta$ -lactamase and *qnr* genes in multidrug resistant clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *P. vulgaris*. *APMIS.*, 120:950-958.
- (49) Nasri Yaiche M, Denden Rafrat I, Guo Q, Mastouri M, Aouni M, Wang M. (2014) Type II and type IV topoisomerase mutations in clinical isolates of *Morganella morganii* harbouring the *qnrD* gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, 13:34.
- (50) Guillard, T., Grillon, A., de Champs, C., Cartier, C., Madoux, J., Berçot, B., Lebreil, A. L., Lozniewski, A., Riahi, J., Vernet-Garnier, V., & Cambau, E. (2014) Mobile insertion cassette elements found in small non-transmissible plasmids in *Proteaceae* may explain *qnrD* mobilization. *PloS one*, 9: 87801.
- (51) Guillard, T., Cambau, E., Neuwirth, C., Nenninger, T., Mbadi, A., Brasme, L., Vernet-Garnier, V., Bajolet, O., & de Champs, C. (2012) Description of a 2,683-base-pair plasmid containing *qnrD* in two *Providencia rettgeri* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56: 565–568.

- (52) Albornoz E, Tijet N, De Belder D, Gomez S, Martino F, Corso A, Melano RG, Petronia 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*, 61:02555-025516.
- (53) <https://www.intechopen.com/books/trends-in-helicobacter-pylori-infection/the-mechanisms-of-action-and-resistance-to-fluoroquinolone-in-helicobacter-pylori-infection>
- (54) [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)
- (55) Morais Cabral JH, Jackson AP, Smith CV, Shikotra N, Maxwell A, Liddington RC. (1997) Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature.*, 388:903-906.
- (56) 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.
- (57) 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.
- (58) Alonso A, Martinez JL. (2001) Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 45:1879-1881.
- (59) Magnet S, Courvalin P, Lambert T. (2001) Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother.*, 45:3375-3380.
- (60) Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (1999) Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli* marRAB locus, by multiple chemicals in vitro. *Journal of bacteriology*, 181: 4669–4672.
- (61) Oethinger M, Kern WV, Jellen-Ritter AS, McMurry LM, Levy SB. (2000) Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother.*, 44:10-13.
- (62) Heisig P, Tschorny R. (1994) Characterization of fluoroquinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* selected in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.*, 38:1284-1291.

- (63) Deguchi, T., Fukuoka, A., Yasuda, M., Nakano, M., Ozeki, S., Kanematsu, E., Nishino, Y., Ishihara, S., Ban, Y., & Kawada, Y. (1997) Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41: 699–701.
- (64) Komp Lindgren P, Karlsson A, Hughes D. (2003) Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.*, 47:3222-3232.
- (65) Blázquez J. (2003) Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis.*, 37:1201-1209.
- (66) Ysern P, Clerch B, Castaño M, Gibert I, Barbé J, Llagostera M. (1990) Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. *Mutagenesis.*, 5:63-66.
- (67) Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P., & De Anta, M. T. (1996) Detection of mutations in parC in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40:491–493.
- (68) Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother.*, 17:149-182.
- (69) Tran JH, Jacoby GA. (2002) Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 99:5638-5642.
- (70) Cambau E, Lascols C, Sougakoff W, Bébéar C, Bonnet R, Cavallo JD, Gutmann L, Ploy MC, Jarlier V, Soussy CJ, Robert J. (2006) Occurrence of qnrA-positive clinical isolates in French teaching hospitals during 2002-2005. *Clin Microbiol Infect.*, 12:1013-1020.
- (71) Cheung TK, Chu YW, Chu MY, Ma CH, Yung RW, Kam KM. (2005) Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother.*, 56:586-589.
- (72) Nordmann P, Poirel L. (2005) Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.*, 56:463-469.

- (73) Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. (2005) Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob Agents Chemother.*, 49:3523-3525.
- (74) Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.*, 22:664-689.
- (75) 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.
- (76) Torpdahl M, Hammerum AM, Zachariasen C, Nielsen EM. (2009) Detection of qnr genes in *Salmonella* isolated from humans in Denmark. *J Antimicrob Chemother.*, 63:406-408.
- (77) Cattoir, V., Poirel, L., Mazel, D., Soussy, C. J., & Nordmann, P. (2007) *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51: 2650–2651.
- (78) Sánchez MB, Hernández A, Rodríguez-Martínez JM, Martínez-Martínez L, Martínez JL. (2008) Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiol.*, 8:148.
- (79) Velasco C, Rodríguez-Martínez JM, Briales A, Díaz de Alba P, Calvo J, Pascual A. (2010) Smaqnr, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *J Antimicrob Chemother.*, 65:239-242.
- (80) Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Briales A, García I, Conejo MC, Pascual A. (2008) Qnr-like pentapeptide repeat proteins in gram-positive bacteria. *J Antimicrob Chemother.*, 61:1240-1243.
- (81) Arsène, S., & Leclercq, R. (2007) Role of a qnr-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51: 3254–3258.
- (82) Vetting, M. W., Hegde, S. S., Fajardo, J. E., Fiser, A., Roderick, S. L., Takiff, H. E., & Blanchard, J. S. (2006) Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry*, 45: 1–10.
- (83) Montero C, Mateu G, Rodriguez R, Takiff H. (2001) Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrob Agents Chemother.*, 45:3387-3392.

- (84) Hegde SS, Vetting MW, Roderick SL, Mitchenall LA, Maxwell A, Takiff HE, Blanchard JS. (2005) A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science.*, 308:1480-1483.
- (85) Garrido, M. C., Herrero, M., Kolter, R., & Moreno, F. (1988) The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *The EMBO journal*, 7: 1853–1862.
- (86) Jacoby GA, Chow N, Waites KB. (2003) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother.*, 47:559-562.
- (87) Heddle JG, Blance SJ, Zamble DB, Hollfelder F, Miller DA, Wentzell LM, Walsh CT, Maxwell A. (2001) The antibiotic microcin B17 is a DNA gyrase poison: characterisation of the mode of inhibition. *J Mol Biol.*, 307:1223-1234.
- (88) Tran, J. H., Jacoby, G. A., & Hooper, D. C. (2005) Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein QnrA with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49: 3050–3052.
- (89) Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Pascual A, García I, Martínez-Martínez L. (2006) Correlation of quinolone resistance levels and differences in basal and quinolone-induced expression from three qnrA-containing plasmids. *Clin Microbiol Infect.*, 12:440-445.
- (90) Xu, X., Wu, S., Ye, X., Liu, Y., Shi, W., Zhang, Y., & Wang, M. (2007) Prevalence and expression of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnrA1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51: 4105–4110.
- (91) Rodríguez-Martínez JM, Briales A, Velasco C, Conejo MC, Martínez-Martínez L, Pascual A. (2009) Mutational analysis of quinolone resistance in the plasmid-encoded pentapeptide repeat proteins QnrA, QnrB and QnrS. *J Antimicrob Chemother.*, 63:1128-1134.
- (92) Cano ME, Martinez-Martinez L, Garcia-Lobo JM, Calvo J, Aguero J. Detection of orf513 and qnrA among multiresistant gram-negative clinical isolates in Spain. In: *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, London, 2005*: 1043-1074.
- (93) Cano, M. E., Rodríguez-Martínez, J. M., Agüero, J., Pascual, A., Calvo, J., García-Lobo, J. M., Velasco, C., Francia, M. V., & Martínez-Martínez, L. (2009) Detection

- of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Enterobacter* spp. in Spain. *Journal of clinical microbiology*, 47: 2033–2039.
- (94) Hopkins KL, Wootton L, Day MR, Threlfall EJ. (2007) Plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrS1* found in *Salmonella enterica* strains isolated in the UK. *J Antimicrob Chemother.*, 59:1071-1075.
- (95) Jacoby GA. (2005) Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis.*, 41: 120-126.
- (96) Rodríguez-Martínez, J. M., Velasco, C., García, I., Cano, M. E., Martínez-Martínez, L., & Pascual, A. (2007) Mutant prevention concentrations of fluoroquinolones for *Enterobacteriaceae* expressing the plasmid-carried quinolone resistance determinant *qnrA1*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51: 2236–2239.
- (97) Bönemann G, Stiens M, Pühler A, Schlüter A. (2006) Mobilizable *IncQ*-related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, *qnrS2*, isolated from the bacterial community of a wastewater treatment plant. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50:3075-3080.
- (98) García-Fernández A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. (2009) Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. *J Antimicrob Chemother.*, 63:274-281.
- (99) Kehrenberg C, Hopkins KL, Threlfall EJ, Schwarz S. (2007) Complete nucleotide sequence of a small *qnrS1* carrying plasmid from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* typhimurium DT193. *J Antimicrob Chemother.*, 60:903–905.
- (100) Wu JJ, Ko WC, Tsai SH, Yan JJ. (2007) Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *QnrA*, *QnrB*, and *QnrS* among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital. *Antimicrob Agents Chemother.*, 51:1223-1227.
- (101) Wu JJ, Ko WC, Wu HM, Yan JJ. (2008) Prevalence of *Qnr* determinants among bloodstream isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a Taiwanese hospital, 1999-2005. *J Antimicrob Chemother.*, 61:1234-1239.
- (102) Cattoir V, Nordmann P. (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update. *Curr Med Chem.*, 16:1028-1046.

- <sup>(103)</sup>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.
- <sup>(104)</sup> 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.
- <sup>(105)</sup> Wang M, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC. (2004) Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.*, 48:1295-1299.
- <sup>(106)</sup>Endimiani, A., Carias, L. L., Hujer, A. M., Bethel, C. R., Hujer, K. M., Perez, F., Hutton, R. A., Fox, W. R., Hall, G. S., Jacobs, M. R., Paterson, D. L., Rice, L. B., Jenkins, S. G., Tenover, F. C., & Bonomo, R. A. (2008) Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing *bla*KPC in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52: 2680–2682.
- <sup>(107)</sup>Carattoli A, Aschbacher R, March A, Larcher C, Livermore DM, Woodford N. (2010) Complete nucleotide sequence of the *IncN* plasmid pKOX105 encoding VIM-1, *QnrS1* and SHV-12 proteins in *Enterobacteriaceae* from Bolzano, Italy compared with *IncN* plasmids encoding KPC enzymes in the USA. *J Antimicrob Chemother.*, 65:2070-2075.
- <sup>(108)</sup>Szabó D, Kocsis B, Rókus L, Szentandrassy J, Katona K, Kristóf 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.
- <sup>(109)</sup>Poirel L, Pitout JD, Calvo L, Rodriguez-Martinez JM, Church D, Nordmann P. (2006) In vivo selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50:1525-1527.
- <sup>(110)</sup>Perletti G., Magri V. Treatment of Bacterial Prostatitis: Clinico-Pharmacological Considerations. In: Cai T., Bjerkklund Johansen T., Prostatitis and Its Management. Springer, Switzerland, 2016: 33-48.

- <sup>(111)</sup>Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ. (2004) Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 48:3332-3337.
- <sup>(112)</sup>Hansen LH, Sørensen SJ, Jørgensen HS, Jensen LB. (2005) The prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant *Escherichia coli* in pigs. *Microb Drug Resist.*, 11:378-382.
- <sup>(113)</sup> Hansen LH, Jensen LB, Sorensen HI, Sorensen SJ. (2007) Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother.*, 60:145–147.
- <sup>(114)</sup>Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. (2015) The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev.*, 28:337-418.
- <sup>(115)</sup>CLSI. M100-S25 performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement; 2015
- <sup>(116)</sup> EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. 2015.
- <sup>(117)</sup>Kahlmeter GJ. (2015) The 2014 Garrod Lecture: EUCAST - are we heading towards international agreement? *Antimicrob Chemother.*, 70:2427-2439.
- <sup>(118)</sup>[http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
- <sup>(119)</sup>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.
- <sup>(120)</sup>Schmittgen TD, Livak KJ. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.*, 3:1101-1108.
- <sup>(121)</sup>Lascols C, Robert J, Cattoir V, Bébéar C, Cavallo JD, Podglajen I, Ploy MC, Bonnet R, Soussy CJ, Cambau E. (2007) Type II topoisomerase mutations in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and other enterobacterial species harbouring the qnrA gene. *Int J Antimicrob Agents.*, 29:402-409.
- <sup>(122)</sup> Domokos J, Kristóf K, Szabó D. (2016) Plasmid-mediated quinolone resistance among extended spectrum beta lactase producing *Enterobacteriaceae* from bloodstream infections. *Acta Microbiol Immunol Hung.*, 63:313-323.



- (123) el Amin, N. A., Jalal, S., & Wretlind, B. (1999) Alterations in GyrA and ParC associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43: 947–949.
- (124) Tóth A, Kocsis B, Damjanova I, Kristóf K, Jánvári L, Pászti J, Csercsik R, Topf J, Szabó D, Hamar P, Nagy K, Füzi 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.
- (125) [https://bigsdbs.web.pasteur.fr/cgi\\_bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst\\_klebsiella\\_seqdef](https://bigsdbs.web.pasteur.fr/cgi_bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef)
- (126) Cheng L, Cao XL, Zhang ZF, Ning MZ, Xu XJ, Zhou W, Chen JH, Zhang JH, Shen H, Zhang K. (2016) Clonal dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone with high prevalence of *oqxAB* and *rmtB* in a tertiary hospital in China: result from a 3-year period. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 15:1.
- (127) Anes, J., Hurley, D., Martins, M., & Fanning, S. (2017) Exploring the Genome and Phenotype of Multi-Drug Resistant *Klebsiella pneumoniae* of Clinical Origin. *Frontiers in microbiology*, 8:1913.
- (128) Abderrahim A, Djahmi N, Pujol C, Nedjai S, Bentakouk MC, Kirane-Gacemi D, Dekhil M, Sotto A, Lavigne JP, Pantel A (2017) First case of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Annaba University Hospital, Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 23: 895–900.
- (129) Domokos J, Kristóf K, Szabó D. (2016) Plasmid-mediated quinolone resistance among extended spectrum beta lactase producing *Enterobacteriaceae* from bloodstream infections. *Acta Microbiol Immunol Hung.*, 63:313-323.
- (130) Vinothkumar, K., Bhalara S.R., Shah A., Ramamurty T, Niyogi SK, Kumar GN, Bhardway AK. (2018) Involvement of topoisomerase mutations and *qnr* and *aac(6')Ib-cr* genes in conferring quinolone resistance to clinical isolates of *Vibrio* and *Shigella* spp. from Kolkata, India (1998–2009). *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 13:85–90.
- (131) Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, Calvo J, Martínez-Martínez L, Pascual A. (2016) Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resist Updat.*, 29:13-29.

- (132) Da Re, S., Garnier, F., Guérin, E., Campoy, S., Denis, F., & Ploy, M. C. (2009) The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. *EMBO reports*, 10: 929–933.
- (133) Briales A, Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, Machuca J, Díaz de Alba P, Blazquez J, Pascual A. (2012) Exposure to diverse antimicrobials induces the expression of *qnrB1*, *qnrD* and *smaqnr* genes by SOS-dependent regulation. *J Antimicrob Chemother.*, 67:2854-2859.
- (134) Wang, M., Jacoby, G. A., Mills, D. M., & Hooper, D. C. (2009) SOS regulation of *qnrB* expression. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53: 821–823.
- (135) Schlesinger DJ. (2007) Role of RecA in DNA damage repair in *Deinococcus radiodurans*. *FEMS Microbiol Lett.*, 274:342-347.
- (136) <http://2012.igem.org/Team:Osaka/Project>
- (137) 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.
- (138) Baek EH, Kim SE, Kim S, Lee S, Cho OH, In Hong S, Shin JH, Hwang I. (2020) Successful control of an extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 outbreak in a neonatal intensive care unit. *BMC Infect Dis.*, 20:166.
- (139) Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. (2017) *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.*, 41:252-275.
- (140) Poirel, L., Nordmann, P., Ducroz, S., Boulouis, H. J., Arné, P., & Millemann, Y. (2013) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type ST274 in companion animals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57: 2372–2375.
- (141) Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. (1995) Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 12:85-90.
- (142) Kanamaru S, Kurazono H, Ishitoya S, Terai A, Habuchi T, Nakano M, Ogawa O, Yamamoto S. (2003) Distribution and genetic association of putative uropathogenic

virulence factors *iroN*, *iha*, *kpsMT*, *ompT* and *usp* in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *J Urol.*, 170:2490-2493.

- <sup>(143)</sup> Tseng CC, Huang JJ, Ko WC, Yan JJ, Wu JJ. (2001) Decreased predominance of *papG* class II allele in *Escherichia coli* strains isolated from adults with acute pyelonephritis and urinary tract abnormalities. *J Urol.*, 166:1643-1646.

## 10. Saját publikációk jegyzéke

Contribution of OqxAB Efflux Pump in Selection of Fluoroquinolone-Resistant *Klebsiella pneumoniae*.

**Szabo O**, Kocsis B, Szabo N, Kristof K, Szabo D.

Can J Infect Dis Med Microbiol. 2018; 2018:4271638. doi: 10.1155/2018/4271638. eCollection 2018.

Plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae from urine clinical samples.

**Szabó O**, Gulyás D, Szabó N, Kristóf K, Kocsis B, Szabó D.

Acta Microbiol Immunol Hung. 2018; 65: 255-265. doi: 10.1556/030.65.2018.012.

Ciprofloxacin Promoted *qnrD* Expression and Phylogenetic Analysis of *qnrD* Harboring Plasmids.

Kocsis B, Szmolka A, **Szabo O**, Gulyas D, Kristóf K, Göcző I, Szabo D.

Microb Drug Resist. 2019; 25: 501-508. doi: 10.1089/mdr.2018.0245.

## 11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Prof. Szabó Dórának az Orvosi Mikrobiológiai Intézet Igazgatójának, hogy támogatta az intézetben történő tudományos munkámat. Köszönöm Dr. Kocsis Béla témavezetőnek az éveken át tartó tudományos témavezetést, illetve a szakma és a tudományos munka szeretetének átadását. Szeretném megköszönni a közös munkát a munkatársaknak és a szerzőtársaknak: Dr. Kristóf Katalin, Dr. Szmolka Ama, Dr. Gulyás Dániel, Dr. Szabó Nikolett és Göcző István.

Szeretném továbbá megköszönni a töretlen támogatást szüleimnek és testvéremnek egyetemi tanulmányaim, valamint tudományos és klinikai munkásságom során is.

A tudományos munka az OTKA K 108481 kutatási pályázatból lett finanszírozva.