

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

Tézisfüzet

**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, PhD, 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

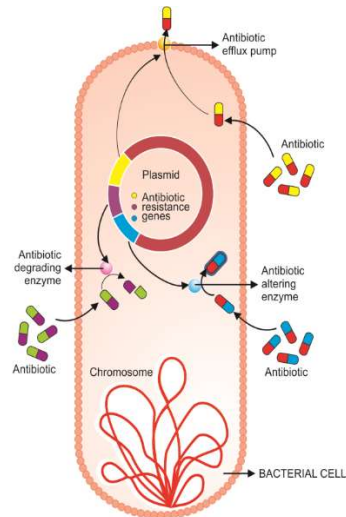
## 1. Bevezetés

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 infekcióban Európában. <sup>(1)</sup> Világszerte évente 700.000 beteg halálzásáért felelősek a rezisztens kórokozók és becslések szerint 2050-re körülbelül 10.000.000 ember halálzását fogják okozni. <sup>(2)</sup> A bakteriális infekciók 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>

A kinolonok targetje a DNS giráz és topoizomeráz IV enzimek. Ezeket gyógyszer-enzim-DNS komplexbe zárják, amely letális dupla szálú DNS töréseket hoz létre. <sup>(7)</sup> A fluorokinolonok széles spektrumuknak köszönhetően számos infekcióban alkalmazhatóak, generációjuknak megfelelően, úgy mint: húgyúti infekcióban, gastrointestinalis fertőzésekben, , bőr- és légyszív infekciókban, alsó- és felső légúti infekciókban, valamint septicaemia esetén is. <sup>(8,9)</sup>

Fluorokinolon rezisztencia esetén beszélhetünk kromoszómális és plazmidon kódolt rezisztencia mechanizmusokról. Kromoszómális rezisztencia esetén 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>(10)</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>(11,12)</sup> (Ábra 1)



Ábra 1: A fluorokinolon rezisztencia lehetséges mechanizmusai - kromoszómális mutációk vagy PMQR-ok <sup>(13)</sup>

## 2. Célkitűzés

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.

A 214 Enterobacterales törzs közül kettő olyan *K. pneumoniae* törzs került kiválasztásra, melyek ciprofloxacin MIC-értéke a 2016-ban elfogadott EUCAST irányelvek alapján az érzékeny tartományba tartozott, tehát 1 mg/L alatti volt. Ezen kívül a korábban vizsgált ciprofloxacin 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 ciprofloxacin 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. morgani* 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. morgani* esetén ciprofloxacín expozíció hatására a *qnrD* gén expresszió változásának meghatározását terveztük.

### 3. Módszerek

Vizsgálataink során összesen 214 Enterobacterales törzset analizáltunk, amelyeket a Semmelweis Egyetemen izoláltak húgyúti mintákból 2013 és 2014 között. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatot végeztünk ciprofloxacínra, 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>(14)</sup>

A PMQR gének detektálása PCR-rel történt mind a 214 törzs esetén.

A törzsek közül összesen 8 db *E. coli* törzs került kiválasztásra, melyek mindegyike legalább 1 *qnr* génre pozitivitást mutatott a korábbi PCR vizsgálatok során. A virulencia faktorok detektálása szintén PCR-el történt.

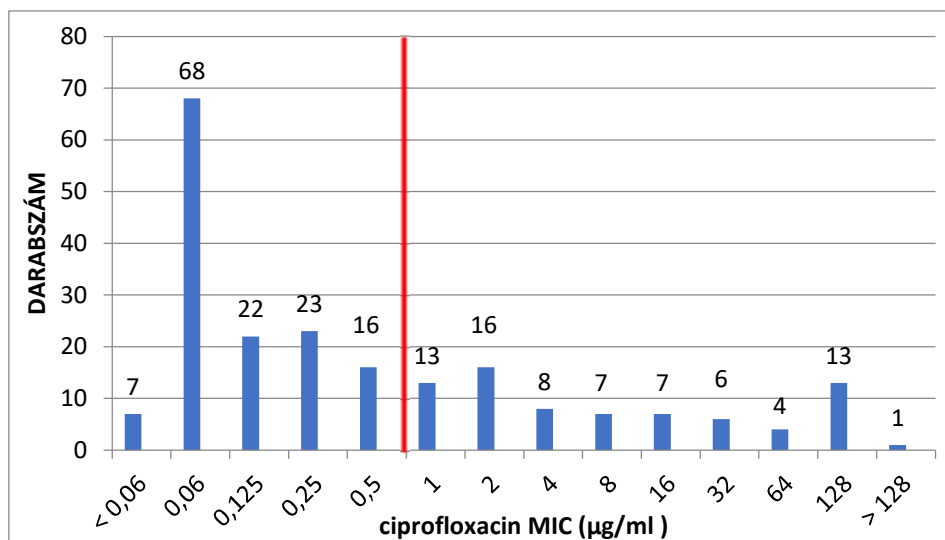
Két *K. pneumoniae* törzset választottunk ki, melyek a korábbiakban *oqxAB* efflux pumpát hordozónak bizonyultak, míg más PMQR-t nem azonosítottunk esetükben. A két vizsgált törzből egyenként 0,5 McFarland denzitású baktérium szuszpenziót készítettünk Mueller-Hinton tápoldatban, majd ezeket kezdetben a saját MIC értéküknek megfelelően 0,06, illetve 0,5 mg/L-es ciprofloxacín 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 denzitására hígítottuk és 1, 2, 4, illetve 8 mg/L-es koncentrációjú, fokozatosan emelkedő ciprofloxacín oldatba helyeztük. Minden egyes inkubáció 37°C-on 24 órán át történt. Minden esetben az emelkedő ciprofloxacín koncentrációban történt 24 órás inkubálás után RNS extrakció történt az *oqxAB* efflux pumpa expresszió szintjének megállapítására,

majd kvantitatív reverz-transzkriptáz PCR-t végeztünk az *oqxA* és *oqxB* génexpresszió szintjének megállapítására. 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. <sup>(15)</sup> A *gyrA* és *parC* génekben történő mutációk kialakulását a ciprofloxacín expozíció során nyert bakteriális szuszpenziókból PCR-rel és nukleinsav szekvenálással vizsgáltuk. Mindkét vizsgált *K. pneumoniae* törzs esetén multilocus szekvencia tipizálást végeztünk a 7 housekeeping gén PCR termékének nukleinsav szekvencia analízise alapján.

A korábban vizsgált 214 törzsből 1 *M. morgannii* hordozta a *qnrD* gént. Ezen törzset, illetve plazmidot elemeztük. A *qnrD* determináns azonosítása PCR-el történt, a korábban leírtaknak megfelelően. Pozitív kontrollként egy *qnrD*-t hordozó *E. coli* törzs szolgált. 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 további plazmid DNS részeket általunk tervezett primerpárokkal amplifikáltuk, melyet online primertervező program segítségével terveztünk (Eurofins Genomics; <http://www.eurofinsgenomics.eu>). A plazmid szekvenciáját az NCBI adatbázisban jegyzett plazmidok szekvenciáival hasonlítottuk össze. A topoizomeráz gén kinolon rezisztencia determináns régióinak, vagyis QRDR-einek, amplifikálása PCR-el történt, az ampikonok elemzéséhez pedig DNS szekvenálást végeztünk. 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. Konjugációs vizsgálataink során donorként az SE10MM törzset használtuk, recipiensként egy *E. coli* J53 Azide<sup>R</sup> törzset alkalmaztunk, 1:2, 1:4, illetve 1:10 arányban. A *M. morgannii* SE10MM törzs 0,5 McFarland denzitású szuszpenzióját 24 órás 1mg/L-es ciprofloxacín 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 ciprofloxacín expozíció nélkül alkalmaztunk negatív kontrollként. Minden megadott időpontban teljes RNS extrakció történt a vizsgált törzsekből, majd kvantitatív reverz-transzkriptáz PCR-t végeztünk. Hasonlóan a *recA* gént is vizsgáltuk, mint az SOS-response rendszer egyik regulátor génjét.

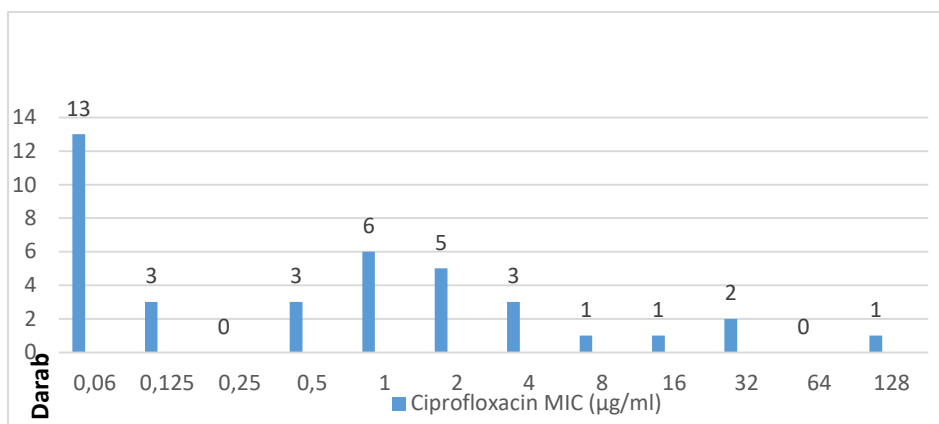
#### 4. Eredmények

PMQR prevalencia vizsgálataink során a következőket tapasztaltuk:



Ábra 2.: A vizsgált törzsek ciprofloxacin MIC érték szerinti számszerű eloszlása -75 vad típusú, 61 alacsony szintű rezisztens és 75 rezisztens fenotípust azonosítottunk.

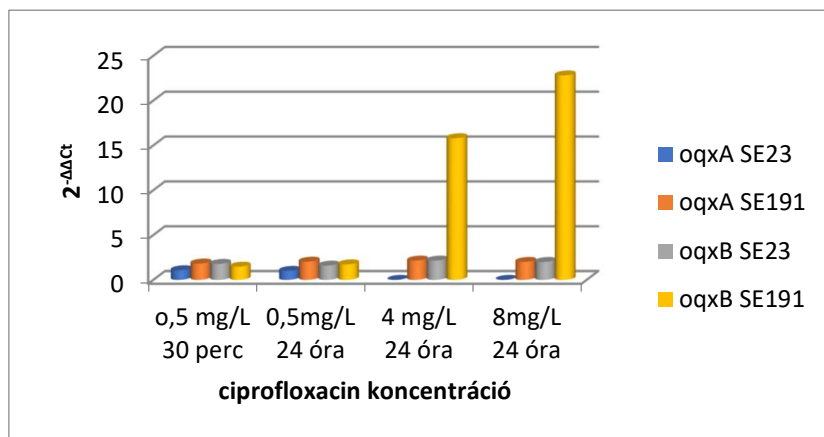
A 214 vizsgált törzsből 38 hordozott valamilyen PMQR-t, akár egyetlen egyet, vagy többféle PMQR kombinációját is. A tesztelt törzsekben így összességében 17,7%-os PMQR prevalenciát azonosítottunk.



Ábra 3.: A különböző PMQR-t hordozó törzsek ciprofloxacin MIC-érték szerinti eloszlása – 13 vad típusú, 6 low-level rezisztens és 19 rezisztens törzset azonosítottunk.

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

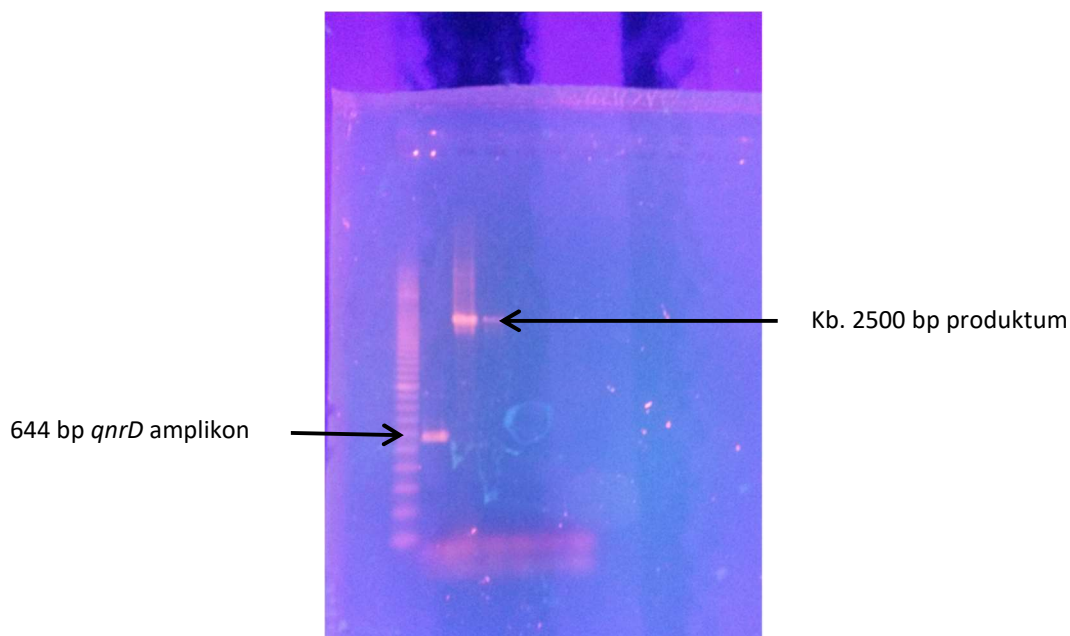
A vizsgált két *K. pneumoniae* törzset emelkedő ciprofloxacin koncentrációban történő inkubáció során az SE23 törzs esetén a 0,5 mg/L-es koncentrációnál magasabb értékeken növekedést nem detektáltunk. Az SE191 törzset azonban sikeresen szoktattuk a magasabb ciprofloxacin koncentrációkhoz, így egy rezisztens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



**Ábra 4:** 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. 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.

Az SE10MM nevezetű *M. morgani* törzs került vizsgálatra a továbbiakban. Az SE10MM *qnrD* plazmidja szekvenálásra került. A 2662 bázispár hosszúságú plazmidból, vagyis a pSE10MM-ből, a kivitelezett inverz PCR technikával egy 2500 bázispáros produktumot tudtunk nyerni a szekvenáláshoz.



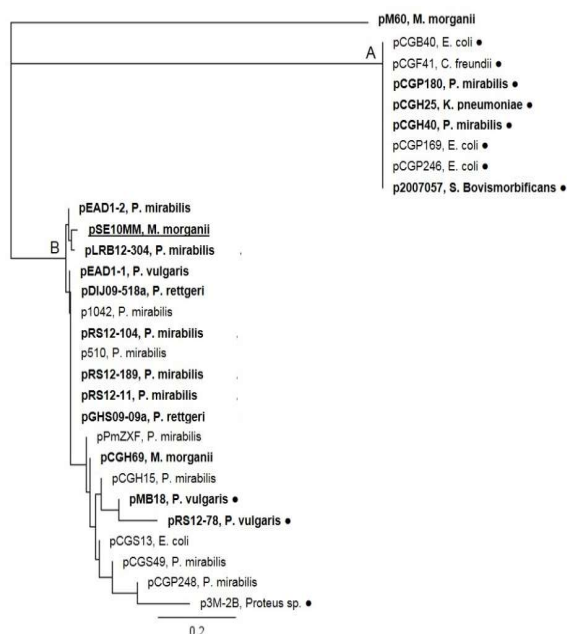
**Ábra 5:** A *qnrD* vizsgálatok során nyert gél elektroforézis eredménye, melyen a kb. 2500 bp-os plazmid és a QnrD amplicon látható

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. A *qnrDI* kódoló gén egy 644 bázispár hosszú régió, mely egy 214 aminosavból álló fehérjét kódol. A promoter 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. A *qnrDI* 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.



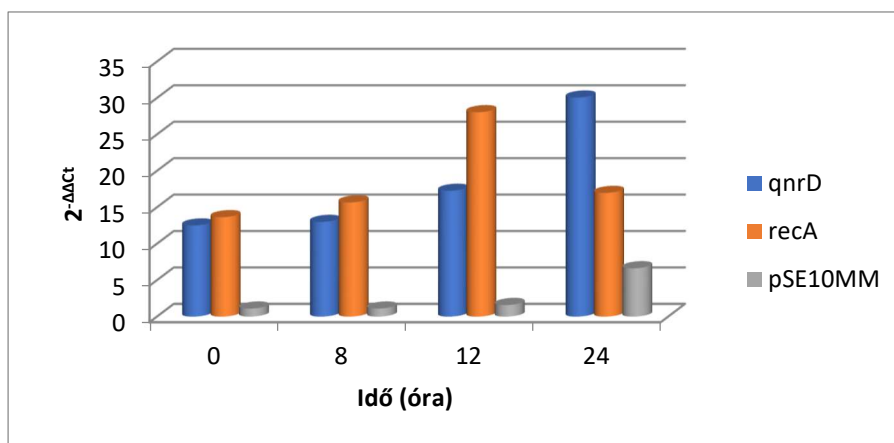
Azon plazmidok, melyek több mint 62%-os szekvencia azonosságot mutattak, közös klaszterbe kerültek besorolásra. A pSE10MM a „B” klaszterbe tartozott, 72-100%-os hasonlósággal a csoport többi tagjához. Ezen nagyobb csoportban mind humán, mind állati plazmidok megtalálhatók, változó nagyságban, döntő többségben *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 6.:** A *qnrD1* 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 *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 7:** 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

## 5. Következtetések

A PMQR determinánsok világszerte széleskörben megjelentek klinikai mintákból származó Enterobacterales izolátumokban.<sup>(11)</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>(11,16)</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 kiszelektálódhatnak rezisztens törzsek. Azonban a terápiás lehetőségek számának további csökkenése várható, hiszen a kiszelektálódott törzsek körében a fluorokinolon rezisztencia mellett további antibiotikumokkal szemben is kialakíthatnak rezisztenciát (pl.: plazmidok felvételével, efflux pumpa aktiválással), és akár multidrog rezisztencia is kialakulhat.

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>(17,18)</sup> A munkánk során azonosítottunk egy új *K. pneumoniae* szekvencia típust, nevezetesen az ST2567-et, ami az általunk tesztelt antibiotikumokra érzékeny volt és a ciprofloxaccinnal történő

szoktatása során sem lehetett rezisztens törzset kisselektálni. Ezzel szemben a vizsgálataink során egy másik *K. pneumoniae* klónt is vizsgáltunk az ST274-et. Ezen klón esetén ciprofloxacín szoktatás során sikerült rezisztens törzseket kisselektálni, ami az *oqxB* efflux pumpa gén fokozott expressziójával járt. Az ST274-es klónról ismert, hogy szélesebb körben elterjedt, több országban leírták már. <sup>(19,20)</sup>

Korábbi publikációk alapján a *qnrD* determináns jellemzően az Enterobacterales renden belül a Morganellaceae családra jellemző. <sup>(21,22)</sup> A vizsgálatainkból származó eredmények ezzel összhangban vannak: 214 Enterobacterales törzs elemzése során 2 *M. morganii*-ban sikerült *qnrD* determinánst detektálni, mely a kollekciónhoz tartozó *M. morganii* törzsek esetén 40%-os előfordulását 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 speciosekben is megjelenhet. A gének mobilizációját a plazmidon jelenlévő IRL és IRR szekvenciák elősegíthetik, melyeket az általunk detektált pSE10MM-ben is beazonosítottunk.

## 6. 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.

## 7. Irodalomjegyzék

- (1) <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/33000-people-die-every-year-due-infections-antibiotic-resistant-bacteria>
- (2) The Review on Antimicrobial Resistance. 2016. *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*. The Review on Antimicrobial Resistance, chaired by Jim O'Neill. Report commissioned by the UK Prime Minister. May 2016.
- (3) Sheu CC, Chang YT, Lin SY, et al. Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: an Update on Therapeutic Options. *Front Microbiol.*, 2019: 10:80.
- (4) Haidar G, Alkroud A, Cheng S, et al. 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*, 2016: 60(9):5208-14.
- (5) Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*, 2014: 5: 643.
- (6) Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis*, 2006: 6:629-40.
- (7) Hiasa H, Shea ME. 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*, 2000: 275:34780–34786.
- (8) Ludwig E. Kinolonok, fluorokinolonok. In: Gyires K., Fürst Zs., *A farmakológia alapjai*. Medicina Könyvkiadó Zrt, Budapest, 2011: 860-866.
- (9) 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.
- (10) Cabral JHM, Jackson AP, Smith CV, et al. Crystal structure of the breakage-reunion domain of DNA gyrase. *Nature*, 1997: 388:903–906.
- (11) Rodriguez-Martinez JM, Cano ME, Velasco C, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother*, 2011: 17:149-182.

- (12) Ruiz J. Analysis of the presence of erroneous Qnr sequences in GenBank. *J Antimicrob Chemother*, 2018; 73: 1213-1216.
- (13) <https://www.intechopen.com/books/trends-in-helicobacter-pylori-infection/the-mechanisms-of-action-and-resistance-to-fluoroquinolone-in-helicobacter-pylori-infection>
- (14) Hooper DC. Mechanisms of quinolone resistance. Hooper DC, Rubenstein E, eds. *Quinolone antimicrobial agents*. 3rd edn. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2003: 41–67.
- (15) Schmittgen, Thomas D, and Kenneth J Livak. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, 2008: 1101-8.
- (16) Domokos, J., Kristof, K., Szabo, D. Plasmid-mediated quinolone resistance among extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae from bloodstream infections. *Acta Microbiol Immunol Hung* 63, 2016: 313–323.
- (17) Domokos J, Damjanova I, Kristof K, et al. Multiple Benefits of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in *Klebsiella pneumoniae* ST11 High-Risk Clone and Recently Emerging ST307 Clone. *Front Microbiol*, 2019: 10:157.
- (18) Baek EH, Kim SE, Kim S, et al. Successful control of an extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 outbreak in a neonatal intensive care unit. *BMC Infect Dis*, 2020: 20(1):166.
- (19) Tóth A, Kocsis B, Damjanova I, et al. 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*, 2014: 33(5):837-43.
- (20) Poirel L, Nordmann P, Ducroz S, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type ST274 in companion animals. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013: 57(5):2372-5.
- (21) Mazzariol A, Kocsis B, Koncan R, et al. Description and plasmid characterization of *qnrD* determinants in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii*. *Clin Microbiol Infect*, 2012: 18:E46-E48.
- (22) Ruiz J. Transferable Mechanisms of Quinolone Resistance from 1998 Onward. *Clin Microbiol Rev*, 2019: 32: e00007-19.