

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

3123.

TÓTH KINGA

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

Program- és témavezető: Dr. Szabó Dóra, egyetemi tanár

Hazai invazív mintákból származó, multirezisztens
Escherichia coli ST131 törzsek összehasonlítása és
molekuláris vizsgálata

Doktori értekezés

Tóth Kinga

Semmelweis Egyetem

Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szabó Dóra, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Zsoldiné Dr. Urbán Edit, DSc, egyetemi tanár

Dr. Kenesei Éva, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Törő Klára, DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Kiss András, DSc, egyetemi tanár

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

Budapest
2024

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Rövidítésjegyzék.....	4
1. Bevezetés	6
1.1. <i>Escherichia coli</i> általános bemutatása	6
1.2. <i>Escherichia coli</i> csoportosítása az általuk okozott humán megbetegedések alapján.....	7
1.3. Az Egy Egészség (One Health) megközelítés	10
1.4. ExPEC okozta fertőzések kezelésére alkalmas antibiotikumokkal szembeni rezisztencia	11
1.4.1. Fontosabb antibiotikum rezisztencia mechanizmusok.....	12
1.4.2. A β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia	14
1.4.3. Fluorokinolon antibiotikumokkal szembeni rezisztencia	18
1.4.4. Aminoglikozid antibiotikumokkal szembeni rezisztencia	19
1.4.5. Egyéb antibiotikumokkal szembeni rezisztencia	20
1.5. ExPEC filogenetikai rendszerezése és nemzetközi klónjai	22
1.6. <i>Escherichia coli</i> ST131 klón bemutatása.....	25
1.6.1. Populáció szerkezet.....	25
1.6.2. ST131 C kládhoz társuló plazmidok	27
1.6.3. ST131 C kládhoz társuló egyéb mobilis genetikai elemek.....	30
1.6.4. <i>Escherichia coli</i> ST131 epidemiológiája.....	31
1.6.5. ST131 izolátumok virulencia faktorai	34
2. Célkitűzések.....	37
3. Módszerek	38
3.1. Felhasznált baktériumtörzsek.....	38
3.2. Izolátumok identifikálása	39
3.3. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok.....	39
3.4. Molekuláris vizsgálatok.....	40
3.4.1. ESB ^L -termelő <i>Escherichia coli</i> ST131 izolátumok vizsgálata multiplex, filogenetikai PCR-rel	40
3.4.2. ESB ^L -termelő <i>Escherichia coli</i> ST131 izolátumok PFGE vizsgálata	41
3.4.3. Genomiális DNS kivonása	42
3.4.4. Teljes genom szekvenálás: Short-read szekvenálás	42

3.4.5. Teljes genom szekvenálás: Long-read szekvenálás	43
3.4.6. Izolátumok filogenomikai rekonstrukciója és klaszterezése	44
3.4.7. Virulencia és antibiotikum rezisztencia gének elemzése	46
3.4.8. Plazmid szekvenciák jellemzése	46
3.5. Statisztikai elemzés	47
4. Eredmények.....	48
4.1. Egy prospektív, monocentrikus felmérés keretében gyűjtött <i>Escherichia coli</i> izolátumok vizsgálata, 2018. október-november	48
4.1.1. ESBL-termelő <i>E. coli</i> izolátumok antibiotikum érzékenysége	48
4.1.2. ESBL-termelő <i>E. coli</i> izolátumok molekuláris epidemiológiai vizsgálata	49
4.1.3. ESBL-termelő <i>E. coli</i> izolátum rezisztom és virulom jellemzése.....	51
4.2. Retrospektív, multicentrikus vizsgálat a C2/H30Rx és C1-M27 ST131 izolátumok populáció struktúrájának feltérképezésére, 2015-2018, 2021	56
4.2.1. Kiválasztott izolátumok adatai	56
4.2.2. C2/H30Rx és C1-M27 alkládokba tartozó <i>E. coli</i> izolátumok antibiotikum érzékenysége	57
4.2.3. C2/H30Rx és C1-M27 alkládok molekuláris epidemiológiája	58
4.2.4. Az <i>E. coli</i> ST131 izolátumok filogenetikai elemzése.....	62
4.2.5. A <i>bla</i> _{CTX-M-15} lokalizációja és genetikai környezete a C2/H30Rx izolátumokban	64
4.2.6. A <i>bla</i> _{CTX-M-27} lokalizációja és genetikai környezete a C1-M27 izolátumokban	67
4.3. Karbapenemáz-termelő <i>Escherichia coli</i> ST131 izolátumok vizsgálata, 2023	73
4.3.1. NDM-1- és CTX-M-27-termelő <i>E. coli</i> ST131 izolátum	73
4.3.2. OXA-244- és CTX-M-15-termelő <i>E. coli</i> ST131 izolátum	77
5. Megbeszélés	84
5.1. Egy prospektív, monocentrikus felmérés keretében gyűjtött <i>Escherichia coli</i> invazív izolátumok vizsgálata, 2018. október-november	84
5.1.1. Hazai incidencia adatok	84
5.1.2. Az izolátumok rezisztomja és molekuláris epidemiológiája	85
5.1.3. Az izolátumok FAB formulái és plazmid replikonjai	86
5.1.4. Az izolátumok virulomja.....	87
5.2. Retrospektív, multicentrikus vizsgálata a C2/H30Rx és C1-M27 ST131 izolátumok populáció struktúrájának feltérképezésére, 2015-2018, 2021	88
5.2.1. ST131 helyzete és a COVID-19 világjárvány hatása.....	88
5.2.2. Az izolátumok antibiotikum rezisztenciája, rezisztomja és virulomja	89

5.2.3. A mobilis genetikai elemekkel társított <i>bla</i> _{CTX-M-15} lokalizációja és genetikai környezete a C2/H30Rx izolátumokban	92
5.2.4. A <i>bla</i> _{CTX-M-27} lokalizációja és genetikai környezete a C1-M27 izolátumokban	94
5.2.5. A C1 és C2 alkládok hazai elterjedése	95
5.3. Karbapenemáz-termelő <i>Escherichia coli</i> ST131 izolátumok, 2023	96
5.3.1. NDM-1- és CTX-M-27- termelő <i>E. coli</i> ST131 izolátum	97
5.3.2. OXA-244- és CTX-M-15- termelő <i>E. coli</i> ST131 izolátum.....	99
6. Következtetések	102
6.1. Prospektív, monocentrikus vizsgálat, 2018. október-november	102
6.2. Retrospektív, multicentrikus vizsgálat, 2015-2018 és 2021	103
6.3. Karbapenemáz-termelő ST131 <i>Escherichia coli</i> izolátumok, 2023	103
7. Összefoglalás.....	104
8. Summary.....	105
9. Irodalomjegyzék	106
10. Saját publikációk jegyzéke	130
10.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények	130
10.2. A disszertáció témájával kapcsolódó előadások jegyzéke	130
10.3. A disszertáció témájával nem kapcsolatos előadások jegyzéke	131
11. Köszönetnyilvánítás.....	133

Rövidítésjegyzék

3GCR- third-generation cephalosporin-resistant (harmadik generációs cefalosporin rezisztens)

16S rRNS-16S riboszomális RNS

AAC- aminoglikozid-acetil-transzferáz

AMR- antimikrobiális rezisztencia

ANT- aminoglikozid nukleotidil-transzferáz

APH- aminoglikozid foszfortranszferáz

DAEC- diffúz módon addheráló *E. coli*

DALY- disability-adjusted life year (rokkantsággal korrigált elveszített életévek)

DDST- double disc synergy test (kétkorong szinergizmus teszt)

CC- clonal complex (klonális komplex)

CDC- Centers for Disease Control and Prevention (Betegségmegelőzési és Járványügyi Központ)

CGE- Center for Genomic Epidemiology (Genomikai Epidemiológiai Központ)

CRE- karbapenem rezisztens Enterobacteriaceae

CT- cluster type (klaszter típus)

E. coli- *Escherichia coli*

EARS-Net- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (Európai Antimikrobiális Rezisztencia Surveillance Hálózat)

EAEC- Enteroaggregatív *E. coli*

EHEC- Enterohemorragiás *E. coli*

EIEC- Enteroinvazív *E. coli*

EPEC- Enteropathogén *E. coli*

ESBL- Extended-spectrum beta-lactamase (kiterjedt-spektrumú β -laktamáz)

ETEC- Enterotoxin termelő *E. coli*

ExPEC- Extraintestinal pathogenic *E. coli* (extraintestinális patogén *E. coli*)

FQ- fluorokinolon

gDNS- genomális DNS

HUS -hemolitikus urémiás szindróma

IMP- imipenemase (imipenemáz)

Inc- inkompatibilitási csoport

IS- inszerciós szekvencia/elem

IR- inverted-repeat (fordított ismétlődő szakaszok)

KPC- *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemáz)

LPS- lipopoliszacharid

LT- hőlabilis exotoxin

MALDI-TOF MS- mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció, repülési idő mérésen alapuló tömegspektrometria

NDM- New-Delhi metallo- β -lactamase (New-Delhi metallo- β -laktamáz)

MDR- multidrog-rezisztens

MGE- mobilis genetikai elem

MIC- minimális inhibitor koncentráció

MLEE- multilokusz enzim elektroforézis

MLST- multilokusz szekvencia tipizálás

MNEC- Meningitis-associated *E. coli* (agyhártyagyulladást okozó *E. coli*)

NNGYK- Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központ

NRL- Egészségügyi ellátással összefüggő fertőzések és antibiotikum rezisztencia Nemzeti Referencia Laboratóriuma

PFGE- pulsed field gel electrophoresis (pulzátatott mezejű gélelektroforézis)

pMLST- plazmid multilokusz szekvencia tipizálás

PMQR- plazmid által közvetített kinolon rezisztencia

PCR- polimerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

PT- pulzotípus

QRDR- quinolone resistance determining region (kinolon rezisztenciát meghatározó régió)

SNP- single nucleotide polymorphism (egyponyos nukleotid polimorfizmus)

ST- szekvencia típus

STEC- Shiga-toxin termelő *E. coli*

TnP- transzpozáz

UPEC- uropatogén *E. coli*

VIM- Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (Verona-integron-kódolt metallo- β -laktamáz)

VTEC- Verotoxint termelő *E. coli*

WGS- whole genome sequencing (teljes genom szekvenálás)

1. Bevezetés

Az antibiotikum rezisztencia komoly veszélyt jelent a globális közegészségügyre. Az antibiotikum rezisztens baktériumok terjedését az antimikrobiális szerek nem megfelelő és túlzott használata, valamint az infekciókontroll szabályok nem megfelelő betartása okozza. Az antimikrobiális szerekkel szemben rezisztens kórokozók növekvő száma, különösen a multidrog-rezisztens (MDR) organizmusok által okozott fertőzések, jelentős betegségterhet (magas morbiditási és mortalitási arányokat) jelentenek, súlyosan terhelik az egészségügyi rendszereket, és e fertőzések kezelésére és megelőzésére irányuló intézkedések globális gazdasági költségei is jelentősek. A MDR okozta fertőzésekért főként az ESKAPE patogének felelősek. Az ESKAPE egy mozaikszó, amely az *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, és *Enterobacter* spp fajokat foglalja magában. Ezek a kórokozók arról ismertek, hogy képesek "megszökni" az antimikrobiális szerek hatása elől. Néha az ESKAPEE-re bővítik, amibe beletartozik az *Escherichia coli* is. Közös jellemzőik közé tartozik a modern egészségügyi környezetben való túléléshez való alkalmazkodás, a rezisztencia determinánsok megszerzésének változatos módszerei és a sikeres, nagy kockázatú klónok világméretű elterjedése. Az ESKAPEE kórokozók a kórházi húgyúti-, véráram-, enterális-, műtéti-, seb-, valamint az alsólégúti fertőzésekért (pl. tüdőgyulladásért) felelősek. Ezen kórokozók jelenléte ráirányította a figyelmet az új antimikrobiális terápiák kifejlesztésének szükségességére, a jobb betegellátás fontosságára, és felhívta a figyelmet az antibiotikum-stewardship jelentőségére (1–3). A legnagyobb betegségterhet ezek közül is a multirezisztens *E. coli* okozta fertőzések jelentik (4). Ezek magyarországi helyzetével foglalkozik a doktori értekezésem.

1.1. *Escherichia coli* általános bemutatása

Az *Escherichia coli* (*E. coli*) az Enterobacteriaceae család, *Escherichia* genus leggyakoribb tagja, illetve egy klinikailag is jelentős humán patogén. Fakultatív anaerob Gram-negatív baktérium, amelyek pálca alakú sejtjei nem képeznek spórát. Egyszerű (pl. nutrient) táptalajokon is tenyésztethető baktérium. Fajszerint elkülöníthető biokémiai

tulajdonságai alapján: glükóz-, laktóz-, indol-pozitív, míg kén-hidrogén és ureáz-negatív. Továbbá szerotípusokba osztható a lipopoliszacharid O-, tok K-, csilló H-antigén szerkezete alapján (5,6).

Az *E. coli* számos állatfaj (főként emlősök) és az emberi gasztrointestinális traktus normál bélmikrobiótájának tagja. Általában a születést követő néhány órán belül megtelepszik a csecsemők bélrendszerében. Ezt követően kialakul az *E. coli* és a gazdaszervezet között egy kölcsönösen előnyös szimbiotikus kapcsolat. Ily módon a kommenzalista *E. coli* tápanyagot szerez a gazdaszervezettől, miközben tápanyagokat (pl: K12 vitamint) termel és a gyors osztódásával kiszorítja az egyéb baktériumokat, amelyek potenciális kórokozók lehetnek. Azonban pl. a bél traktus falának sérülésekor kijuthat a peritoneális részbe az *E. coli* és fertőzést okozhat (7).

1.2. *Escherichia coli* csoportosítása az általuk okozott humán megbetegedések alapján

Az *E. coli* törzsek széles genom plaszticitással rendelkeznek és különböző mobilis genetikai elemeken keresztül felvehetnek speciális virulencia faktorokat. A virulencia faktorok a megszokottól eltérő környezetbe engednek bejutást és elterjedést, ami végül különféle szervek megbetegedéséhez vezet. Lokalizációtól függően intestinális és extraintestinális fertőzéseket okozhat. A humán-asszociált *E. coli*-t három patotípusba lehet sorolni: 1, kommenzalista *E. coli*; 2, intestinális *E. coli*, ami bizonyos körülmények között képes fertőzést okozni a bélben és különböző típusú hasmenéses megbetegedéseket okozhat; 3. extraintestinális patogén *E. coli* (ExPEC), ami extraintestinális megbetegedéseket okozhat: ilyen a véráramfertőzés, húgyúti fertőzés, tüdőgyulladás és újszülött kori meningitis (5,7,8).

Az intestinális fertőzéseket okozó *E. coli* hat kategóriáját különböztetik meg a betegség patomechanizmus és virulencia faktorok alapján. Az enterotoxin termelő *E. coli* (ETEC), amely vizes, nem véres hasmenést okoz. A fejlődő országokban az „utazók hasmenését” okozó bakteriális hasmenés egyik kiváltó oka. A baktérium megtapad a vékonybél nyálkahártyáján a felszínin fimbriák segítségével, és a *Vibrio cholerae*-hoz hasonló hőstabil (*LT*) és hőstabil (*ST*) exotoxinokat termel, amelyek az eukarióta sejtbe jutva Cl^- szekréciót stimulál és gátolja a $NaCl$ abszorpciót a bélből, ezzel hasmenést

okozva (9,10). Az enteropathogén *E. coli* (EPEC) fertőzésekre a hányással járó vizes hasmenés a jellemző. A fejlett országokban már kevésbé, de fejlődő országokban még mindig jelen levő csecsemők hasmenésének gyakori kiváltó oka. A vékonybél hámsejtek felszínén megtapadva effektor adhézión fehérjét (pl. intimin) juttat a gazdasejtbe, ami aktin citoszkeletális átrendeződést indukál, elpusztítja a microvillusokat és egy kiemelkedő képletet hoz létre, amihez a baktérium sejtek megtapadnak. A mikrovillusok felületének csökkenése gátolja tápanyagok felszívódását, hasmenést és gyulladást okozva (9,10). Az enteroaggregatív *E. coli* (EAEC) fertőzések gyermekek és felnőttek körében gyakran tartós nyákos hasmenését eredményezi (9,10). A törzsek nem alkotnak homogén csoportot, közös jellemzőjük, hogy HEp-2 sejtenyészetben (virologiai és mikrobiológiai kutatásokban használt humán laryngeális karcinóma sejtvonal) a sejtekhez autoaggregatív mintázatban tapadnak ("téglarakás" formájában). A baktérium aggregatív adhézióval kapcsolódik a vékony- és vastagbél hámsejtjeihez és biofilmet alakítanak ki. A baktérium azután enterotoxinokat termel (Pet-toxint és az EAST1 toxint), amelyek fokozzák a folyadék és elektrolit szekréciót a bélben és hasmenést okoz, illetve IL-8 felszabadulás hatására a neutrofil granulociták migrációja is további szöveti károsodáshoz vezet (9,10). A Shiga-toxin termelő *E. coli* (STEC) törzsek véres hasmenést (haemorrhagiás colitis), nem véres hasmenést és hemolitikus urémiás szindrómát (HUS) okoznak. Ebbe a csoportba a Shiga-toxint termelő *E. coli* (STEC)/ verotoxint termelő *E. coli* (VTEC)/ enterohemorrhagiás *E. coli* (EHEC) (9,10). A baktérium adhezív fehérjék (pl. intimin) segítségével tapad a bélhámsejtek felszínéhez és endocitózissal bekerül a sejtbe. A Shiga-toxin-1 és Shiga-toxin-2 (*stx-1* és *stx-2*) a riboszomális funkciókat gátolja, ami sejthalált és súlyos gyulladásos reakciót vált ki a bélben, ami károsítja a nyálkahártyát, vérzést és hasmenést okoz. A Shiga-toxinok szisztémásan is terjedhetnek, és különböző szervek károsodását okozhatják, például a vesékben a hemolitikus urémiás szindrómát (HUS). Az enteroinvazív *E. coli* (EIEC) fertőzésre vizes hasmenés, ritkábban véres hasmenés jellemző hasi görcsökkel (9,10). Az EIEC törzsek genetikailag szoros rokonságban állnak a *Shigella* spp. fajokkal. A baktériumok invazinokkal kerülnek be vastagbél epithelsejtbe, majd a citoplazmában szaporodnak, és az aktin segítségével mozognak, áthatolva a szomszédos sejtekbe. A baktériumok gyulladást és sejtkárosodást okoznak, és enterotoxinokat termelhetnek, ami hasmenést, hasi fájdalmat és dysenteriát eredményez. A diffúz módon adheráló *E. coli* (DAEC) különösen a 12 éven aluli gyermekeknél

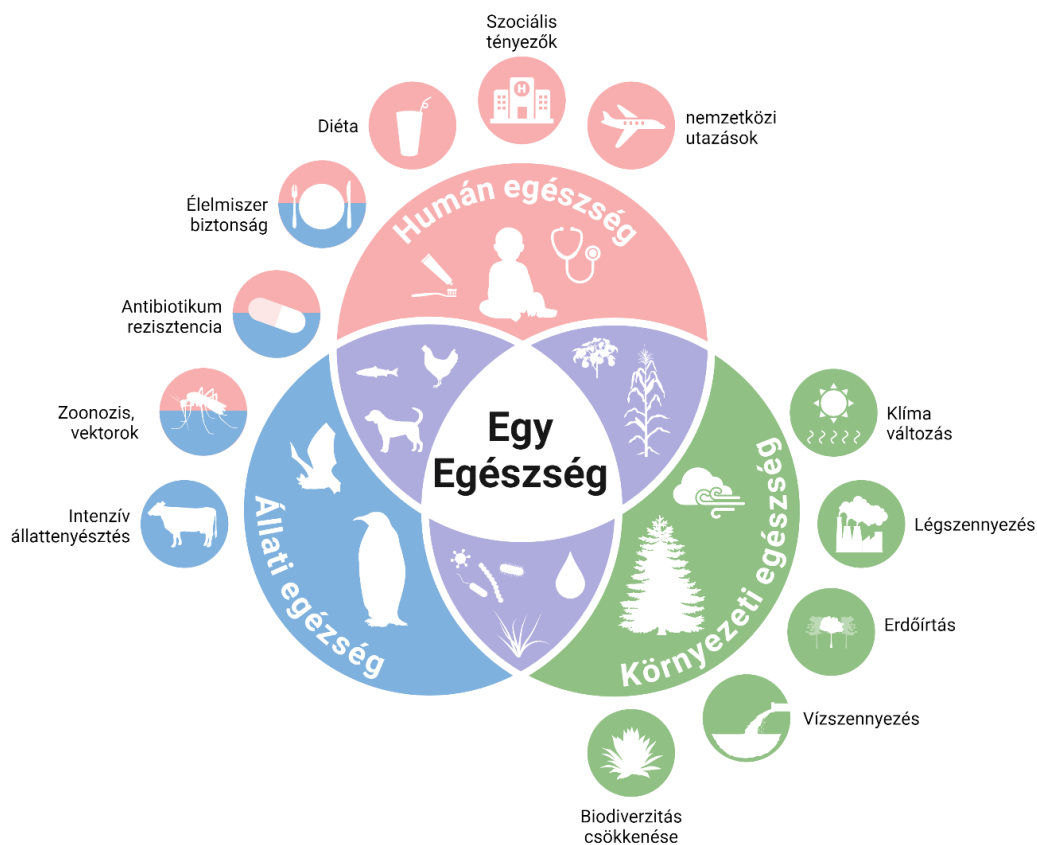
indukál vizes hasmenést. A DAEC törzsek a HEp-2 sejtekhez diffúz, aggregatív mintázatban tapadnak. A patomechanizmus multifaktoriális. A baktériumok jelenléte gyulladásos választ vált ki, amely károsítja a bélhámsejteket, és hozzájárul a hasmenés kialakulásához (8–11).

Az ExPEC törzsek jellemzően a kommenzalista mikrobióta mellett kolonizálja a béltraktust, és a bél környezetéből kikerülve, extraintestinálisan terjednek és okoznak megbetegedéseket. Az ExPEC izolátumok jelentős genom diverzitást mutatnak, és a virulenciához kapcsolódó faktorok széles skálájával rendelkeznek, beleértve a toxinokat, adhezineket, invazinokat, szideroforokat, amelyeket gyakran patogenitási szigeteken vagy más mobilis genetikai elemeken találhatók meg. Az autogén húgyúti fertőzések gyakori patogénje az uropatogén *E. coli* (UPEC), amely a bélből kikerülve a periurethralis területet kolonizálja, és a húgycsőön felfelé haladva eljut a húgyhólyagig. A kolonizációt és gyulladást speciális adhezinek és fimbriák (pl. P pili és S pili), biofilmképzése és toxintermelés (pl. hemolysin) segítik elő. A húgyvezetéseken keresztül a vesébe juthat a patogén bizonyos esetekben pedig bejuthat a véráramba és bakterémiát (szepszist) okoz. A bakterémia során különböző szervi fertőzésekből (húgyúti, sebfertőzés, prosztatata, epehólyag gyulladás stb.) kiindulva kerül a baktérium a véráramba. Az újszülöttkori meningitisek egyik gyakori kórokozója a K1 antigénnel rendelkező agyhártyagyulladást okozó *E. coli* (MNEC). Ezek az MNEC baktériumok a vérből a vér-agy gát károsodása nélkül képesek bejutni a központi idegrendszerbe (8,9,11).

Az ExPEC törzsek számos humán fertőzésért felelősek, és a normális immunrendszerrel rendelkező betegeket, valamint a már meglévő betegségben szenvedőket is érinti. A széles genom plaszticitásának köszönhetően alkalmazkodni tudnak a különböző környezeti hatásokhoz, ezért a patogén törzseik képesek fennmaradni mind az egészségügyi ellátással összefüggő, mind a közösségi környezetben is. Az *E. coli* asszociált fertőzések globális problémát jelentenek, amelyek jelentős morbiditással és mortalitással járnak (4).

1.3. Az Egy Egészség (One Health) megközelítés

Az „Egy Egészség” megközelítés kiemelten fontos az *E. coli* fertőzések megelőzésében és kezelésében. Ez az integrált megközelítés egy egységgé kapcsolja össze az emberek, az állatok és a környezet egészségét, és elősegíti a különböző ágazatok (pl. gyógyszeripar, élelmiszeripar és szennyvíztisztító telep) közötti együttműködést (1. ábra). Az Egy Egészség megközelítésnek az egyik fontos célja az antibiotikum rezisztencia kezelése, az egészségügyi ellátórendszerek erősítése és a fenntartható mezőgazdasági gyakorlatok elősegítése, miközben csökkenti a betegségek terjedésének kockázatait (12). Az állati aspektusból tekintve a zoonotikus kórokozók áterjedhetnek az állatokból az emberekre, ezek közé tartozik a melegvérű állatok bélrendszerében tartózkodó intestinális *E. coli*. A különböző törzsek közül kiemelkedő szerepet játszik az enterohemorragiás, elsősorban szarvasmarhákból származó *E. coli* (EHEC), különösen az *E. coli* O157 (13). Az extraintestinalis *E. coli* esetében az antibiotikum rezisztencia problémája az állatok és az emberek jólétét is érintheti, különösen, ha az emberi és az állati mikrobiomban hasonló rezisztencia gének találhatók (14). Bár ritka az antibiotikum rezisztencia közvetlen átadása fajok között (15), ez a folyamat specifikus klónokhoz köthető, amelyek különböző gazdaszervezeteket fertőznek és kolonizálnak (16). Az emberek és az állatok körében egyre nő az *E. coli* fertőzések gyakorisága, különösen a fejlődő országokban, ahol gyakoriak a szennyezett élelmiszerek és ivóvíz okozta problémák (17). Az utazók is veszélyeztethetik magukat az MDR *E. coli* fertőzésekkel, ha nem megfelelő élelmiszereket vagy vizet fogyasztanak, vagy más emberekkel érintkeznek (18). Az egy egészség megközelítés globális értékelése segítené az antibiotikum rezisztencia megelőzését a tudatossági programok, az antibiotikum használatával kapcsolatos oktatás, a politikai elkötelezettséggel járó érdekérvényesítés és az antibiotikum-stewardship révén (19).



1. ábra: Egy Egészség (Delrose, N. (2024) BioRender alapján módosítva (20))

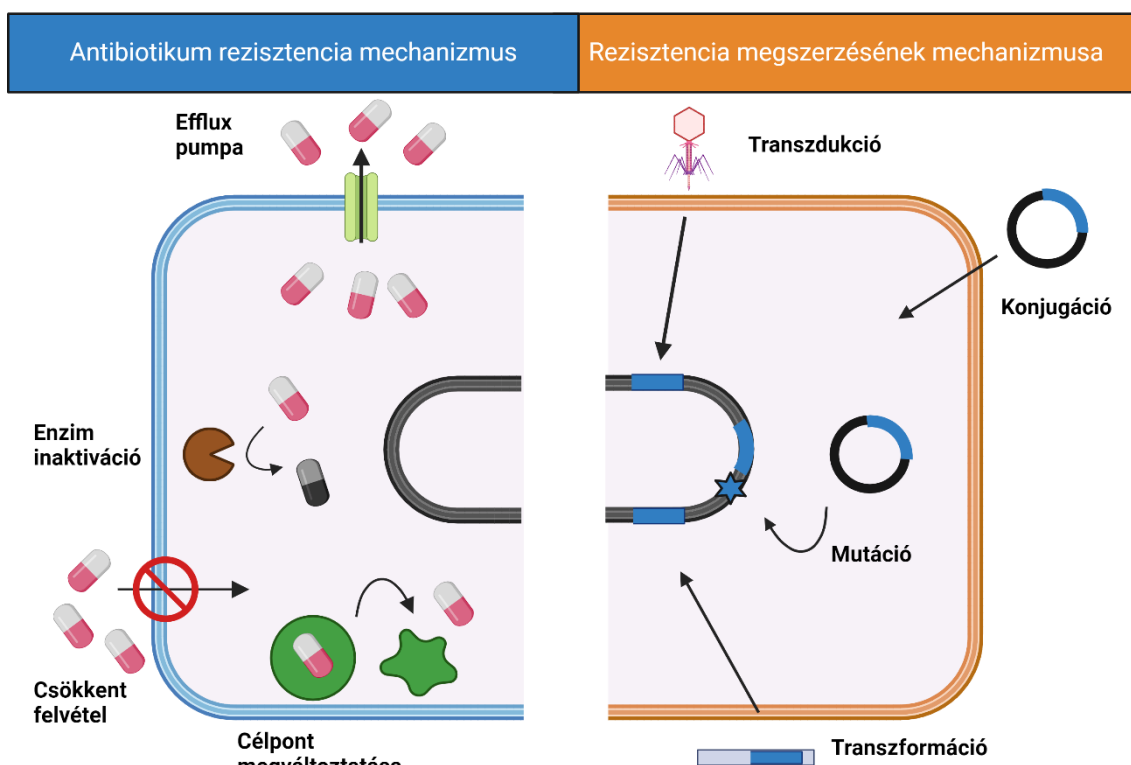
1.4. ExPEC okozta fertőzések kezelésére alkalmas antibiotikumokkal szembeni rezisztencia

Az ExPEC fertőzések kezelése kihívást jelent a közegészségügy számára, különösen a növekvő antibiotikum rezisztencia miatt. Az antibiotikum rezisztencia további szelekciójának megelőzése érdekében célzottan ismernünk kell az izolátumok antibiotikum érzékenységét. Az ExPEC fertőzések kezelésére leggyakrabban alkalmazott három antibiotikum csoportba tartoznak a β -laktám antibiotikumok (aminopenicillinek (pl. ampicillin, amoxicillin), β -laktamáz-gátló kombinációk (pl. amoxicillin/klavulánsav, ampicillin/szulbaktám, piperacillin/tazobaktám, ticarcillin/klavulánsav), 1. generációs cefalosporinok (pl. cefazolin), 2. generációs cefalosporinok (pl. cefotetan, cefuroxim, cefoxitin), 3. generációs cefalosporinok (pl. cefotaxim, ceftriaxon, ceftazidim), 4. generációs cefalosporinok (pl. cefepim) és karbapenemek (pl. ertapenem, imipenem,

meropenem), monobaktám (pl. aztreonam) (21), illetve a fluorokinolonok (pl. ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin) és az aminoglikozidok (pl. amikacin, gentamicin, tobramycin) (21). A komplikált és súlyos ExPEC fertőzések és egyéb multirezisztens, különösen karbapenem rezisztens Gram-negatív baktériumok által okozott fertőzések esetén alkalmazhatóak a β -laktamáz inhibitorral kombinált karbapenemek (pl. meropenem/vaborbactam és imipenem/relebactam), cefalosporinhoz kombinált β -laktamáz gátlók (pl. ceftazidim/avibactam), a sziderofór cefalosporinokhoz tartozó cefiderocol és a polymyxinekhez tartozó colistin (22). Ezekre az antibiotikumokra az *E. coli* izolátumok alapvetően érzékenyek (23). Az ismételt vagy hosszú távú antibiotikum expozíció azonban ahhoz vezethet, hogy a baktérium olyan génekre tesz szert, amelyek lehetővé teszik, hogy mutációk vagy horizontális géntranszfer révén kevésbé érzékennyé vagy rezisztenssé váljon az antibiotikumokkal szemben (24).

1.4.1. Fontosabb antibiotikum rezisztencia mechanizmusok

Az ExPEC baktériumok a következő főbb antibiotikum rezisztencia mechanizmusokkal rendelkezhetnek (2. ábra): 1, antibiotikum lebontása enzim termelése által; 2, enzim termelése az antibiotikum kémiai módosítására (pl. acetilálás, foszforilálás); 3, antibiotikumok aktív eltávolítása a baktériumsejtből efflux pumpák által; 4, antibiotikum célpontjának megváltoztatása (pl. metilálás); 5. Sejtfal átteresztő képességének csökkenése (pl. porin változás) (25).



2. ábra: Antibiotikum rezisztencia mechanizmusok (Álvarez-Martínez és mtsai. alapján BioRender.com segítségével létrehozva (26))

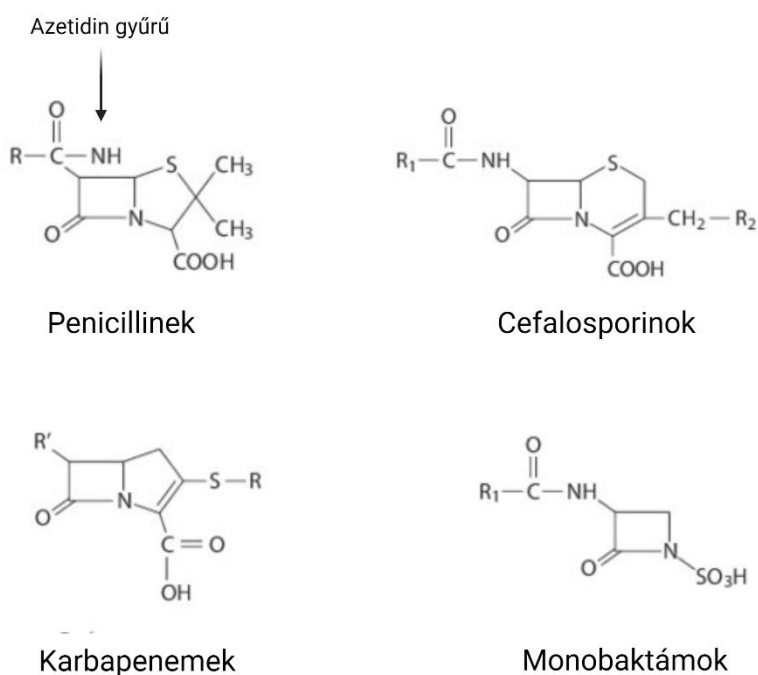
A szerzett rezisztencia kialakulhat a baktérium genetikai variabilitása miatt: kromoszómális mutáció az antibiotikumok célpontját kódoló génjeiben, vagy horizontális géntranszfer révén, amikor a különböző gének terjednek baktérium fajon belül, illetve fajok között. A túlzott vagy helytelen antibiotikum használat gyakran elősegíti az ellenálló baktériumok szelekcióját, és lehetővé teszi a baktériumok számára, hogy túléljenek és szaporodjanak az antibiotikumok jelenlétében. Továbbá nem elhanyagolható a kórházi környezet maga sem, mivel a különböző beavatkozások (katéter, lélegeztetés, műtéti eljárások), illetve a nem megfelelő infekciókontroll gyakorlat megnövelik a betegek fertőzési kockázatát (27). Az ilyen esetekben kialakulhatnak multidrog-rezisztens baktériumok. Az MDR esetében a baktérium elveszíti a fogékonyságát legalább három terápiás szempontból alkalmazható antibiotikumcsoport egy-egy tagjával szemben (24).

A multidrog-rezisztencia jelentős egészségügyi kihívást jelent, mivel megnehezíti a fertőzések kezelését, növeli a súlyos betegségek és szövődmények kockázatát, és hozzájárulnak a kórházi fertőzések és járványok számának növekedéséhez. Ennek

következményei közé tartozhatnak a magasabb kezelési költségek, a megnövekedett kórházi tartózkodás, valamint a magasabb betegség- és halálozási arányok (4,25).

1.4.2. A β -laktám antibiotikumokkal szembeni rezisztencia

A β -laktámok a baktériumok sejtfalának bioszintézisét gátolják, a peptidoglikán prekursorok transzpeptidációjának gátlásával. A közös jellemzőjük a négytagú β -laktám (azetidin-2-on) gyűrű (3. ábra). Az *E. coli* leggyakoribb és legjelentősebb β -laktám rezisztencia mechanizmusa a béta-laktamáz enzimek termelése, amelyek hidrolizálják a β -laktám antibiotikumok azetidin-2-on gyűrűjét, ami hatástalan vegyületeket eredményez (28,29).



3. ábra: A béta-laktám molekulák kémiai szerkezete (forrás: Patriarca és mtsai. alapján átdolgozva (28))

A β -laktamázokat az Ambler-féle molekuláris szerkezetük és a Bush-Jacoby-Medeiros funkcionális jellemzőik alapján osztályozhatóak. Az Ambler-osztályozásban a β -laktamázokat négy osztályba sorolják: A, B, C és D, a fehérjemolekulák elsődleges

aminosav szekvenciái és a szerkezeti motívumok alapján. Az A, C és D osztályú β -laktamázok aktív centrumában egy szerin található, míg a B osztályú β -laktamázoknál cink ion. A Bush-Jacoby-Medeiros funkcionális osztályozásban a β -laktamázokat az 1-től 4-ig terjedő csoportokba sorolják a β -laktám szubsztrát-specifititás és az inhibitorok alapján (29) (1. táblázat). Az első csoportba cefalosporinázok (AmpC típusú β -laktamázok) tartoznak, amelyek nem gátolhatók klavulánsavval. A második csoportba penicillinázok, cefalosporinázok (szerin típusú β -laktamázok), amelyek klavulánsavval, tazobaktámmal és szulbaktámmal gátolhatóak. A harmadik csoportba tartoznak a metallo- β -laktamázok, amelyek nem gátolhatók klavulánsavval, tazobaktámmal vagy szulbaktámmal, de működésüket gátolják a kelátor molekulák (pl. dipikolinsav, etiléndiamin-tetraecetsav (EDTA)). A negyedik csoportba azok a penicillinázok tartoznak, melyek nem gátolhatók klavulánsavval. A szubsztrátspecifititás alapján négy funkcionális csoportosítás létezik: szűk spektrumú β -laktamáz, széles spektrumú β -laktamáz, kiterjedt spektrumú β -laktamáz, karbapenemázok. Az *E. coli* törzsek kódolhatnak olyan szűk spektrumú β -laktamáz enzimeket, amelyek képesek inaktiválni a penicillineket és az aminopenicillineket. A penicillin + enzimgátló kombinációk hatásosak ellenük (pl. amoxicillin+klavulánsav). A kiterjedt-spektrumú β -laktamáz (ESBL) enzimek hidrolizálják a legtöbb penicillint és az oxyimino oldalláncal rendelkező cefalosporinokat (harmadik és negyedik generációs cefalosporinok), monobaktámok (pl. aztreonam) aktivitását, de a karbapenemek még hatásosak maradnak az ESBL termelő törzsekkel szemben, és a klavulánsav, tazobaktám és szulbaktám klasszikus gátlószerek is gátolják a működésüket. Az ESBL-ek többnyire az Ambler-féle A osztályba és a Bush és Jacoby által a β -laktamázok frissített funkcionális osztályozása szerint a 2be csoportba tartoznak (25,29,30).

Az ExPEC törzsekben jelen lévő ESBL enzimek közé tartozik a TEM, az SHV és a leggyakoribb CTX-M (31,32). A CTX-M-ek kiterjedt spektrumú β -laktamázok, amelyek a *Kluyvera* sp. kromoszómálisan kódolt β -laktamázaiból származnak. Szekvencia homológia alapján öt fő csoportba lehet sorolni: CTX-M-1 csoport, CTX-M-2 csoport, CTX-M-8 csoport, CTX-M-9 csoport, CTX-M-25 csoport. Az enzimekért felelős géneket a baktérium ritkábban kromoszómába integrálódva, de főleg plazmidon kódolja, utóbbi esetén horizontális géntranszfer során képes megszerezni további antibiotikum rezisztencia géneket (33). Emellett CTX-M-et termelő izolátumok számának

növekedéséhez hozzájárult a CTX-M-hez társuló rezisztenciák előfordulása, különösen az aminoglikozidokkal és a fluorokinolonokkal szembeni rezisztencia megjelenéséhez, ami hozzájárulhat az adott antibiotikumokkal szembeni rezisztencia együttes szelekciós folyamatához (33,34).

1. táblázat: A β -laktamázok osztályozása (Bush és mtsai. alapján (35)). A + és - szimbólum jelöli azt, hogy a csoport gátolható vagy nem gátolható, míg a $\pm$ pedig azt jelöli, hogy a gátlószer nem gátolja a csoport összes tagját.

Bush-Jacoby Medeiros csoportok	Amble-féle molekuláris osztály	Elsődleges szubsztrát	Gátlóanyag		Jellemző enzimek (példák)
			Klavulán-sav	EDTA	
1	C	cefalosporinok	-	-	AmpC-típusú β -laktamázok
2a	A	penicillinek	+	-	Gram-pozitív baktériumok penicillinázai
2b	A	penicillinek, cefalosporinok	+	-	SHV-1, TEM-1, TEM-2
2be	A	penicillinek, szűk spektrumú és széles-spektrumú cefalosporinok, monobaktámok	+	-	TEM-3-26, SHV-2-6, CTX-M, K1 (<i>K. oxytoca</i>)
2br	A	penicillinek	$\pm$	-	TEM-30-36
2c	A	penicillinek, carbenicillin	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	penicillinek, cloxacillin	$\pm$	-	OXA-1-11, PSE-2
2e	A	cefalosporinok	+	-	indukálható cefalosporináz (<i>Proteus vulgaris</i>)
2f	A	penicillinek, cefalosporinok, karbapenemek	+	-	NMC (<i>E. cloacae</i>), SME-1 (<i>Serratia marcescens</i>)
3	B	legtöbb béta-laktám antibiotikum (kivéve monobaktámok)	-	+	IMP, VIM, NDM metallo- β -laktamázok, L1 (<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>), CcrA (<i>Bacteroides fragilis</i>)
4	nincs meghatározva	penicillinek	-	?	penicillináz (<i>Burkholderia cepacia</i>)

Az eredeti CTX-M-ek cefotaximázok, amelyek általában a cefotaximot jobban hidrolizálják, mint a ceftazidimet. A pontmutációk azonban kiterjeszthetik szubsztrátspektrumukat a ceftazidimre is. Ez igaz a CTX-M-15 és a CTX-M-27-re, amelyek egyetlen Asp240Gly szubsztitúcióval különböznek a CTX-M-3-tól, illetve a CTX-M-14-től (32,36,37). Világszerte a humán eredetű B2 filogenetikai csoportba tartozó *E. coli* izolátumokban a *bla*_{CTX-M-15} (CTX-M-1-csoport) a leggyakoribb ESBL gén, amely főként a pandémiás O25-*E. coli* ST131 klónhoz kapcsolódik (25,30). Ázsiában a *bla*_{CTX-M-15} mellett *bla*_{CTX-M-14} és *bla*_{CTX-M-27} (mindkettő CTX-M-9 csoportú) vált dominánsá (38,39).

Az *E. coli* izolátumokban kromoszómálisan kódolt AmpC- típusú β -laktamáz gén is megtalálható (40). A vad típusú *E. coli* AmpC-je nem indukálható, konstitutívan, alacsony szinten fejeződik ki, ezért az izolátum érzékeny marad még az aminopenicillinek iránt is. Az *E. coli*-ban a kromoszómális AmpC-t kódoló gén promóter és attenuátor régióiban bekövetkező mutációk a AmpC-túltermelését okozhatják (derepresszált mutáns), ami cefalosporinokkal szembeni rezisztenciához vezethet. Emellett plazmidon kódolt AmpC gének megszerzésével is kialakulhat cefalosporin rezisztencia. A plazmidon kódolt AmpC gének a legtöbb esetben konstitutívan fejeződnek ki. Néhány plazmidon hordozott AmpC gén, mint például a DHA-1 gén, azonban β -laktámokkal indukálható, és az expressziójuk az indukálható kromoszómális AmpC génekéhez hasonlóan szabályozott. Az *E. coli* törzsek közül a gyakori plazmid mediált AmpC a CMY-2 típus (34,41).

A legnagyobb klinikai problémát a karbapenemázok okozzák, amelyek hidrolizálják az eddig felsorolt penicillineket, a cefalosporinokat (kivéve OXA-48-szerű típusúak) és már a karbapenemeket is. A karbapenemázok egyik csoportja, a metallo- β -laktamázok nem képesek a monobaktámokat hidrolizálni. A globálisan elterjedt karbapenemázok közé tartoznak a *Klebsiella pneumoniae* Karbapenemáz (KPC), New-Delhi metallo- β -laktamáz (NDM), Verona integron-kódolt metallo- β -laktamáz (VIM), imipenemáz (IMP) és OXA-48-szerű karbapenemázok, amelyeket a *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} és *bla*_{OXA-48-szerű} gének kódolnak (9,42).

A karbapenem antibiotikumokkal szembeni csökkent érzékenységet a karbapenemáz termelés mellett még egyéb tényező is kialakíthat. Ilyen az ESBL-termelés

és/vagy AmpC enzim termelés kapcsolódva pl. porin módosulás miatti csökkent permeabilitással. Mivel a karbapenemázok rendelkeznek a legszélesebb hatásspektrummal és a legnagyobb hatékonysággal a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok ellen, emiatt gyakran alkalmazzák őket utolsó vonalbeli antibiotikumként súlyos vagy MDR fertőzések esetén (43,44). A karbapenem rezisztens Enterobacteriaceae fertőzéseket nehéz kezelni, mivel rezisztensek az összes vagy csaknem az összes β -laktámmal szemben, ugyanakkor gyakran hordozzák a fluorokinolonokkal és/vagy aminoglikozidokkal szembeni rezisztencia mechanizmusokat kódoló géneket is. A kezelési lehetőségek korlátozott elérhetősége miatt magas halálozással járnak (43,44).

1.4.3. Fluorokinolon antibiotikumokkal szembeni rezisztencia

A fluorokinolon (FQ) antimikrobiális vegyületek széles spektrumú szintetikus gyógyszerek, amelyeket az 1980-as években történt bevezetésük óta széles körben alkalmaznak a bakteriális fertőzések kezelésében (45). A fluorokinolon antibiotikumok gátolják két topoizomeráz enzim működését a DNS-replikáció során; DNS-girázét, amely negatív szupertekercseket hoz létre, és a topoizomeráz IV-et, amely relaxálja a DNS-t. A FQ szembeni rezisztencia kialakulása azonban, különösen a Gram-negatív mikroorganizmusok esetében, megnehezíti a fertőzések kezelését (46). A DNS topoizomeráz II-t (DNS-gyráz) és a topoizomeráz IV enzimeket kódoló gének (*gyrA*, *gyrB*, *parC* és *parE*) esetén bekövetkező mutációs változások rezisztenciát alakítanak ki. A kinolonrezisztenciát meghatározó régiók (QRDR) olyan specifikus szakaszai a bakteriális DNS-nek, ahol mutációk bekövetkezése kinolonokkal szembeni rezisztenciát eredményezhet. Az FQ rezisztens *E. coli* izolátumokban a szubsztitúciós mutációk leggyakrabban a DNS-giráz *gyrA* alegységének Ser83Leu és/vagy Asp87 (D87N) aminosavpozíciójában, illetve a topoizomeráz IV *parC* alegységének Ser80Ile és Glu84 (E84V) aminosavnál fordulnak elő (47). Ezek a mutációk megváltoztatják az enzimek aktív helyeit, csökkentve a fluorokinolonok kötődését, és ezáltal rezisztenciát eredményeznek. A kromoszómális gének mutációja mellett egyéb mechanizmusok is hozzájárulhatnak a rezisztencia kialakulásához. A membránhoz kötött porin csökkent expressziója (*ompF*) okozza az antibiotikum korlátozott felvételét és a már felvett antibiotikum aktív kijuttatását az effluxpumpák (pl. *acrAB-tolC*) túlműködése

biztosíthatja (48). Egyre gyakrabban figyelhető meg a plazmid által közvetített kinolon rezisztencia (PMQR) is, amelyek kódolásáért az *oqxA*, *oqxB* és *qepA* efflux pumpát kódoló gének, *qnr* gének és az aminoglikozid acetiltranszferáz *aac(6')-Ib-cr* variánsa felelős (48–50). A *qnr* fehérjék hozzákötődnek a DNS-giráz és topoizomeráz IV enzimekhez, megakadályozva, hogy a kinolon antibiotikumok (pl. ciprofloxacin) hozzákötődjenek az enzimekhez. Az *aac(6')-Ib-cr* enzim képes acetilálni a 6'-aminocsoportot a kinolon antibiotikumokban. Az acetilációs folyamat megváltoztatja a kinolon molekulák kötődési affinitását a bakteriális DNS-girázhoz és topoizomeráz IV-hez, így az antibiotikumok kevésbé képesek kötődni és inaktíválni ezeket az enzimeket (51). Általánosságban elmondható, hogy a *parC*, *parE* és a *gyrA* egyes módosulásai magas szintű fluorokinolon rezisztenciát eredményeznek, míg a *qnr* vagy az *aac(6')Ib-cr* enzimaktivitás hordozásával alacsony szintű rezisztencia alakul ki (51).

1.4.4. Aminoglikozid antibiotikumokkal szembeni rezisztencia

Az aminoglikozidok a bakteriális fehérjeszintézist gátolják azáltal, hogy a prokarióta 30S riboszómához kötődnek a 16S riboszomális RNS-en (16S rRNS) keresztül. Az aminoglikozid rezisztencia kialakulhat az antibiotikum felvételének csökkenésével, a kötőhely mutáció általi módosulásával, azonban a leggyakoribb rezisztencia mechanizmus *E. coli* esetében az aminoglikozid modifikáló enzimek termelése. Az aminoglikozid modifikáló enzimek közé tartoznak az aminoglikozid acetiltranszferázok (AAC), aminoglikozid foszfortranszferázok (APH) vagy aminoglikozid nukleotidil-transzferázok (ANT) (52). Ezek módosítják és inaktíválják az aminoglikozidokat, és ezáltal csökkentik hatékonyságukat. Az aminoglikozidok különböző szerkezeti elemekkel rendelkeznek, amelyek befolyásolják, hogyan kötődnek a baktériumok riboszómáihoz és hogyan inaktíválják a modifikáló enzimek. Ezek a szerkezeti különbségek azt jelentik, hogy a baktériumok egy adott típusú aminoglikozidra rezisztens lehetnek, míg egy másik típusú aminoglikozid még mindig hatékony lehet ellenük. Az APH(3')-I termelő törzsek rezisztenciát mutatnak kanamycin, neomycin szemben, és más aminoglikozidokkal, például gentamicinnel vagy tobramycinnel szemben nem mutatnak rezisztenciát. Az AAC(6')-I enzimet termelő izolátumok ezzel szemben gentamicin, tobramycin, amikacin, netilmicin, kanamicin és dibekacin

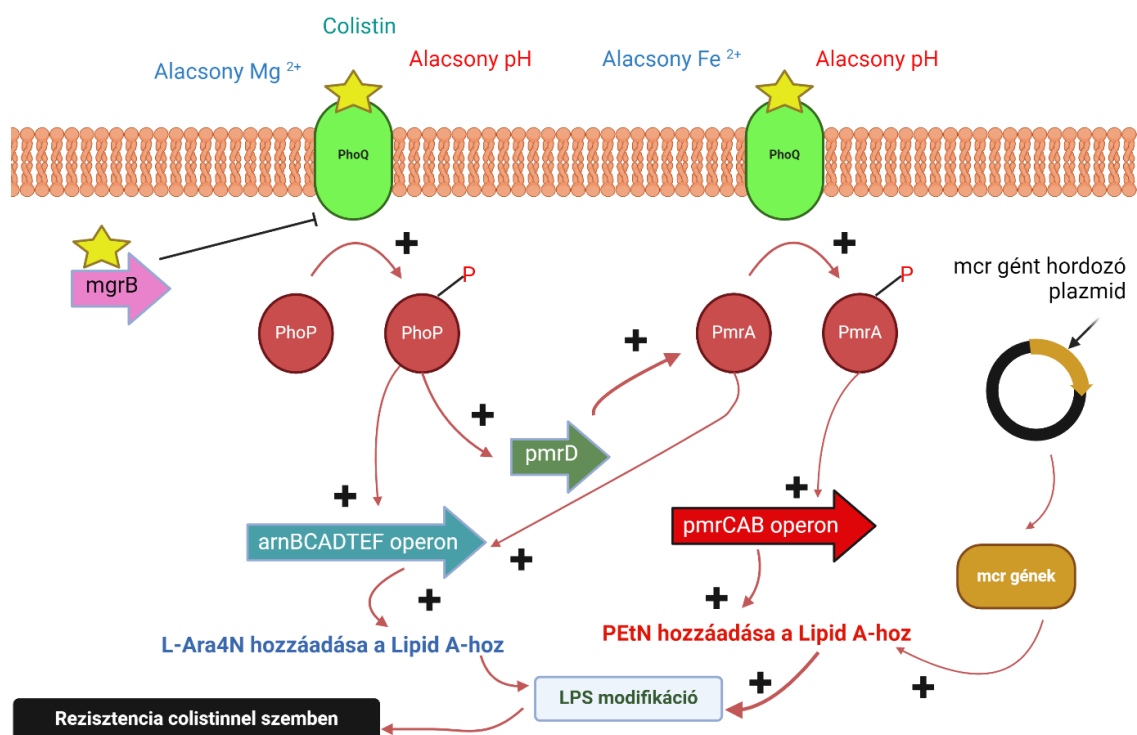
antibiotikum rezisztenciát mutathatnak. A 16S rRNS metiltranszferázok metilcsoportokat adnak hozzá a riboszóma 16S rRNS-éhez és megakadályozzák az aminoglikozidok kötődését a riboszómához. Legtöbbjük poszttranszkripcionálisan metilálja a 16S rRNS 1408-as pozíciójú adeninjét (A1408) és a 1405-ös guaninját (G1405), ami a gentamicinnel, tobramycinnel, amikacinnal és plazomicinnel szembeni magas szintű rezisztenciát eredményez (53). Ezek a metilációk az összes klinikailag releváns aminoglikoziddal szemben magas szintű rezisztenciát biztosítanak (54). ExPEC klónoknál előforduló horizontális géntranszferrel szerzett a metiltranszferázok közé tartozik az *armA* és a *rmtA-Z* gének (54,55).

Az aminoglikozid modifikáló enzimek és 16S rRNS metilázok gyakran kombinálódhatnak és mobilis genetikai elemek, például plazmidok, transzpozonok vagy integronok részei, amelyek képesek horizontális géntranszferrel terjednek. A különböző térségek aminoglikozid használatára vonatkozó adatok elemzése azt jelzi, hogy összefüggés van az antibiotikumok szelekciós nyomása és az aminoglikozid rezisztencia mechanizmusok kombinációinak mintái között (52,56). Számos olyan esetet írtak le, amikor aminoglikozid és β -laktám rezisztencia mechanizmusok együttesen fordultak elő (54,57,58). Egy Zürichi tanulmány szerint az aminoglikozid és β -laktám rezisztencia együttes előfordulása esetén az *aph(3')-Ia*, *aac(3)-II* és *aac(6')-Ib-cr* génekre voltak a leggyakoribbak, amelyek különböző típusú β -laktamázokhoz társultak (58).

1.4.5. Egyéb antibiotikumokkal szembeni rezisztencia

A polymyxin E, vagy colistin fontos szerepet tölt be a multirezisztens Gram-negatív baktériumok okozta fertőzések kezelésében, mivel célpontja és hatásmechanizmusa teljesen eltér más antibiotikum csoportokétól. A Gram-negatív baktériumoknál előforduló colistin rezisztencia fő mechanizmusa külső sejtmembrán lipopoliszacharidjának megváltozása (aminek hatására elektrosztatikusan taszítja a colistint), valamint az efflux pumpa túltermelés és a tokképződés. A colistin kötődése a lipopoliszacharidokhoz (LPS) destabilizálja és károsítja a baktérium külső membránját. A colistin a lipid A komponenshez kapcsolódik és a diaminovajsav (Dab) maradék és a lipid A régió foszfátcsoportjai elektrosztatikus kölcsönhatásba lépnek egymással,

kiszorítva a kétértékű kationokat (Ca^{2+} és Mg^{2+}) és sejtpusztulást idézve elő (59,60). A colistin rezisztencia és LPS módosítás több gén és operon kifejeződéséhez kapcsolódik (4. ábra). A *mgrB* mutáció a kétkomponensű PhoPQ működését stimulálja. A *PhoPQ* rendszer a *pmrD* kapcsolófehérjén keresztül fokozza a *pmrA-pmrB* működését. A *pmrA-pmrB* rendszer egyrészt fokozza az *arn* operon expresszióját (ami aktiválja a foszfoetanolamin (pEtN) addíciót), másrészt a *pmr* operon expresszióját (ami aktiválja a 4-amino-4- deoxi-L-arabinóz addíciót). Ezek a folyamatok a LPS módosulásához és végül a colistin rezisztenciához vezet (59,60).



4. ábra: A colistin rezisztencia mechanizmusai Gram-negatív baktériumokban (Mondal és mtsai. nyomán, BioRender.com segítségével létrehozva (59))

A *phoPQ* és a *pmrAB* két komponensű rendszerekben különböző változásokat azonosítottak klinikai és állati colistin rezisztens *E. coli* izolátumokban. A *pmrB*-ben a mutációk némelyikének a colistin rezisztenciára gyakorolt hatása nem biztos, hogy klinikailag releváns (60). Az irodalomban írtak már le olyan colistin érzékeny *E. coli* -t, amely *pmrB* (E123D) szubsztitúcióval rendelkezett (61). Az *mcr* géneknek eddig 10

változata (*mcrI-mcr10*) ismert, amelyek plazmidokban kódoltak és horizontálisan átvihetők. Ezek közül az *mcr-1* a gyakoribb (60,62,63).

A tigeziklin egy széles spektrumú glicilciklin antibiotikum (hasonló szerkezetű, mint a tetraciklinek), amelyet gyakran használnak multidrog-rezisztens baktériumok elleni küzdelemben. A tigeziklin a 30S riboszóma alegységhez kötődik, ami megakadályozza az aminoacil-tRNS bekötődését, ezáltal gátolva a peptidkötések kialakulását a fehérjeszintézis során. Az *E. coli* baktériumokban a tigeziklin rezisztencia efflux pumpák, különösen az *acrAB-tolC*, *oqxAB*, *adeABC9-11* efflux pumpa rendszer túlműködésével jár együtt. Eközben a *plsC*, *rpsJ*, *trm*, *tet(A)* és *tet(M)* mutációi szintén csökkentik a tigeziklin érzékenységet (64,65). A *Tet(X)*, a tetraciklin inaktiváló enzim *in vitro* aktivitását az összes tetraciklin szerű antibiotikum lebontásában igazolták, beleértve a tigeziklint is (66).

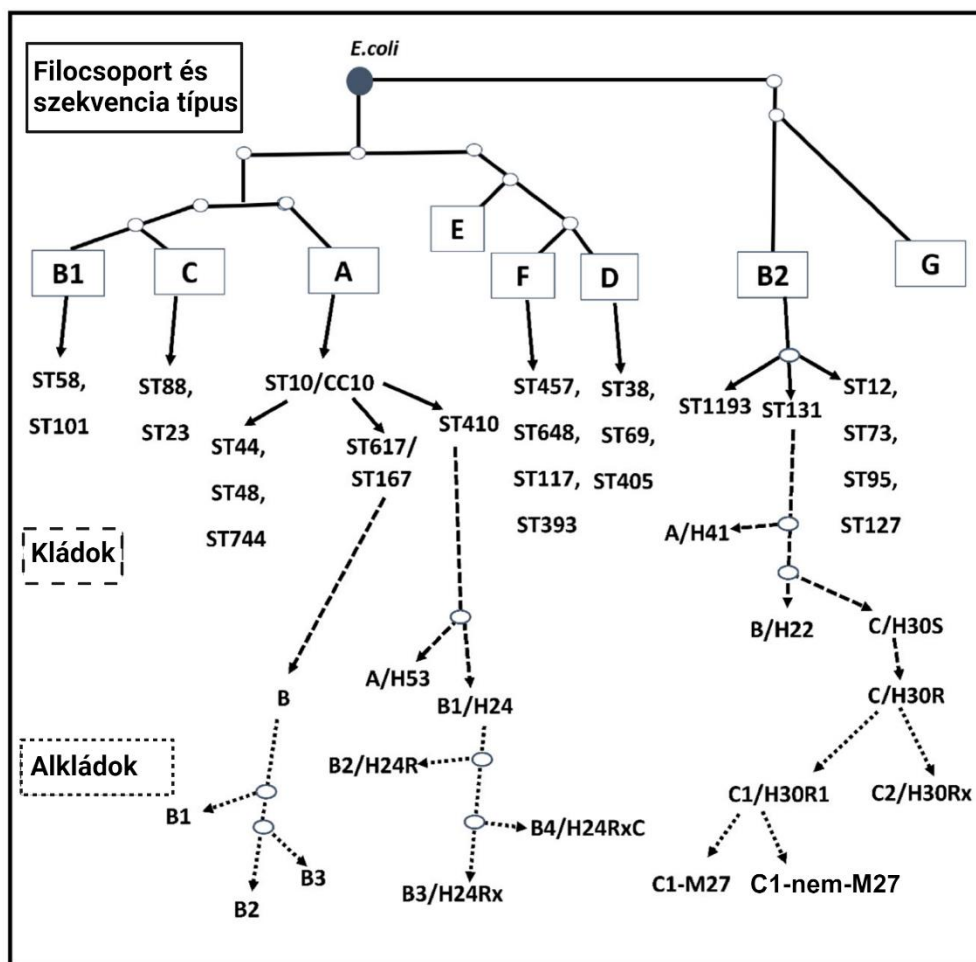
A trimethoprim/sulfamethoxazol (SXT), egy kombinált antibiotikum, amely trimethoprim és sulfamethoxazol hatóanyagból áll. A trimethoprim a dihidrofolát-reduktázt aktivitását, míg a sulfamethoxazol a dihidropteroát-szintetázt gátolja, amelyek elengedhetetlenek a folsavszintézishez. Az *E. coli* által megfigyelt SXT rezisztencia több mechanizmus révén alakulhat ki, beleértve a target enzimek mutációit, az efflux pumpák túlexpresszióját, a membrán permeabilitás csökkenését és a rezisztencia gének horizontális géntranszferét. Az *E. coli*-ban a szulfonamidokkal szembeni rezisztencia a kromoszómális dihidropteroát-szintetáz gén (*folP*) mutációiból vagy gyakrabban egy alternatív dihidrofolát-reduktáz és dihidropteroát-szintetáz gének (*dhfr*; *sul*) megszerzéséből eredhet (67).

1.5. ExPEC filogenetikai rendszerezése és nemzetközi klónjai

Ochman és Selander 1984-es munkájukban az *E. coli* törzseket filogenetikai alapú klasszifikációs rendszerbe sorolták. A módszerük alapja a multilokus enzim elektroforézis (MLEE) volt, amellyel az izolátumokat öt fő filogenetikai csoportba (filocsoportok) osztották, nevezetesen A, B1, B2, D és E. Az ExPEC izolátumok elsősorban a B2 és D csoportokra sorolhatóak (68,69). Clermont és munkatársai 2000-ben kidolgoztak egy triplex (*chuA*, *yjaA*, és *TspE4.C2*) gének jelenléte vagy hiányán

alapuló polimeráz láncreakciós (PCR) módszert, amely lehetővé tette az *E. coli* gyors filocsoportokba sorolását (69). Ez a módszer sokkal gyorsabb, egyszerűbb és olcsóbb volt, mint az MLEE, és lehetővé tette az *E. coli* izolátumok négy fő filocsoportra (A, B1, B2, D) történő elkülönítését. Egy frissített Clermont-féle genotipizálási módszerrel összhangban az *E. coli* törzseket nyolc filogenetikai csoportba lehet sorolni, amelyek az A, B1, B2, C, D, E, F és az I (70). A DNS-szekvenálási módszerek elterjedésével az ExPEC csoportok filogenetikai elemzésére a 7 háztartási génen alapuló multilokusz szekvencia tipizálást (MLST) kezdték el használni. Ez a módszer egységesített megközelítése és nagyobb felbontása miatt lehetővé tette az ExPEC-vonalak részletesebb elemzését. Ezzel a genotipizálási módszerrel a törzseket szekvencia típushoz (ST) rendelik, amelyeket azonos allélprofilú izolátumokként határoztak meg, és szélesebb körű klonális komplexekre (CC) osztották, amelyeket legalább három ST csoportjaként határoztak meg (mindegyike legfeljebb 1 alléllal különbözik a többitől a 7 allél közül) (71). Az *E. coli* esetében rendelkezésre álló három MLST séma közül a Achtman séma a leggyakrabban használt módszer az epidemiológiai kapcsolatok feltérképezésére (72). Az MLST diszkriminatív ereje korlátozott, ezért előfordulhat, hogy egy ST típusba rendel olyan izolátumokat, amelyek genetikailag különbözhetnek egymástól. Weissman és munkatársai 2012-ben a CH (chaperone-usher fimbriae génjeinek elemzése) tipizálás módszerét írták le, amely nevét a *fumC* és *fimH* génelemzésről kapta (73). A CH tipizálás alapján a nagy ST csoportokat kisebb klónokra tudta bontani. A "klón" kifejezést gyakran használják egy baktériumfaj azonos vagy nagyon hasonló genetikai összetétellel rendelkező izolátumainak csoportjára, amelynek legvalószínűbb magyarázata a közös eredet (74). Az MLST mellett a pulzáltatott mezejú gélelektroforézis (PFGE) módszerét használták molekuláris epidemiológiai kapcsolatok feltérképezésére. A PFGE olyan technika, amelyet bakteriális genom restrikciós endonukleázokkal felhasított nagy DNS fragmentumainak szétválasztására használnak egy gélmátrixra periodikusan irányított változtató elektromos mező alkalmazásával. Ez lehetővé teszi a genomális DNS közvetlen elemzését, azonban a nemzetközi összehasonlítás problémája miatt nem a legjobb módszer (75,76). A legnagyobb diszkriminatív erővel rendelkező genotipizálási módszert a teljes genom szekvenálás (WGS) jelenti az ExPEC filogenetikai elemzéséhez (77,78). Mindegyik módszernek meg van a maga előnye, a jelenleg fennálló *E. coli* filogenetika kapcsolatokat az 5. ábra mutatja, amely a különböző módszerek

kombinációjából épül fel (PCR (Clearmont-féle tipizálás), MLST (Achtman-séma) és WGS).



5. ábra: Az extraintestinalis patogén (ExPEC) *E. coli* filogenetikai csoportjainak, szekvenciatípusainak, kládjainak és alkládjainak besorolása (forrás: Kocsis és mtsai. nyomán módosítva (79))

Az ExPEC törzsek számos leszármazási vonalból, klónból állnak, de fertőzések túlnyomó többségéért csak egy korlátozott csoportja felelős. Ezeket nevezzük kiemelt kockázatú (high-risk) klónoknak. A magas kockázatú klón jellemzően olyan populációra utal, amely fokozottan képes kolonizálni, fennmaradni és globálisan elterjedni, emellett a széles genomplaszticitásuk miatt hatékonyabb patogenitással, fitneszképességgel és számos különböző antimikrobiális rezisztencia determinánsokkal rendelkezik, melyek lehetőséget adnak a súlyos illetve visszatérő betegség okozására (31,80). Egy 217

tanulmányt (1995-2018) feldolgozó metaanalízis, szerint az *E. coli* izolátumok 85%-át húsz fő ExPEC szekvencia típus (ST) tette ki: ST131, ST69, ST10, ST405, ST38, ST95, ST648, ST73, ST410, ST393, ST354, ST12, ST127, ST167, ST58, ST617, ST88, ST23, ST117 és ST1193 (sorrend a tanulmányokban felbukkanó ST típusok gyakoriságát jelöli csökkenő sorrendben) (77). A tanulmányok több mint 90%-ában az ST131-et mutatták ki, függetlenül az izolátum beválasztási kritériumoktól, a földrajzi régiótól, a forrástól vagy az időponttól, továbbá 2000-től kezdődően az ST131 volt a leggyakoribb szekvencia típus, valamennyi földrajzi régiót lefedve (77).

Az *E. coli* ST131 világszerte elterjedt MDR pandémiás klón, amely a közösségben előforduló és kórházi húgyúti és véráramfertőzésekért felelős. Az ST131-et összefüggésbe hozták a CTX-M-15 széles spektrumú β -laktamáz elterjedésével (81). Továbbá az ST131 fluorokinolonokkal, aminoglikozidokkal és a trimetoprim/sulfamethoxazollal szembeni együttes rezisztenciával is erősen összefüggésbe hozható (82). Aggasztó módon a karbapenemekkel szemben rezisztens törzsekről is beszámoltak, amely korlátozza ezen klón okozta fertőzések kezelések lehetőségeit (83,84). További riadalomra ad okot, hogy a klón elterjedésének okai egyelőre meghatározatlanok, de a fokozott átvihetőség, virulencia és más *E. coli* klónokhoz képest kiterjedtebb antimikrobiális rezisztencia, mobilis genetikai elemek szerepet játszhatnak benne (45).

1.6. *Escherichia coli* ST131 klón bemutatása

1.6.1. Populáció szerkezet

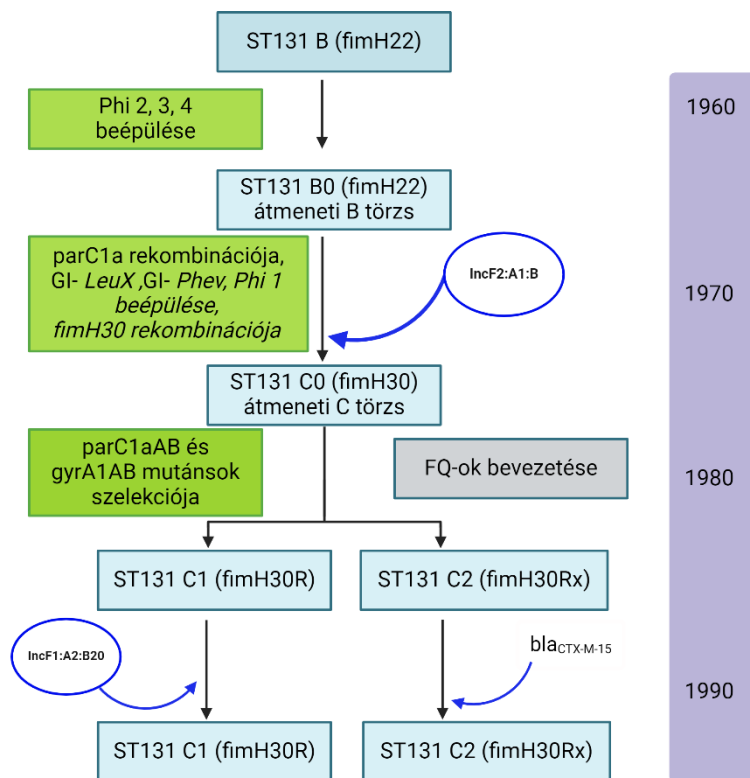
Az *E. coli* ST131 ExPEC klónok besorolhatóak a szerotípusuk (O16:H5, O25:H4), kládjuk (A, B, C, D) és a *fimH* alléljuk (1-es típusú fimbriális adhéziós fehérje) szerint (2. táblázat). Az A kládba tartozó izolátumokat leginkább az O16:H5 szerotípus és a *fimH41* allél jellemi. A B kládot olyan törzsek alkotják, amelyek O25b:H4 szerotípussal és főként *fimH22* alléllal rendelkeznek. A C klád törzseire a *fimH30* allél jellemző.

2. táblázat Az ST131 populációszerkezetének besorolása (Pitout és Finn alapján, 2016 (46)). FQ fluorokinolon, ESBL kiterjedt spektrumú β -laktamáz, HPD Highest Posterior Density (legnagyobb poszteriori sűrűség).

Klád/ Alklád	Szerotípus	Elsődleges fimH allél	Más néven	A származás/ divergencia becsült idővonala (95%-os HPD intervallum) (85)	Gyakran társuló IncF plazmid (86)	Jellemző rezisztencia profil
A	O16:H5	fimH41	–	–	F29:B10	Nincs
B	O25b:H4	fimH22	–	1901 (1842–1948)	F29:B10	Nincs
C0	O25b:H4	fimH30	H30	1985 (1980–1989)	F2:A1:B-	Nincs
C1	O25b:H4	fimH30	H30R	1994 (1991–1996)	F1:A2:B20	FQ, ESBL (CTX-M- 14, CTX- M-27)
C2	O25b:H4	fimH30	H30Rx	1994 (1991–1996)	F2:A1:B-	FQ, ESBL (CTX-M- 15)

A B kládból fejlődött ki a C klád, ami Észak-Amerikában az 1980-as évek végén következhetett be, de a 2000-es évek óta a C klád vált a leggyakoribbá. A C kládot 70 egy pontos nukleotid-polimorfizmus (SNP) és a *gyrA*, *parC* mutációk okozta fluorokinolon rezisztencia különbözteti meg az elődjétől. A C kládból való átmenet során az ST131 egymás után több profágot (Phi2, 3 és 4) szerzett be, kialakítva az átmeneti B0 kládot. Ezt követte a GI- *LeuX* (különböző géneket tartalmazó genom sziget), GI- *Phev* (*agn-43* és *sat iucABCD*, *iutA* virulencia géneket hordozó genom sziget) megszerzése, a fimH30 allél és *parC1a* (*parC* allélvariánsa, ami nem okoz FQ rezisztenciát) rekombinációja, ami az 1970-es évek végén és az 1980-as évek elején a C0 közös őséhez vezettek el. A C klád kialakulásához hozzájárult a *parC1aAB* és *gyrA1AB* mutációja, ami már magas szintű FQ rezisztenciát eredményezett. Az 1980-as évek közepén-végén a C klád (H30R, ahol az R utal a FQ- rezisztenciára) C1 és C2 alkládra vált szét. Ugyanerre az időpontra tehető a fluorokinolon antibiotikumok 1986-os bevezetése és az azt követő elterjedése (87). A különböző CTX-M-ek megszerzésével a C klád további alkládokra

bomlott. A *bla*_{CTX-M-15} génnel rendelkező ST131 egy különálló alkládot alkotott a H30R vonalban, amelyet C2/H30Rx (ahol az x utal a *bla*_{CTX-M-15} meglétére) kládnak nevezik (6. ábra). A másik leszármazási vonala, a C1 alklád (C1/H30R) lett, amelynek izolátumai a *bla*_{CTX-M-15}-től eltérő CTX-M-et hordozott (31,46,88).



6. ábra: *Escherichia coli* ST131 B, B0, C0 és C kládjainak fokozatos evolúciója (forrás: Pitout és DeVinney szerint módosítva (88))

1.6.2. ST131 C kládhoz társuló plazmidok

A plazmidok kettősszálú, extrakromoszómális, többnyire cirkuláris DNS-molekulák, amelyek képesek önállóan replikálódni. A plazmidok a Gram-pozitív és

Gram-negatív baktériumokban egyaránt előfordulnak és gyakran járulékos géneket biztosítanak (89). Különböznek egymástól méretben (néhány kilobázistól akár megabázisig), példányszámban (egy vagy több kópia), replikációs mechanizmusokban és átviteli módokban (pl. konjugatív), valamint a gazda-spektrumban (szűk/tág gazdakörrel rendelkeznek). A plazmidok osztályozhatóak az inkompatibilitási csoportosítás alapján, amely azon az elven alapul, hogy két plazmid nem képes stabilan együtt létezni ugyanabban a bakteriális sejtben, amennyiben ugyanazért a replikációs gépezetért vagy szabályozó rendszerekért versengenek. A plazmidokat inkompatibilitási (Inc) csoportokba sorolják ezen tulajdonság alapján (55,89). Jelenleg 28 Inc-típus létezik az Enterobacteriaceae-nél (90). Az plazmidok Inc és gazdaspektrum alapján nagyjából két fő csoportra oszthatók, nevezetesen a szűk gazdaspektrumú csoportra, amely leggyakrabban az F inkompatibilitási csoportba (IncF) tartozik, és a széles gazdaspektrumú csoportra, amely az IncA/C, IncL/M és IncN csoportba tartozik (31). A széles gazdaspektrumú plazmidok könnyen átvihetők a különböző fajok között, míg a keskeny gazdaspektrumú plazmidok általában fajhoz kötöttek (55). Az IncF-hez tartozó, eltérő replikon típusokkal (pl. FIA, FIB és FII) rendelkező epidémiás rezisztencia plazmidok képesek rezisztencia géneket szerezni, majd gyorsan elterjedni az Enterobacteriaceae-k között, különösen a fajon belüli egyes klónok között (55).

Az F replikonokkal rendelkező inkompatibilitási csoportokhoz tartozó (IncF-nek nevezett) plazmidok széles körben elterjedtek az *E. coli* ST131 törzsek között, és fontos szerepet játszanak az antibiotikum rezisztencia és a virulencia terjedésében. Az IncF az F típusú pili termelődéséről kapta a nevét, és amelyből hat csoport (IncFII-VII) létezik. Az ezen plazmidok általános jellemzői közé tartozik, hogy gyakran több origót vagy replikont tartalmaznak, általában 100 kb-nál nagyobb mértűek, alacsony a kópiaszámuk, jellemzően *pemI/pemK* toxin/antitoxin rendszert tartalmaznak, gyakran hordoznak virulencia vagy antibiotikum rezisztencia géneket (55,89).

Különböző tipizálási módszerek vannak a plazmid típusok azonosítására. Az első séma a *rep* tipizálás (avagy replikon, ami a plazmid replikációért felelős *ori*-t használja) vagy az Inc csoportok meghatározása (89). E szerint a plazmidokat a replikációs rendszereik alapján sorolják be inkompatibilitási csoportokba. A második séma a plazmid multilokus szekvencia tipizálás (pMLST), amely bizonyos Inc plazmidokon belüli

specifikus konzervált struktúrákat céloz meg. A pMLST használható IncA/C, IncF, IncHI1, IncHI2, IncI1 és IncN altípusok meghatározására (91). A replikon szekvencia tipizálási séma szerint a plazmidot az FIA, FIB és FII replikonokon alapuló FAB képlettel lehet jellemezni. Az FIA replikon tipizálása az iteronokat és a *repA* replikációs fehérjét kódoló szekvencia elemzésen (20 különböző allél), az FIB a *repB* gén szekvencia (69 allél) elemzésen, az FII replikont a *copA* gén szekvencia (105 allél) elemzésen alapul. Az FII replikon helyettesíthető a nem funkcionális FIC-vel (5 változat). Ezek alapján hozták létre az FAB képleteket az IncF plazmidok tipizálására (90,91). A plazmid replikonok tipizálásának egyik nagy kihívása a multireplikon plazmidok. A legismertebb multireplikon plazmid a korábban említett IncF, amely hordozhat FII, FIA és/vagy FIB replikont. Ezenkívül egyes plazmidok kointegrálódhatnak, létrehozva egy eltérő típusú multireplikon plazmidot, ami jellemző az Enterobacteraceae-re (89,90).

Az ST131 A és B kláddal ellentétben a C klád és az IncF plazmidok között nagyon erős a kapcsolat. A C0 klád izolátumokra jellemző az F2:A1:B- plazmid típus. A C2/H30Rx evolúciójának során egy bizonyos pontján az F2:A1:B- egy IS26 inszerciós elemen keresztül megszerezte a *bla*_{CTX-M-15}-öt, *catB4*, *bla*_{OXA-1}, *aac(6')Ib-cr*, és *tetA* rezisztencia géneket tartalmazó génkazettát. Ezek a gének később néhány esetben a C2 alkládba tartozó izolátum kromoszómájába is integrálódtak (92). A C1/H30R alklád evolúciója során az F2:A1:B- plazmidot felváltotta az F1:A2:B20, amely a *bla*_{CTX-M-15}-től eltérő CTX-M-et hordozott. Leggyakrabban ez a *bla*_{CTX-M-14} vagy *bla*_{CTX-M-27}-et kódoló F1:A2:B20 plazmidot jelenti, amely főként a C1/H30Rx alkládhoz társul (31,46,88). Az ST131 C1-M27 alkládnál előforduló *bla*_{CTX-M-27} egy nukleotidban különbözik (ami 1 aminosav változással jár a 240. pozícióban) a *bla*_{CTX-M-14}-től (93). Matsumura és társai azonosítottak egy 11 894 bp hosszúságú, M27PP1 nevű régiót, amely a C1-M27 kládba tartozó összes izolátumra specifikus (93). A CTX-M-15-öt kódoló plazmidok között ma már nagyobb genetikai változatosság figyelhető meg, méretük változó (50-200 kb), a repFII replikont önmagukban vagy repFIA-val vagy/és repFIB-bel kombinálva hordozzák, ilyen például az egyre gyakrabban leírt F36:F31:A4:B1 mozaik plazmid (55,94). Az egyéb ismert plazmidok közé tartoznak az IncA/C, L/M és N, I plazmidok, amelyek valószínűleg különböző fajokból kerültek át (31,95). Ezek a plazmid típusok olyan β -laktamáz géneket hordozhatnak, mint a *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-1} és *bla*_{TEM-1} (46,55).

A Col-szerű plazmidok az IncF plazmidok egy alcsoportját alkotják, nevüket a colicin V terelés miatt kapták, amely fokozza a baktériumtörzsek túlélési és szaporodási képességét. Néhány Col-szerű replikonok (Col156, Col(MG828) és Col8282) szintén C1-alkládhoz társulónak bizonyultak, azonban leírták már a C2-alkládban is (46,96).

1.6.3. ST131 C kládhoz társuló egyéb mobilis genetikai elemek

A virulencia és rezisztencia gének horizontális terjedésében kiemelt jelentőséggel bírnak a mobilis genetikai elemek (MGE). A legegyszerűbb mobilis genetikai elemek az inszerciós elemek (IS). Ezek általában 2,5 kb-nál rövidebb DNS-szakaszok, egy transzpozáz (Tnp) enzimet kódolnak, amely katalizálja a DNS-molekulák genomális régiókon belüli DNS átvitelét. Kompozit vagy összetett transzpozon két azonos IS elem által közrefogott több gén (pl. antibiotikum rezisztencia gének) vagy DNS szakaszt jelent, és ezek együttes mozgására képes.

Az IS6 családba tartozó IS26 replikatív transzpozíciója során (másolás/replikálás és beillesztés mechanizmus) kointegrátumot képez a donor-cél DNS molekula párok között, amelyet a Tn3 rezolváz old fel (97,98). Az IS26 más transzpozíbilis elemekkel együtt a kompozit transzpozonban is megtalálható, és olyan egységeket alkothat, amelyek tandem-amplifikáción mehetnek keresztül rezisztens plazmidokban vagy kromoszómákban (99). Az IS6 család tagjaira jellemző a hibrid promóterek kialakulása az inszerció során, ahol a beillesztett elem egy - 35 promóter komponenst, a flankáló szekvencia pedig egy - 10 promóter komponenst hordoz. A két promóter régió kombinálásával képes az IS bármelyik végével szomszédos gén kifejeződését a megfelelő orientációban fokozni, és ez több esetben lehetővé teszi egy antibiotikum rezisztencia gén fokozott kifejeződését (99,100).

Az *ISEcp1* inszerciós szekvencia, az IS1380 családba tartozik (101). Az *ISEcp1*-nél a transzpozáz 14 bp hosszúságú invertált ismétlődések (IR) határolják jobb (IRR) és bal (IRL) oldalon. Az *ISEcp1* az IRL-t használja alternatív szekvenciákkal együtt, amelyek hasonlítanak ezekhez az IR-ekhez, hogy mobilizálja a szomszédos régiókat

("transzpozíciós egységek" részeként), létrehozva a transzpozíció során a szomszédos szekvencia 5 bázispár duplikációját (102).

Az *IS26*-hoz hasonlóan az *ISEcp1* által közvetített transzpozíció is homológ rekombinációval járnak. A mobilizáció mellett, mindkét IS-család felelős lehet a *bla*_{CTX-M-15} génnek magasabb szintű expressziójáért (abban az esetben ha az inszerciós elem a proximális rezisztencia gén promóter régiójába épül be (99)), amelyek fontos szerepet játszanak az antibiotikum rezisztencia gének elterjedésében a Gram-negatív baktériumok között (103,104). Az *ISEcp1* és/vagy *IS26* által közvetített *bla*_{CTX-M-15} transzpozíció jelenségét már korábban is leírták néhány tanulmányban (57,89,105–108). Shawa és munkatársai leírták az *ISEcp1-bla*_{CTX-M-15} és *catB3*, *bla*_{OXA-1}, *aac(6')-Ib-cr5* gének együttes előfordulását CTX-M-15 termelő *E. coli* ST131 kromoszómális környezetében (45,105).

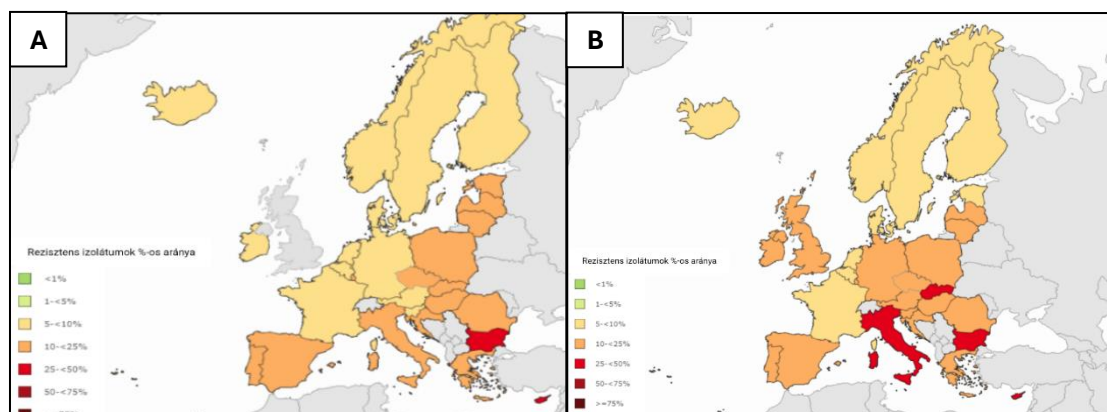
1.6.4. *Escherichia coli* ST131 epidemiológiája

Az ST131 klón jelentős közegészségügyi problémát jelent, a 2000-es évek közepére az ESBL-termelő változatok „világjárványt” okoztak, és közösségi fertőzésekben is egyre gyakrabban azonosították (81,109,110). Az első ST131 klónból származó törzseket az 1960-as évektől kezdve izoláltak Európa-szerte és az Egyesült Államokban (111). Jonnson és mtsai. által végzett PFGE-vizsgálatban az első emberi, állati és környezeti mintákból származó ST131 izolátumokat 1967-ben, 1982-ben, 1985-ben és 1986-ban találták meg (75). A fluorokinolok 1980-as években történt bevezetését követően széles körben alkalmazták a Enterobacteriaceae fertőzések (különösen húgyúti fertőzések) kezelésére. A következő években a fluorokinolon rezisztencia aránya emelkedett. A 1990-es években a súlyos ExPEC fertőzéseknél fluorokinolon mellett harmadik generációs cefalosporinokat alkalmaztak. Ekkor jelentek meg az első fluorokinolon rezisztens *E. coli*-k, amik már harmadik generációs cefalosporin rezisztenssé is váltak (45). A 2010-es évek közepére, a harmadik generációs cefalosporin-rezisztens *E. coli*-val kapcsolatos fertőzések becsült betegség terhe vált Európa szerte a legjelentősebbé (2015): az 100 000 főre jutó átlagos DALY száma 37,2 volt, míg a véráramfertőzés miatt bekövetkezett DALY-k 100 000 lakosra vetített átlagos százalékos

aránya 80,5 volt (4). Ezzel rámutatva a helyzet súlyosságára, hiszen ezek az antibiotikumok (FQ, szűkebb és szélesebb spektrumú cefalosporinok) alkalmasak voltak súlyosabb fertőzések kezelésére, azonban a rezisztencia kialakulása miatt a terápiás lehetőségek beszűkültek. Az *E. coli* ST131 ebben az időben már globálisan elterjedt Európában, az Amerikai Egyesült Államokban, Ázsiában és a Közel-Keleten, Ausztráliában és Afrikában (110). A C alklád prevalenciája időben és régióként változást mutatott: késői 2000-es években az CTX-M-15-t termelő multirezisztens *E. coli* (ST131 C2/H30Rx) klón vált a leggyakoribb ST131-es klónná, azonban Ázsia egyes részein (Japán, Kína, Korea) a kevésbé gyakori CTX-M-27- termelő *E. coli* (ST131 C1/H30R) dominált. 2005 előtt a *bla*_{CTX-M-14}-et tartalmazó ST131 C1 alklád dominált Japánban, amit azóta felváltotta a *bla*_{CTX-M-27}-et tartalmazó C1-M27 klád, amely felelős az ESBL-termelő ExPEC jelentős növekedéséért ebben a régióban, különösen 2010-et követően (39,93). Azóta már Ázsián kívül, Európa több országában (pl. Svájc, Spanyolország, Franciaország), az Egyesült Államokban és Ausztráliában is leírták a C1-M27 *E. coli* izolátumokat (93).

Az Európai Antimikrobiális Rezisztencia Surveillance Hálózat (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network-EARS-Net) 2022-es éves jelentéséből származó adatok azt mutatták, hogy az Európai Unióból (EU) és az Európai Gazdasági Térségből (EGT) jelentett invazív *E. coli* izolátumok között a harmadik generációs cefalosporin rezisztencia aránya 2018 és 2022 között csökkent (15,7%-ról 14,3%-ra, 7. ábra) (112).

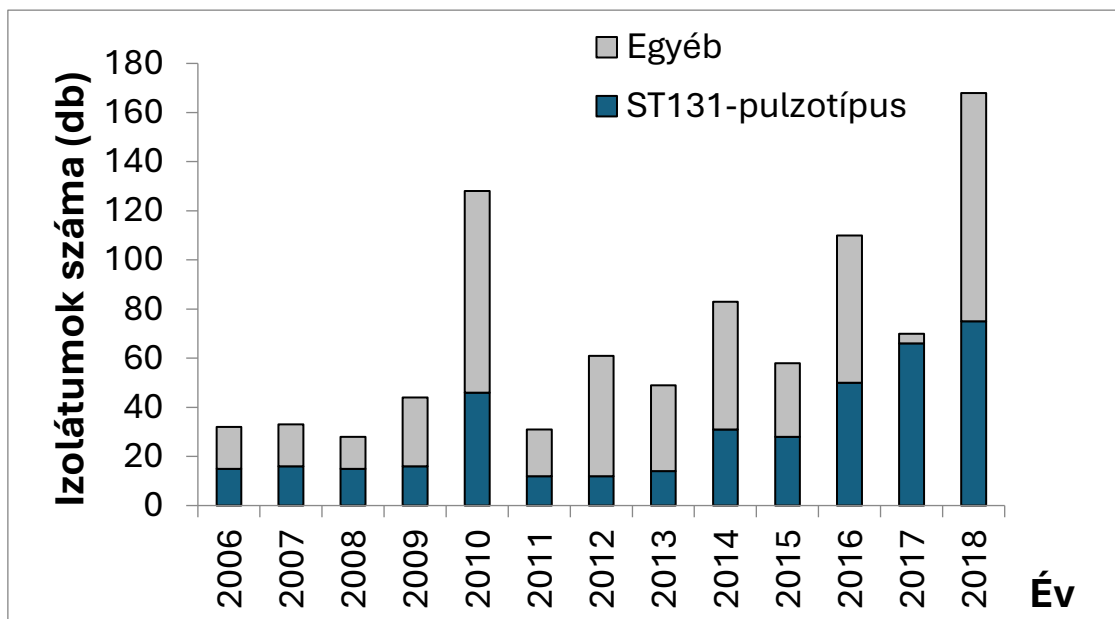
A harmadik generációs cefalosporin rezisztencia aránya Magyarországon 2018 és 2022 között stagnált, de jóval meghaladta az európai átlagot (22,6% volt mindkét évben) (112).



7. ábra: Harmadik generációs cefalosporin (cefotaxim/ceftriaxon/ceftazidim) rezisztens *E. coli* törzsek %-os aránya Európában 2018 (A) és 2022 (B) évből (Network-EARS-Net adatai alapján (112))

Egy tanulmányban 2010 márciusa és novembere között három magyarországi egyetemi kórházban gyűjtött, véráramfertőzésekben származó 117 *E. coli* izolátum között 26 ESBL-termelőt (22,2%) találtak, amelyek közül kilenc kizárólag *bla*_{CTX-M-15}-t hordozó ST131 klónhoz tartozott (113). Janvári és márciusi. 2015-ben észlelték az első, a C1-M27 alkiládba tartozó ESBL-termelő invazív *E. coli* izolátumokat (114).

Az Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központba (NNGYK) küldött ESBL-termelő *E. coli* izolátumok PFGE vizsgálat pulzotípusainak (PT) MLST megerősítő elemzése lehetővé tette az ST131-re specifikus pulzotípus azonosítását (8. ábra). Az NNGYK adatai szerint 2014-óta fokozatosan emelkedik az invazív mintából izolált ST131 *E. coli*-k száma és az ESBL-termelő izolátumok közel felében (2017-től eltekintve) ezt a pulzotípust lehetett kimutatni: 2014-ben 37% (31/83), 2015-ben 48% (28/58), 2016-ben 45% (50/110), 2017-ben 94% (66/70) és 2018-ban már 45 % (75/168) volt.



8. ábra: Az invazív, ESBL-termelő *E. coli* PFGE-típusok eloszlása Magyarországon az Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központba érkező izolátumok alapján

1.6.5. ST131 izolátumok virulencia faktorai

Az *E. coli* ST131 izolátumok virulencia génjei többféle módon járulnak hozzá a fertőzés kialakulásához és súlyosságához. Ezek a faktorok különböző képességeket biztosítanak a baktériumnak, amelyek lehetővé teszik számára a gazdasejtek kolonizálását, azokhoz való tapadását, a szövetekbe való behatolását és károsítását, a fertőzés során történő terjedését és az immunrendszerrel szembeni ellenállását. Az ExPEC virulencia géneket öt kategóriába sorolhatjuk: adhéziónak, inváziós faktoroknak, vasfelvételért felelős siderofóroknak, gazdaszervezet elleni védelmi faktoroknak és toxinoknak. A következő bekezdésben megemlítem az kategóriákban tartozó leggyakoribb virulencia géneket:

Számos virulencia gén jelentős szerepet játszik az adhézióban. A legfontosabb közülük külső membrán receptorok (pl. *omp*), fimbriák (pl. *fim*, *dra*, *pap*, *sfa*, *iha*), afimbriális adhézinek (*afa*). A kolonizációt nagyban elősegíti, hogy az ST131 klónok képesek biofilm képzésre (pl. *crl*, *csf*, *fim*) (115,116). Az invazív törzsek esetében az *ibeA* inváziós gént összefüggésbe hozták a bélhámsejtek inváziójának képességével. Az ExPEC esetében a vérérumban lévő vashoz való hozzáférés kiemelkedő jelentőségű a

baktériumok növekedése miatt. A vasat sziderofórokon keresztül köti meg, ilyen az enterobaktin és salmochelin (pl. *iroBCDEN*), aerobaktin (pl. *iuc*) és yersiniabaktin (pl. *irp*, *fyuA*). A protectinek a baktériumok szérum rezisztenciájáért felelősek. A jól ismert invazinok közé tartozik a komplement rendszer klasszikus útjának gátlásáért felelős *traT*, a fagocitózist elleni védőfaktor, külső membrán faktor (OmpA), a kapszulaantigén (*KpsMII*) és az *iss*. Az ExPEC izolátumokban leggyakrabban kimutatott toxinokat kódoló gének a hemolysin (pl. *hlyA*, *hlyD*, *hlyF*), citotoxikus nekrotizáló faktor (*cnf1*), szekretált autotranszporter toxin (*sat*), szerin proteáz autotranszporter (*pic*) és *vat* toxin (6,116).

Az ST131 virulencia potenciáljára vonatkozóan ellentmondásos eredmények állnak rendelkezésre (31,92,117). Az ST131 az extraintestinalis virulencia faktorok különböző kombinációihoz társulnak és virulensebbek mint a nem *E. coli* ST131 izolátumok (118,119). Banerjee és mtsai. vizsgálata alapján az ST131-en belül a H30, a nem-H30 és a H30Rx alkládok jellegzetes virulencia profilokkal rendelkeznek, amelyek különböznek a nem *E. coli* ST131 klónoktól, és elképzelhető, hogy fokozott virulenciát biztosítanak (118). Kísérleti állatmodellek közül volt olyan ami támasztja alá, hogy az ST131 virulensebb lenne más *E. coli*-knál (117). Petty és mtsai. leírása alapján kevés virulencia gén van jelen egységesen az ST131-ben, és ezért valószínű, hogy a virulencia gének mennyiségében és tartalmában mutatkozó különbségek hozzájárulnak a fentebb említett változó virulencia potenciálhoz (92). Az egységesen jelenlévő virulencia faktorok közül Blanco és munkatársai négy gén jelenléte vagy hiánya alapján 195 db O25b:H4-B2-ST131 izolátumot négy virotípusba (A-tól D-ig) sorolt (120) (3. táblázat): 1) *afa* FM955459 *afa/dr* adhezín, 2) *iroN* sziderofór receptor, 3) *ibeA* agyi endotél inváziós és 3) *sat* egy szekretált autotranszporter toxin.

3. táblázat: ST131 izolátumok virotípus besorolása Blanco és mtsai. alapján (120).

„+” gén meglétét, „-” a gén hiányát jelöli.

gén	virotípus			
	A	B	C	D
<i>afa</i> FM955459	+	-	-	-
<i>iroN</i>	-	+	-	+/-
<i>ibeA</i>	-	-	-	+
<i>sat</i>	+/-	+/-	+	+/-

Azóta ST131 izolátumok virotípusai osztályozhatóak a 2013-ban kidolgozott rendszer alapján. Ezen felül még az ST131-ben általánosan elterjedt gének közé tartozik még az *usp* (uropathogen-specific protein/ uropatogén-specifikus fehérje), *malX* (patogenitási sziget marker), *sat*, *fyuA*, *iha*, *ompT*, *iucD* és *traT* gén (110).

2. Célkitűzések

A Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központban működő Egészségügyi ellátással összefüggő fertőzések és antibiotikum rezisztencia Nemzeti Referencia Laboratóriuma (NRL) foglalkozik a hazai egészségügyi intézményekből származó multirezisztens izolátumok antibiotikum rezisztenciájának monitorozásával, fenotípusos és genotípusos megerősítésével, valamint molekuláris epidemiológiájával. A közel 20 éve rutinszerűen végzett PFGE tipizáló vizsgálat mellett 2016-ban a WGS alapú tipizálás is bevezetésre került a molekuláris kapcsolatok feltérképezésére. A nemzetközi elterjedése mellett hazánkban is kiemelt jelentőségű MRK kórokozó az ESBL-termelő *E. coli*. Munkám során népegészségügyi szempontból kiemelkedő jelentőségű *E. coli* ST131 izolátumainak részletes jellemzése volt a célom, beleértve a fenotípusos és genotípusos elemzésüket, valamint populációs struktúrájuk vizsgálatát. Bízunk abban, hogy kutatási eredményeink hozzájárulnak egy sikeres klón hazai elterjedésének mélyebb megértéséhez, a kapcsolódó kockázatok felméréséhez, és elősegítik azoknak a lépéseknek az megtételét, amelyek javítják a hazai helyzetet.

Munkám során a következő célkitűzéseim voltak:

- 1, Egy prospektív, monocentrikus felmérés keretében gyűjtött invazív mintákból származó harmadik generációs cefalosporin-rezisztens *E. coli* izolátumok molekuláris epidemiológiai jellemzése.
- 2, 2015-2018 között, illetve 2021-ben izolált, hazai invazív mintákból származó multirezisztens C2/H30Rx és C1-M27 alkádokba tartozó reprezentatív magyar törzskollekció populáció szerkezetének feltérképezése genomikai módszerekkel: genotípus, fenotípus, mobilis genetikai elemek jellemzése. A COVID-19 esetleges hatásának vizsgálata az ST131 populáció struktúrájára a két időszakban elterjedt izolátumok összehasonlításával.
- 3, Karbapenemáz-termelő *E. coli* ST131 izolátumok összehasonlítása korábbi hazai ESBL-termelő *E. coli* ST131 törzsekkel, illetve a rezisztencia géneket hordozó plazmid(ok) jellemzése és a mobilis genetikai elemeinek összevetése Magyarországon elterjedt más karbapenemáz-termelő izolátumokéval.

3. Módszerek

3.1. Felhasznált baktériumtörzsek

A hazai egészségügyi intézetek 2005 óta küldik be a 3GCR *E. coli* izolátumokat, 2015 óta a karbapenemáz termelő *E. coli* izolátumokat az NRL-be. Mivel a beérkezett törzsek száma 2005 óta folyamatosan növekedett, az NRL leszűkítette a megerősítő és tipizáló vizsgálatokra küldendő izolátumok kategóriáit: járványügyi vizsgálatból és/vagy invazív mintából származó ESBL-termelő és/vagy AmpC-termelő *E. coli* izolátumokra (A mindenkori 18/1998. (VI.3.) NM a fertőző betegségek és a járványok megelőzése érdekében szükséges járványügyi intézkedésekről rendeletének, 6. számú melléklete alapján). Az így beérkezett karbapenemáz- és ESBL-termelő izolátumok fenotípusos és genotípusos megerősítését végeztük el. A karbapenemáz-termelő izolátumok esetén teljes genom szekvenálást, az ESBL-termelő izolátumok esetén két lépcsős molekuláris tipizálást hajtottunk létre: megállapítottuk az ST131-re jellemző pulzotípusokat, majd elvégeztük az ST131 kládjainak, illetve a C alkládainak elkülönítését multiplex PCR-rel. A PFGE és a multiplex PCR adatai alapján választottuk ki a további vizsgálatokban részt vevő reprezentatív *E. coli* ST131 izolátumokat.

A Dél-Pesti Centrumkórház, 2018. október-november között, invazív mintákból származó *E. coli* izolátumok közül az ESBL-termelő törzsek további vizsgálatát végeztük el egy prospektív, monocentrikus vizsgálat során.

A prospektív vizsgálat eredményeire alapozva kiválasztottunk invazív mintákból származó, 63 reprezentatív *E. coli* ST131 izolátumot (30 db C2/H30Rx és 33 db C1-M27 alkládhoz tartozót), amely 2015-2018 közötti időszakból és 2021-ből származott. Az izolátumok kiválasztásakor a következő szempontokat vettük figyelembe: az alkládok izolátumai közel azonos arányban szerepeljenek és minél több megyét vagy egészségügyi intézményt és évet fedjenek le.

A 2018-2023 között beérkezett összes karbapenemáz-termelő *E. coli* izolátum közül kiválasztottuk az ST131 izolátumokat, és összehasonlítottuk a genetikai jellemzőit az eddig vizsgált *E. coli* ST131 kollekcióval, és három azonos típusú karbapenemáz

géneket termelő *Klebsiella pneumoniae* és eltérő *E. coli* klónok mobilis genetikai elemeivel.

3.2. Izolátumok identifikálása

A vizsgálatban felhasznált izolátumokat mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria (MALDI-TOF MS, Bruker, Bremen, Németország) módszerrel azonosítottuk.

3.3. Antibiotikum érzékenységi vizsgálatok

Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok kivitelezése és a gátlási zónák értékelése az EUCAST ajánlása (121) alapján történt. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok minőségi kontrolljához az *E. coli* ATCC 25922 törzset használtuk.

Az ESBL-termelés megerősítő vizsgálatot módosított DDST (kétkorong szinergizmus teszt (122) alapján végeztük. A vizsgálat során öt korongot használunk: Mueller-Hinton táptalaj közepére elhelyezünk egy amoxicillin/klavulánsav (20 µg/10 µg) korongot és ettől 20-20 mm-re további cefotaxim (30 µg), ceftazidim (30 µg), cefepim (30 µg) és aztreonam (30 µg) tartalmú korongokat helyezünk el. ESBL-termelés esetében a cefalosporinok és monobaktám körüli gátlási zóna az amoxicillin/klavulánsav tartalmú korong felé torzul az ESBL-enzim működés gátlása miatt. Emellett ertapenem (30 µg) koronggal szűrtük a karbapenem rezisztenciát.

Az ESBL-termelést megerősítő vizsgálat után további antibiotikumok (MAST Diagnostica GmbH, Reinfeld, Németország) érzékenységi vizsgálatát végeztük el korongdiffúzióval: ceftriaxon (30 µg), ceftazidim (30 µg), cefotaxim (5 µg), ceftazidim/avibactam (20 µg/10 µg), ertapenem (10 µg), ciprofloxacín (5 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), gentamicin (30 µg), amikacin (30 µg), tobramycin (30 µg), tigeciklin (15 µg) és cefiderocol (30 µg).

Az izolátumok MIC értékének meghatározását MIC grádiens tesztcsíkkal (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Olaszország) vagy mikroleves hígítással (MICRONAUT-S *Pseudomonas* MIC teszt, Bruker, Bremen, Németország) végeztük el ceftazidimre (0,016–256 mg/l), ceftriaxonra (0,016–256 mg/l), ceftazidim/avibactamra (0,016/4-256/4 mg/l), ertapenemre (0,002-32 mg/l), cefotaximra (0,016–256 mg/l), gentamicinre (0,016–256 mg/l, amikacinra (0,016–256 mg/l), tobramycinre (0,016–256 mg/l) ceftolozan/tazobactamra (1/4-8/4 mg/l), aztreonamra (1-16 mg/l), cefepimre (1-8 mg/l), piperacillinre (4-32 mg/l), piperacillin/tazobactamra (1/4-128/4 mg/l), trimethoprim/sulfamoxazolra (1/19-8/152 mg/l), aztreonam/avibactamra (0,016/4-256/4 mg/l) és levofloxacinra (0,125-8 mg/l).

A colistin (1-8 mg/l), meropenem (0,125-16 mg/l), imipenem (1-8 mg/l) és ciprofloxacin (0,06-8 mg/l) antibiotikum érzékenységi vizsgálatot MICRONAUT MIC-Strip leveshígítós módszerrel (MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim, Németország) vagy az EUCAST ajánlása alapján végeztük el (123).

3.4. Molekuláris vizsgálatok

3.4.1. ESBL-termelő *Escherichia coli* ST131 izolátumok vizsgálata multiplex, filogenetikai PCR-rel

Az ESBL-termelő *E. coli* izolátumok esetében a Matsumura és munkatársai (124) által kidolgozott ST131 specifikus multiplex PCR módszert alkalmaztuk, amely képes kimutatni és elkülöníteni a ST131 kládjait, valamint a C1-M27 és C2 alkládokat (4. táblázat).

4. táblázat: *E. coli* ST131 multiplex PCR primerei

Funkció	Primer	Nukleotid szekvencia (5'-3')	Amplikon méret (bp)	Referencia
ST131 specifikus régió	ST131_R19-YF1	AGCAACGATATTTGCCCAT T	580	Matsura és mtsai., 2017 (124)
	ST131_R19-YR1	GGCGATAACAGTACGCCAT T		
C1 klád	C1-578spe-YF1	GGCCCCACAAATTGCTT	337	
	C1-898-YR1	CGCACCTCCGATACCAAA		
M27PP1 régió (C1-M27 alklád)	M27PP1C-YF1	TGAATCAAAGGTCCGAGCT G	232	
	M27PP1C-YR1	TATGGCTGGCAGATGCTTT A		
<i>nrdI</i> SNP (C2 alklád)	<i>nrdI</i> -534spe2 YF1	ACGGATTCAGGTAGACGAT T	164	
	<i>nrdI</i> -678R	CCTCACCAAAGTTGCGATT AC		

3.4.2. ESBL-termelő *Escherichia coli* ST131 izolátumok PFGE vizsgálata

Az antibiotikum rezisztencia NRL több mint 20 éve működteti a pulzáltatott-mezejű gélelektroforézissel történő makrorestrikciós profil vizsgálaton alapuló Nemzeti Tipizáló Adatbázist. Az ebben az időszakban összegyűjtött makrorestrikciós profil felhasználható volt a regionális, nemzeti helyzet elemzésére. A PFGE vizsgálatok eredménye sok esetben összevethetőek a nemzetközi adatokkal. A tipizálás alapján a fágtipizálási osztály meghatározott egy ST131-re jellemző pulzotípust.

Az Enterobacteriaceae izolátumok genetikai rokonságának meghatározásához a CDC (Centers for Disease Control and Prevention) *E. coli* O157:H7 PFGE standardizált protokollt használtuk (125). Vizsgálat Chef-DR II rendszerrel (BioRad, Kalifornia, CA, USA) és a kiértékelés Fingerprinting II Software-el (Bio-Rad Laboratories, Ventura, CA, USA) alkalmazásával történt. A mintázatok hasonlóságának jellemzéséhez Dice koefficienszt alkalmaztunk és az UPGMA klaszter analízissel szerkesztettünk dendrogramot. Egy pulzotípusba tartozónak tekintettük a legalább 85% hasonlóságot mutató mintázatokot, ezek között klonális kapcsolatot feltételeztünk.

3.4.3. Genomiális DNS kivonása

A DNeasy UltraClean Microbial Kittel (Qiagen, Hilden, Németország) végeztük el DNS kivonást a baktérium tenyészetből a gyártó utasításainak megfelelően. Az eljárás a baktériumsejtek kémiai és fizikai feltárását, majd egy sor tisztítási lépést és a magas tisztaságú genomiális DNS (gDNS) kivonását tartalmazta. A gDNS mennyiségét a Qubit 3.0 fluorométerrel (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) mértük meg.

3.4.4. Teljes genom szekvenálás: Short-read szekvenálás

A short-read szekvenáláshoz a genomiális könyvtárt az Illumina DNS Prep kittel (Illumina, San Diego, CA, USA) készítettük el. A gyöngyhöz kötött transzposzómák segítségével a gDNS mintákat fragmentáltuk és a fragmentumok mindkét végéhez adaptor szekvenciákat ligáltunk. A bemeneti DNS-sel való telítődés után a gyöngyalapú transzpozomális komplex meghatározott számú DNS molekulát fragmentál. Így normalizált fragmensek keletkeznek egy szűk fragmensméret tartományban. A fragmentumokat ezután PCR-rel amplifikáltuk egy kettős indexelő primerpár segítségével, és a tisztítási lépések végén a termékek átlagosan fragment hossza ~500-550 bp méretűek lettek. A genomális könyvtár minőségének értékelését TapeStation 2200 automatizált elektroforézis rendszerrel (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) végeztük el, a mennyiségét Qubit 3.0-al mértük le.

A poolozott genomiális könyvtárt Illumina MiSeq platformmal (2x150 bp pair-end szekvenálással) szekvenáltuk meg. A szekvenálás minőségét megfelelőnek tekintettük, amennyiben teljesültek a következő futási minőségi paraméterek: Q30 (%): >80, Cluster Density (K/mm²): 600-1200, Clusters Passing Filters (%): ≥80.

A nyers DNS szekvencia adatokat feldolgozását az EnteroBase pipeline segítségével végeztük el (126). Az EnteroBase olyan online platform, amely a szekvenálási adatok *de novo* összeszerelésére egy automatizált pipeline-t alkalmaz. A short-readek beolvasását követően az EnteroBase teljes genom automatikus összeszerelését biztosítja a QAssembly segítségével. A QAssembly több feladatot végez el, beleértve az read-ek minőségi trimmelését (QAssembly: Sickle), összeszerelést

(QAssembly: Spades), utólagos korrekciót és szűrést (QAssembly: BWA), valamint az eredmények fasta formátumba való konvertálását (QAtaFasta). Ezt követi az összeszerelt draft genomok minőségi értékelése (QA evaluation).

A draft genom minőségét akkor tekintettük megfelelőnek, ha a kontigok átlagos szekvenálási mélysége meghaladta az 50-szerest, teljes méretük megegyezett a várható genommérettel ($5 \pm 0,3$ Mb), és az N50 nagyobb volt, mint 100 kbp.

A short-read szekvenálás előnye, hogy nagyon nagy számú read szekvenálására képes nagy lefedettséggel és nagy pontossággal (~99%), sok minta párhuzamos szekvenálásával (127). Azonban a megszekvenált readok hossza néhány száz bp (max 600 bp), ami a genom összeszereléskor a legtöbb esetben sem képes elegendő átfedést létrehozni a DNS fragmentumok között. A ismétlődő elemek (IS, transzpozonok), illetve az ehhez kapcsolódó antibiotikum rezisztencia vagy virulencia gének plazmid vagy kromoszóma lokalizációját nem lehet biztonságosan meghatározni ezzel a módszerrel (128). A short-read eredmények alapján választottunk ki long-read szekvenálásra a reprezentatív izolátumokat, hogy arányosan képviseljék a főbb genetikai markerekkel rendelkező klasztereket, amelyek különböző izolálási évekből (2015-2018, 2021, 2023) és egészségügyi intézményekből származtak.

3.4.5. Teljes genom szekvenálás: Long-read szekvenálás

A long-read szekvenálás átlagosan 10-100 kb hosszúságú DNS szakaszok leolvasására alkalmas (128). A teljes genom összeszerelés a long-readekből kiküszöböli az ismétlődő elemek felismeréséből származó problémákat. Ezzel a módszerrel tudtuk elemezni a plazmidokat, az MGE és ESBL géneket és azok lokalizációját. A legnagyobb hibája, hogy pontatlanabb (magasabb a hiba aránya az egy leolvasásra jutó pontosság esetén, ami miatt molekuláris epidemiológiai vizsgálatokhoz jelenleg még kevésbé használható), alacsonyabb áteresztőképességgel rendelkeznek és drágább, mint a short-read szekvenálás (128).

A kiválasztott izolátumok génkönyvtárát a Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109, Oxford Nanopore, Oxford, UK) segítségével hoztuk létre, amit vonalkódos szekvenciával (barcode) láttunk el az azonosítási érdekében (Native Barcoding

Expansions 96 (EXP-NBD196, Oxford Nanopore, Oxford, UK). A folyamat során DNS végeket NEBNext End Repair/dA-tailing modul segítségével javítottuk és készítettük elő az adaptor molekulákra. Ezután egyedi vonalkóddal ligáltuk a szekvenciákat, amit a szekvenáló adaptorok ligálása és egy sor tisztítási lépés követett. A szekvenálást a MinION Mk1C (Oxford Nanopore, Oxford, UK) szekvenáló készülékkel végeztük el. A basecalling (fast basecalling mode) és a long-read szekvenciák demultiplexálását a MinKNOW v 21.11.6-ban illesztett Guppy v5.1.12 programmal végeztük.

A nyers long-read adatok feldolgozását a következő GalaxyEU online (<https://nanopore.usegalaxy.eu>) eszközkészlet segítségével végeztük el az alapértelmezett paraméterekkel: A minőségi trimmeléshez és a vonalkódok eltávolításához a Porechope v0.2.4 (129) programot használtuk. Ezután többszörös összeszerelést végeztünk: először a Flye v2.9.1 (130) segítségével összeállítottuk a long-readeket és az összeszerelt szekvenciákat Pilon v1.20-al políroztuk (131). Ezt követte a hibrid összeszerelés az Unicycler v0.5.0 (132) programmal, ami a short-read szekvenálásból származó szekvenciákat a long-read szekvenciákkal együtt szereli össze. A BWA MEM v0.7.17 (133) programot használtuk a hibrid szekvencia és a short-read referencia readok illesztésére. A hibás egyezések arányának csökkentése érdekében egy újabb genom polírozási kört alkalmaztunk Pilon v1.20-al (131). A polírozott Flye és polírozott Unicycler összeszereléseket egyszerre elemeztük.

Végül a kevésbé fragmentált összeszereléseket választottuk ki az izolátumok reprezentatív hibrid genom összeszerelések vizsgálatára: A további elemzéshez 29 Flye-összeállítást és nyolc Unicycler-összeállítást kaptunk. Az összeállítási statisztikákat a Quast v5.0.2 (134) segítségével nyertük ki. A hibrid genomok annotációjához a Prokka v1.14.6 programot használtuk (135).

3.4.6. Izolátumok filogenomikai rekonstrukciója és klaszterezése

A Prokka által elkészített genom annotációk szolgáltak bemenetként a Panaroo v1.1.2 (136) számára, hogy rekonstruálja az izolátumok core genom összehasonlítását. A Panaroo alapértelmezett értékeit használtuk, azzal a különbséggel, hogy a core

illesztésekbe való felvételhez a gének gyakoriságának küszöbértékét 99%-ra növeltük (-core-threshold 0.99). Összesen 3788 gén került be a core genomba. Az izolátumok filogenetikai kapcsolatait az IQtree v2.2.3 (137) segítségével rekonstruáltuk, automatikus modell választással ModelFinderPlus segítségével (-m MFP), és az eredmények robusztusságát 1000 aLRT és 1000 ultrafast bootstrap replikációkkal értékeltük. A fastBAPS v1.0.8 (138) R v4.2.2 (139) csomagot használtuk a populáció struktúrában levő klaszterek azonosítására az optimise_baps priors használatával. Egyetlen küszöbérték (single threshold) használata helyett a fastBAPS algoritmust alkalmaztuk, amely statisztikai genetikai modelleken alapszik a molekuláris variáció hatékony felosztásával (140), valamint független a filogenetikai rekonstrukciótól. Az "optimise.baps" BAPS priors-t az optimise_prior funkcióval optimalizáltuk. Ezután a fastbaps R csomagban szereplő fastp_baps és best_baps_partition funkciókat használtuk a legjobb klaszterezési séma meghatározásához, amely leírja az adathalmaz genetikai klasztereit. Mind az IQtree, mind a fastBAPS a teljes core genom többszörös szekvencia illesztését használta bemenetként. A fastBAPS klaszterezés eredményeit a filogenetikai fával együtt a ggtree v3.6.2 (141) R-csomag segítségével vizualizáltuk, amelyhez a filogenetikai fa középponti gyökerezését a phangorn v2.11.1 (142) segítségével végeztük el. A filogenetikai fákat és a minta metaadatait az Interactive Tree of Life (iTOL v6.7.4) webes eszközzel (143) vizualizáltuk.

A prospektív és karbapenem rezisztens izolátumok vizsgálatában szereplő izolátumok esetén a lehetséges klonális kapcsolatokat core genom (cg)MLST (SeqSphere+) segítségével vizsgáltuk. A klasztertípust (CT) úgy határoztuk meg, hogy egy csoporton belül az azonos klónhoz tartozó izolátumok ≤ 10 allél különbséggel (CT küszöbérték) rendelkezzenek. A prespektív vizsgálatban szereplő ST131 izolátumokat összehasonlítottuk három nemzetközi *E. coli* ST131 genommal (C1-M27: EC81009 (144) és H105 (145), C2/H30Rx: JJ2434 (86), amelyeket a GenBankból nyertünk, hogy feltárjuk az ST131 alkládba tartozó izolátumok közötti rokoni kapcsolatot.

3.4.7. Virulencia és antibiotikum rezisztencia gének elemzése

Az antibiotikum rezisztencia géneket a ResFinder v4.1 (146) CGE (Center for Genomic Epidemiology) online eszközökkel azonosítottuk (<https://www.genomicepidemiology.org/>). A gén jelenlétét akkor fogadtuk el, ha az azonosság és a lefedettség > 90%-os volt. A virulencia géneket a VirulenceFinder v2.0 (147) és a Virulence Factors Database (VFDB v2020-Feb-28 a SeqSphere+ (148)) online eszközök segítségével elemeztük. Az M27PP1 profág-szerű régió jelenlétét összehasonlítottuk a KUN5781 izolátumban (93) található szekvenciáival. Az ST131 izolátumok A-D virotípusait a Blanco és munkatársai által 2013-ban kidolgozott séma szerint rendeltük hozzá (120). A *bla*_{CTX-M} és genetikai környezetének szekvencia-homológia összehasonlításához és vizualizálásához a Clinker v0.0.27 (149) programot használtuk.

3.4.8. Plazmid szekvenciák jellemzése

A plazmid tartalmat és a mobilis genetikai elemeket a CGE programjaival elemeztük. A plazmid replikonokat és ezáltal a plazmid típusokat a PlasmidFinder v2.1-el vizsgáltuk (91). A plazmid MLST-t a pMLST v2.0 (91) programmal határoztuk meg, amivel megkaptuk a plazmidok szekvencia típusát (FAB formuláját) (150).

A MGE-en található, virulencia és a rezisztencia gének inszerciós elemek, szekvenciák azonosítására és összehasonlítására a Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) és az MGE v1.0.3 (151) online eszközöket használtuk. A plazmid szekvenciák összehasonlításához és vizualizálásához a BRIG v0.95 (152) és Clinker v0.0.27 programokat használtuk.

A szekvencia hasonlóság (lefedettség és azonosság) meghatározásához a prospektív vizsgálatban szereplő izolátumok szekvenciáit összevettük az ST131-hez kapcsolható pEC-81009, az uk_P46212 és a pU1 referencia plazmid szekvenciához. A read-eket trimmeltük és BWA (SeqSphere+) segítségével illesztettük a referencia plazmid szekvenciákhoz. Az illesztett szekvenciák homológiáját BLASTn segítségével

elemeztük. A pEC-81009 (C1 kládok referencia plazmidja, a replikon 1. csoportja: IncF(F1:A2:B20); CP021180), az uk_P46212 plazmid (C2 kládok referencia plazmidja, a replikon 2. csoportja: IncF(F2:A1:B-); CP013657) és a pU1 (IncF(F1:A1:B16); MK295825) referencia plazmid szekvenciáit, valamint azok terminológiáit és definícióit Kondratyeva és mtsai. metaanalíziséből (96) nyertük, valamint a GenBankból származnak.

3.5. Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzéshez a Fisher-féle egzakt tesztet egy online programban végeztük el (<https://www.socscistatistics.com/tests/fisher/default2.aspx>). A statisztikai vizsgálatokhoz három megközelítést alkalmaztunk: 1. két változó közötti függetlenség vizsgálatát (virulencia- vagy rezisztencia gén jelenléte vagy hiánya két alklád izolátumhoz képest); 2. két változó közötti függetlenség vizsgálatát (fenotípusos antibiotikum rezisztencia jelenléte vagy hiánya két alklád izolátumaihoz képest); 3. két változó közötti függetlenség vizsgálatát (fenotípusos antibiotikum rezisztencia az antibiotikum rezisztencia gének jelenlétéhez vagy hiányához képest). Minden egyes összehasonlításnál a $p < 0,05$ értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

A prospektív monocentrikus vizsgálat során az *E. coli* okozta invazív fertőzések incidenciáját illetve incidenciasűrűségét 1000 kórházi felvételre, illetve 1000 betegnapra számítottuk ki.

4. Eredmények

4.1. Egy prospektív, monocentrikus felmérés keretében gyűjtött *Escherichia coli* izolátumok vizsgálata, 2018. október-november

2018. október és november között a Dél-Pesti Centrumkórházból származó, véráramfertőzésből kitenyészett összes *E. coli* izolátumot bevontuk a vizsgálatba. A vizsgálati időszakban kitenyészett 25 *E. coli* izolátumból hat (24%) bizonyult rezisztensnek a harmadik generációs cefalosporinokkal szemben: Ec1-Ec6 (Függelék, táblázat 1.). A 3GCR *E. coli* incidenciája sűrűsége 0,11 volt 1000 betegnapra viszonyítva, míg az 1000 kórházi felvételre számított incidenciája 0,79 volt. A Dél-Pesti Centrumkórház által gyűjtött hat izolátum közül kettő a Hematológiai és Össejt- transzplantációs Osztályról, kettő a Infektológia Osztályról, egy az Intenzív Osztályról és egy az I. Belgyógyászati Osztályról származott. A betegek átlagéletkora 70 év volt (38-90 év), a nemek aránya 1:1 volt. A fenotípusos megerősítő tesztek alapján mindegyik izolátum ESBL-termelőnek bizonyult.

4.1.1. ESBL-termelő *E. coli* izolátumok antibiotikum érzékenysége

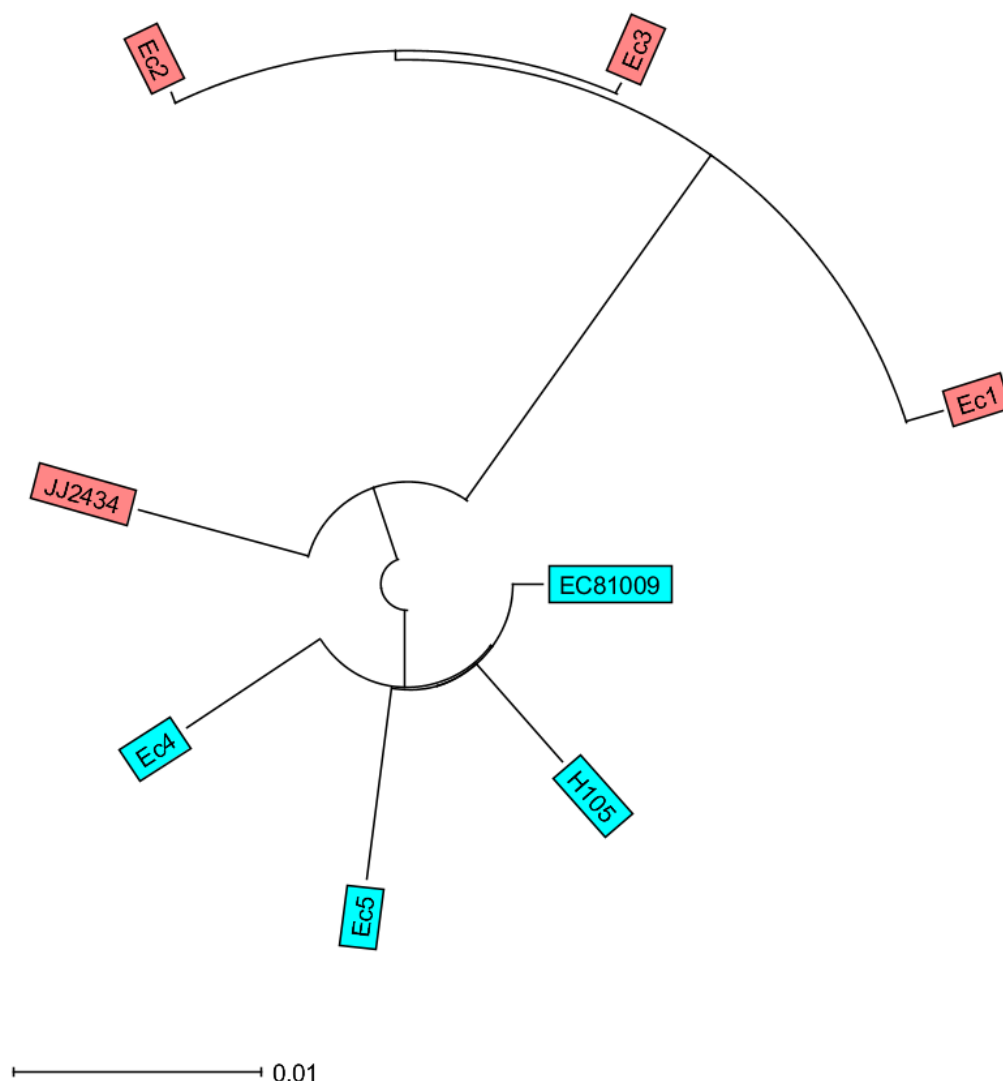
Mindegyik izolátum rezisztens volt ceftriaxonnal, cefotaximmal és ciprofloxacinnal szemben, de érzékenyek bizonyultak colistinre, ceftazidim/avibactamra és karbapenemekre (5. táblázat). Az Ec1, Ec2 és Ec3 rezisztenciát mutatott a ceftazidim, gentamicinnal és tobramycinnal szemben is. Ezenkívül az Ec3, Ec5 izolátumok rezisztenciát mutattak a tigeclinnel, az Ec6 pedig az amikacinnal szemben.

5. táblázat: A 6 ESBL-termelő *E. coli* izolátum antimikrobiális érzékenysége. Az alkalmazott antibiotikumok a következők voltak: ceftriaxon (CRO), ceftazidim (CAZ), cefotaxim (CTX), ceftazidim/avibactam (CZA), ertapenem (ETP), meropenem (MEM), imipenem (IMI), ciprofloxacin (CIP), gentamicin (GM), amikacin (AK), tobramycin (TM), tigecliklin (TGC), colistin (COL).

Antimikrobiális hatóanyag		Izolátumok MIC értékei (mg/l)					
		Ec1	Ec2	Ec3	Ec4	Ec5	Ec6
Cefalosporinok	CRO	256	256	256	256	256	256
	CAZ	32	32	32	4	4	4
	CTX	≥256	≥256	≥256	64	64	≥256
	CZA	1	0,5	1	0,5	0,25	0,125
Karbapenem	ETP	0,125	0,125	0,125	0,008	0,008	0,016
	MEM	0,064	0,125	0,064	0,032	0,032	0,032
	IMI	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
Fluorokinolon	CIP	256	64	64	64	64	16
Aminoglikozid	GM	16	64	64	2	1	0,5
	AK	2	4	2	4	4	16
	TM	8	32	8	1	2	1
Glicilciklin	TGC	0,25	0,5	1	0,25	1	0,125
Egyéb hatóanyag	COL	0,125	0,25	0,125	0,25	0,25	0,064

4.1.2. ESBL-termelő *E. coli* izolátumok molekuláris epidemiológiai vizsgálata

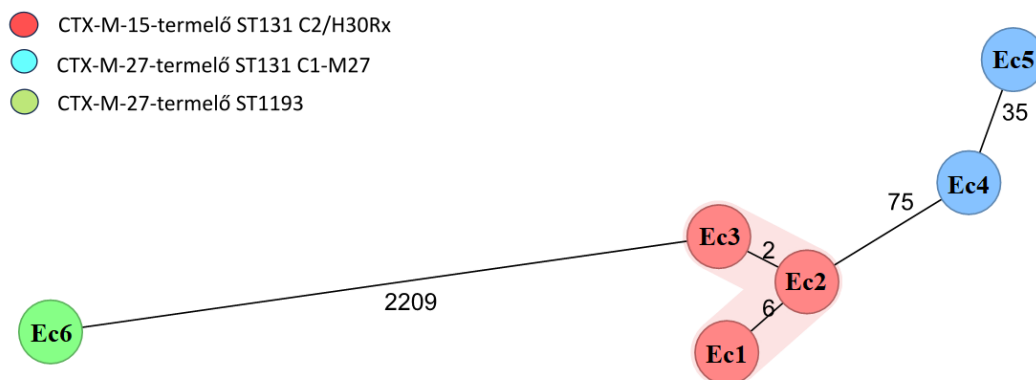
A vizsgált izolátumokat az MLST alapján két szekvencia típusba soroltuk: egy izolátum (Ec6) az ST1193-hoz, öt izolátum (Ec1-Ec5) a globálisan domináns ST131 klónhoz (O25:H4 szerotípus) tartozott. Az ST131 a törzsek két különböző tulajdonságokkal rendelkező, elkülönülő csoportját foglalta magában. Az első csoportba három izolátum tartozott Ec1, Ec2, Ec3. A második csoportba az Ec4 és Ec5 izolátum tartozott. Az öt ST131 izolátumot egy C2/H30Rx (JJ2434) és két C1-M27 (H105, EC81009) nemzetközi ST131 ESBL-termelő *E. coli* izolátummal hasonlítottuk össze, azért, hogy meghatározzuk az izolátumok ST131-en belüli alcsoport specifikus kapcsolatát (9. ábra).



9. ábra: Az *Escherichia coli* izolátumok ST131 alklád specifikus filogenetikai törzsfája. A SeqSphere+ cgMLST 2517 allélból generált *E. coli* ST131 izolátumok gyökértelen filogenetikai fája. A kék szín a 131-es szekvencia típus C1-M27 alkládot míg a piros a C2/H30Rx alkládjának jelöli.

A JJ2434 nemzetközi izolátum és az Ec1, Ec2, Ec3 izolátumok (amit az első csoportnak neveztünk) az ST131 C2/H30Rx alkládjába tartozott. A H105 és az EC81009 irodalomból ismert izolátumok a mi vizsgálatunkból származó Ec4, Ec5 izolátummal együtt az ST131 C1-M27 alkládba tartoztak.

A cgMLST szerint a három hazai C2/H30Rx alkládba tartozó *E. coli* ST131 izolátum szoros genetikai rokonságot mutatott (≤ 6 allél különbség), míg C1-M27 izolátumok 35 allél különbséggel különböztek egymástól. Az ST1193 izolátum ≥ 2209 alléllal különbözött minden más izolátumtól (10. ábra).



10. ábra Az ESBL-termelő *Escherichia coli* izolátumok core genom MLST-alapú minimális feszítő fája. A SeqSphere+ cgMLST 2517 allélból generált *Escherichia coli* ST131 izolátumok minimális feszítő fája. A klaszterek küszöbértéke ≤ 10 . A színek a csoport törzseinek különböző genotípus jellemzőit és szekvenciatípusait jelzik. Az allélkülönbségek száma a két csomópont között van feltüntetve.

4.1.3. ESBL-termelő *E. coli* izolátum rezisztom és virulom jellemzése

Az ST31 C2/H30Rx izolátumai közül két izolátum *bla*_{CTX-M-15}-öt és egy izolátum *bla*_{CTX-M-15}-öt és *bla*_{TEM-1B}-t hordozott. Az ST131 C1-M27 és az ST1193 izolátumai *bla*_{CTX-M-27}-et hordoztak. Kizárólag az Ec4 és az Ec5 hordozta a C1-M27 klád-specifikus M27PP1 genomszigetet. További különbséget találtunk a két ST131 alklád között a rezisztencia gének tekintetében, mint például a fluorokinolon rezisztenciáért felelős *qnrB* gént és az aminoglikozid rezisztenciáért felelős *aac(3)-IIa* gént, amelyek csak a C2/H30Rx izolátumokban voltak jelen. A többi izolátumtól eltérően a ST1193 izolátum *parE* génjében egy aminosavcserét találtunk (L416F) és nem rendelkezett *qnrB* és *aac(3)-IIa* génekkel. Az ST131 csoportba tartozó izolátumok további rezisztencia génjeik

hasznosak voltak. Az izolátumok rezisztencia és plazmid replikon típusainak jellemzőit az 6. táblázat tartalmazza.

6. táblázat: Az ESBL-termelő ExPEC törzsek rezisztenciája és plazmidreplikonjai. Az izolátumok szerzett antibiotikum rezisztencia génjeit, illetve a rezisztenciával kapcsolatos pontmutációit tartalmazza a táblázat. A + a gén jelenlétét, a * kromoszómális fluorokinolon rezisztenciát meghatározó régió mutációit, a ‡ pedig plazmid által közvetített fluorokinolon rezisztenciát jelzi.

Izolátum		Ec1	Ec2	Ec3	Ec4	Ec5	Ec6
MLST		ST131	ST131	ST131	ST131	ST131	ST1193
Alklád		C2/ H30Rx	C2/ H30Rx	C2/ H30Rx	C1- M27	C1- M27	-
β-laktámok	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	+	+	+			
	<i>bla</i> _{CTX-M-27}				+	+	+
	<i>bla</i> _{TEM-1}		+				
Fluoro- kinolonok	<i>gyrA</i> * (S83L)	+	+	+	+	+	+
	<i>gyrA</i> * (D87N)	+	+	+	+	+	+
	<i>parC</i> * (S80I)	+	+	+	+	+	+
	<i>parC</i> * (E84V)	+	+	+	+	+	
	<i>parE</i> * (I529L)	+	+	+	+	+	
	<i>parE</i> * (L416F)						+
	<i>qnrB19</i> ‡	+	+	+			
MLS	<i>mph(A)</i>	+		+	+	+	+
	<i>mdf(A)</i>	+	+	+	+	+	+
Szulfon- amidok	<i>sul1</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>sul2</i>	+	+	+	+	+	+
Tetra- ciklinek	<i>tet(A)</i>	+	+	+	+	+	+

Trimetho-prim	<i>dfrA17</i>	+		+	+	+	+
	<i>dfrA1</i>		+				
Amino-glikozidok	<i>ant(3'')-Ia</i>		+	+			
	<i>aadA1</i>		+				
	<i>aadA5</i>	+		+	+	+	+
	<i>aph(3'')-Ib</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>aph(6)-Id</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>aac(3)-IIa</i>	+	+	+			
Plazmid replikon típusok		IncFIB IncFIA IncFII Col156 Col(pH AD28)	IncFIB IncFII IncQ1 Col828 2 Col(pH AD28)	IncFIB IncFIA IncFII Col156 Col(pH AD28)	IncFIB IncFIA IncFII Col156 Col828 2 Col(pH AD28)	IncFIB IncFIA IncFII	IncFIB IncFIA IncFII Col156 Col(BS 512)

Annak érdekében, hogy minél pontosabb short-read szekvencia alapú plazmid elemzést végezhesünk, az irodalomból vett Csoport 1 replikonokat (IncFII_1, IncFIA_2, IncFIB_20) és Csoport 2 replikonokat (IncFII_2, IncFIA_1) használtuk a C1-M27 és C2/H30Rx alkládokra jellemző plazmidok azonosításához. Három plazmid családot mutattunk ki az izolátumok között, amelyek az IncF, IncQ és Col-szerű voltak. Az IncF replikonok minden izolátumban jelen voltak, de csak a C1-M27 ST131 izolátumok (Ec4, Ec5) hordozták a Csoport 1 replikonokat. A Csoport 1 (F1:A1:B20) referencia plazmid szekvencia homológia az Ec4 és az Ec5 izolátumokkal 96%, illetve 72% volt (7. táblázat). A C2/H30Rx izolátumok (Ec1-Ec3) egyike sem hordozta a 2. csoport két referencia replikonját (IncFII_2, IncFIA_1). Az Ec2 nem hordozott IncFIA replikont, de hordozta az IncFII_2 replikont. A Csoport 2 (F2:A1:B-) referencia plazmid szekvencia homológiája az Ec1, Ec2 és Ec3 izolátumokkal 70%, 47%, illetve 70% volt. Az Ec1 és az Ec3 szekvenciája nagyobb homológiát mutatott a pU1 plazmid szekvenciájához, mint a Group2 referenciához képest ($\geq 91\%$ vs. 70%). Az ST1193 izolátumok IncFII_4-szerű,

IncF1A_1, IncFIB_10, valamint a repCol156 és repCol(BS512) replikonokat hordoztak. A Col(pHAD28), Col156 és Col8282 replikonok legalább egy ST131 izolátumban jelen voltak.

7. táblázat: Az ST131 izolátumok és a referencia plazmidok szekvencia homológiája.

Az Csoport 1 plazmid (135,7 Kb) a CTX-M-27-et kódoló IncF(F1:A2:B20) plazmidnak, a Csoport 2 plazmid (143,7 Kb) a CTX-M-15-öt kódoló IncF(F2:A1:B-) plazmidnak, a pU1 (144 Kb) pedig az IncF(F1:A1:B16) plazmidnak felel meg.

Izolátum	ST131 alklád	Referencia plazmid	Lefedettség	Azonosság
Ec1	C2/H30Rx	Csoport 2	70%	97,89%
		pU1	91%	99,29%
Ec2	C2/H30Rx	Csoport 2	47%	99,20%
		pU1	52%	96,67%
Ec3	C2/H30Rx	Csoport 2	70%	97,21%
		pU1	92%	99,87%
Ec4	C1-M27	Csoport 1	96%	99,93%
Ec5	C1-M27	Csoport 1	72%	99,83%

Az ST131-hez tartozó izolátumok virulencia gének hasonlóak voltak (8. táblázat). Különbséget találtunk a vasfelvevő fehérjéket kódoló gének (az *iroBCDEN* géneket kizárólag az Ec2 hordozta) valamint több toxin gén között. Két virotípust tudtunk megállapítani az izolátumoknál. A négy ST131 izolátumnak (Ec1, Ec3-5) C virotípusa, az Ec2 ST131 izolátumnak pedig B virotípusa volt.

8. táblázat: Az ESBL-termelő ExPEC-törzsek virulencia génjei. A + jelzi a gén jelenlétét. NA: nem alkalmazható.

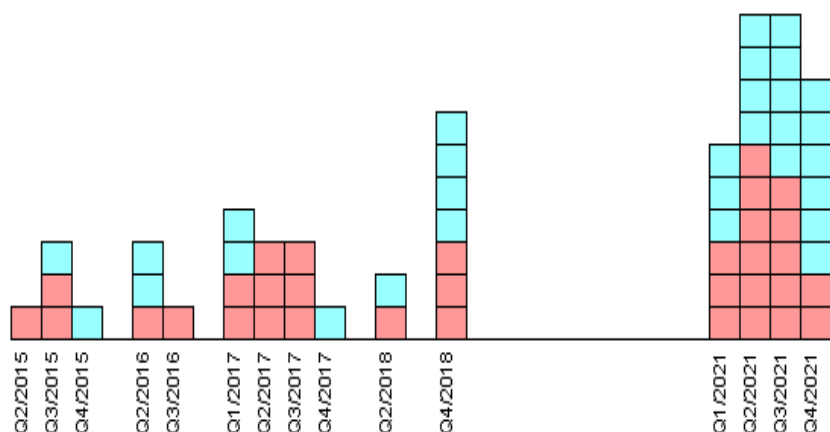
Izolátum		Ec1	Ec2	Ec3	Ec4	Ec5	Ec6
MLST		ST131	ST131	ST131	ST131	ST131	ST1193
Alklád		C2/ H30Rx	C2/ H30Rx	C2/ H30Rx	C1-M27	C1-M27	-
Adhezi- nek	<i>fimA</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>fimB</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>fimC</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>fimD</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>fimE</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>fimF</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>fimG</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>fimH</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>fimI</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>sfaX</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>mat operon</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>iha</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>crl</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>csq operon</i>	+	+	+	+	+	+
Invazinok	<i>aslA</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>kpsD</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>kpsM</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>kpsT</i>						+
	<i>ibeB</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>usp</i>	+	+	+	+	+	+
Vas felvétel	<i>chu operon</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>sit operon</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>fyuA</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>iutA</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>iucA</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>iucB</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>iucC</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>irp2</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>iroBCDEN</i>		+				
Protektin/ szérum reziszen- cia	<i>ompT</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>iss</i>	+	+	+	+	+	
	<i>Bor</i>	+	+	+	+	+	
	<i>gad</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>traT</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>traD</i>	+	+	+	+	+	
	<i>neuA</i>						+

	<i>neuC</i>						+
Toxin gének	<i>astA</i>	+	+	+			
	<i>sat</i>	+	+	+	+	+	+
	<i>vat</i>						+
	<i>senB</i>	+		+	+		+
	<i>hlyF</i>		+				
Virotípus		C	B	C	C	C	NA

4.2. Retrospektív, multicentrikus vizsgálat a C2/H30Rx és C1-M27 ST131 izolátumok populáció struktúrájának feltérképezésére, 2015-2018, 2021

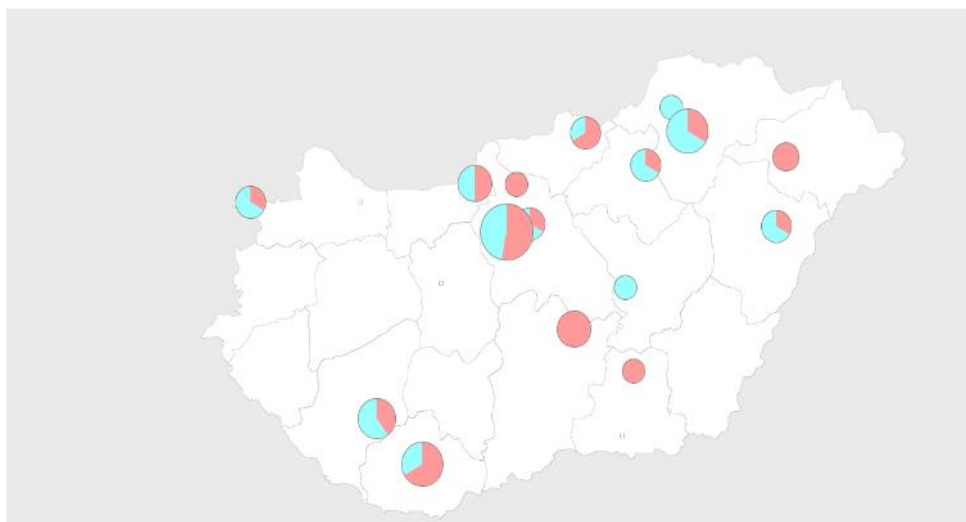
4.2.1. Kiválasztott izolátumok adatai

A multicentrikus retrospektív vizsgálatunkhoz 2015-2018 és 2021 időperiódusból vettük az izolátumokat (11. ábra). Ezt a két időszakot arra használtuk, hogy összehasonlítsuk az ESBL-termelő invazív *E. coli* ST131 izolátumok populáció szerkezetében bekövetkező lehetséges változásokat a COVID-19 világjárvány hazai eseteinek megjelenése előtt és alatt. A 2015-2018 között, valamint 2021-ben a Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központban vizsgált invazív ESBL-termelő *E. coli* izolátumok 59,6%-a (130/218) és 67,7%-a (157/232) tartozott az ST131 klónhoz, ahol a C2/H30Rx és a C1-M27 aránya 1:0,8, illetve 1:0,5 volt.



11. ábra: Az *E. coli* ST131 izolátumok (n=63) megoszlása az izolálás ideje alapján a 2015-2018 és 2021-es évből. A képen szereplő időszávban a törzsek izolálási időpontja negyedéves (Q1-4) időperiódusokban van megadva. A négyzetek színe jelöli a C2/H30Rx (kék) és C1-M27 (piros) izolátumokat, egy négyzet megegyezik egy izolátum izolálási időpontjával.

A vizsgálatban összesen 30 C2/H30Rx és 33 C1-M27 ESBL-termelő *E. coli* ST131 izolátumot választottunk ki (Függelék, Táblázat 2.), amely 21 hazai egészségügyi intézményből származott (12. ábra). A 63 izolátum short-read szekvenálása után kiválasztottunk 30 izolátumot (19 C2/H30Rx és 11 C1-M27) long-read szekvenálásra (Függelék, Táblázat 2.)



12. ábra: Az ESBL-termelő *E. coli* ST131 izolátumok (n=63) földrajzi eloszlása, amely 21 egészségügyi intézményből származott a 2015-2018 és 2021-es periódusból. A körök színe jelölik a C2/H30Rx (kék) és C1-M27 (piros) izolátumokat, a körök méret az izolátumok előfordulási arányát jelöli.

4.2.2. C2/H30Rx és C1-M27 alkládokba tartozó *E. coli* izolátumok antibiotikum érzékenysége

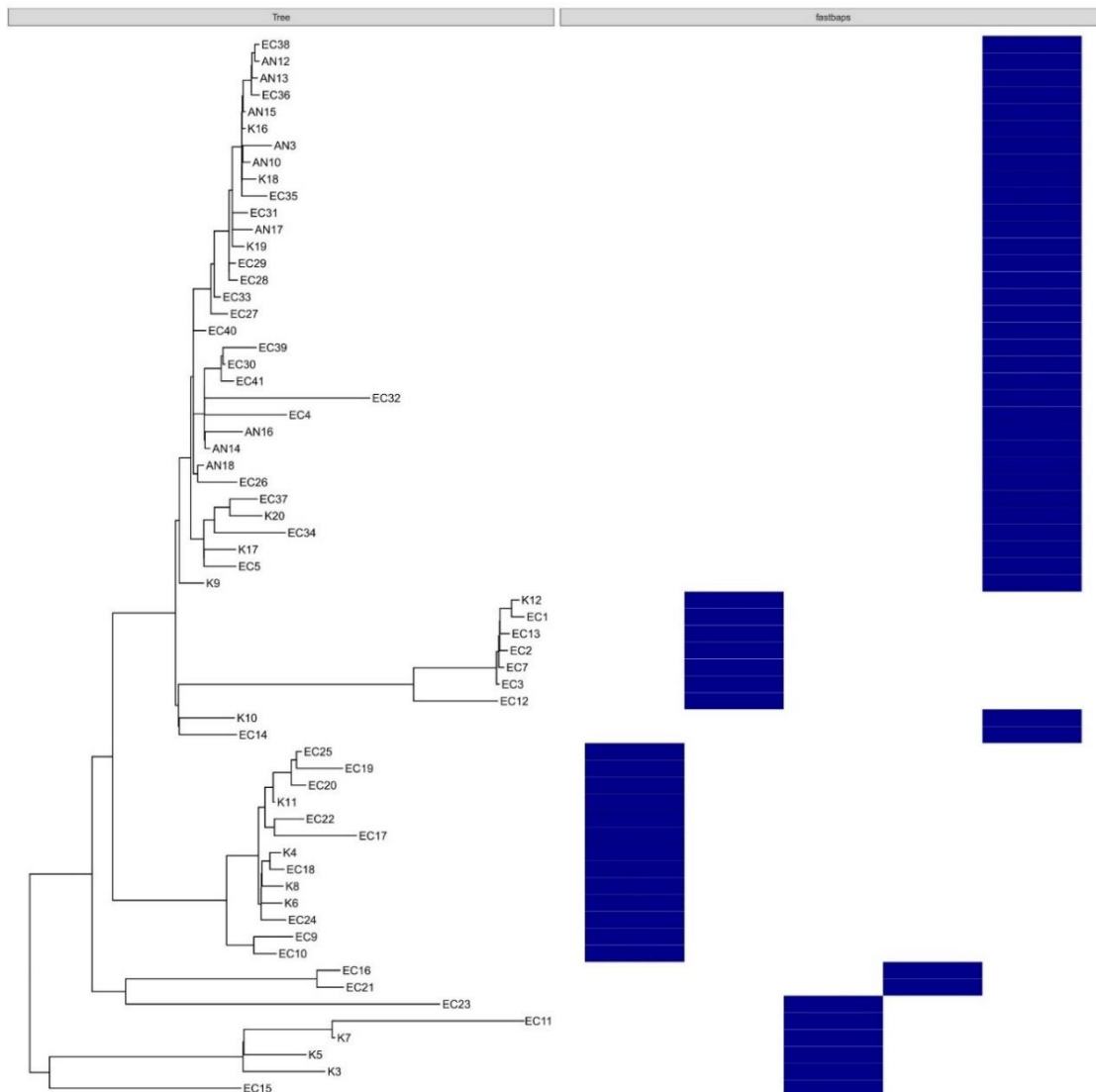
Mind a 63 izolátum rezisztensnek bizonyult a ceftriaxonnal és a ciprofloxacinnal szemben, de érzékeny volt a ceftazidim/avibactammal, ertapenemmel, imipenemmel és meropenemmel szemben. A C2/H30Rx izolátumok szignifikánsan alacsonyabb érzékenységi arányt mutattak a ceftazidimvel, amikacinnal, tobramycinnal és gentamicinnal szemben, mint a C1-M27 izolátumok. Két C1-M27 izolátum rezisztensnek bizonyult colistinre (9. táblázat).

9. táblázat: 30 C2/H30Rx és 33 C1-M27 ESBL-termelő *E. coli* ST131 izolátum antimikrobiális érzékenysége. A 33 C1-M27 és 30 C2/H30Rx *E. coli* ST131 különböző antimikrobiális hatóanyagokkal szembeni érzékenységének összehasonlítása. Az R% a rezisztencia arányának felel meg; a MIC a minimális gátló koncentrációnak felel meg. A MIC_{50/90} az a MIC-érték, amelynél az izolátumok $\geq 50\%$ -a és $\geq 90\%$ -a gátolt. Az NA a nem alkalmazott kifejezésre utal. A *szignifikáns statisztikai értéket a Fisher-féle egzakt teszt segítségével mutattuk ki: $p < 0,05$.

Antimikrobiális hatóanyag	C2/H30Rx			C1-M27			<i>p</i> -érték
	R% (<i>n</i> = 30)	MIC ₅₀ (<i>n</i> = 30)	MIC ₉₀ (<i>n</i> = 30)	R% (<i>n</i> = 33)	MIC ₅₀ (<i>n</i> = 33)	MIC ₉₀ (<i>n</i> = 33)	
Ertapenem	0	0,0625	0,125	0	0,016	0,0625	1
Ceftazidim/ avibactam	0	0,25	0,5	0	0,125	0,25	1
Ceftazidim	83,9	16	64	15,6	4	8	<0,001 *
Ceftriaxon	100	256	256	100	128	256	1
Colistin	0	0,25	0,5	6,3	0,25	1	0,5
Tigeciklin	6,7	NA	NA	3,0	NA	NA	0,60
Amikacin	40	NA	NA	6,1	NA	NA	<0,01 *
Tobramycin	66,7	NA	NA	3,0	NA	NA	<0,001 *
Gentamicin	40	NA	NA	0	NA	NA	<0,001 *
Meropenem	0	NA	NA	0	NA	NA	1
Imipenem	0	NA	NA	0	NA	NA	1
Ciprofloxacin	100	NA	NA	100	NA	NA	1

4.2.3. C2/H30Rx és C1-M27 alkládok molekuláris epidemiológiája

A filogenetikai multiplex PCR-ren alapuló csoportosítást a genom alapú filogenetikai elemzéssel is megerősítettük, amely kimutatta a 33 C1-M27 izolátum elkülönülését az összes többi C2/H30Rx izolátumtól a filogenetikai fán (aLRT > 0,8 és ultrafast bootstrap > 0,95). A C1-M27 izolátumokat egy, míg a C2/H30Rx izolátumokat öt klaszterbe tudtunk csoportosítani (13. ábra). A két alkládban összesen 63 féle virulencia gént és 29 féle antibiotikum rezisztencia gént mutattuk ki. A C1-M27 izolátumoknál a virulencia gének számának mediánja 25 (22-29 közötti tartomány), az antibiotikum rezisztencia géneké 15 (6-16 közötti tartomány) volt. A C2/H30Rx izolátumok virulencia gének számának mediánja 29 (24-31 közötti tartomány) és a rezisztencia gének mediánja 14 (6-18 közötti tartomány) volt. Az alkládokhoz tartozó virulencia és rezisztencia gének a 14. ábra és 15. ábra láthatóak.



13. ábra: A filogenetikai rekonstrukció és a fastBAPS klaszterezés eredményei a Panaroo által készített core genom illesztés felhasználásával. A bal oldali panelen az IQtree által rekonstruktált és a phangorn által midpoint gyökerezett Maximum Likelihood (ML) filogenetikai fa látható. Az ágon található hosszúságok arányosak az izolátumok páronkénti genetikai divergenciájával. A jobb oldali panelen a fastBAPS segítségével azonosított izolátumok klaszterei láthatóak. Minden oszlop különböző klasztereket jelöl, és a különböző oszlopokban a kék színnel jelölt mezők jelzik az izolátum besorolását a megfelelő klaszterbe.

A C1-M27 izolátumok mindegyike hordozta a *bla*_{CTX-M-27}-et és C virotípusa volt. A *traT* szerum rezisztencia gén, *senB*, *mcbA*, *pic* toxin gének és néhány antibiotikum rezisztencia gén (*bla*_{CTX-M-27}, *sul2*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *mph(A)*) szignifikánsan gyakoribb volt a C1-M27 izolátumokban, mint a C2/H30Rx izolátumokban ($p < 0,05$). Valamennyi C2/H30Rx izolátum hordozta a *bla*_{CTX-M-15} gént. A 30 izolátumból hatnál az A virotípus, egynél a B virotípus és 23-nál a C virotípust találtuk. Néhány adhezin (*afa* operon, *nfaE*, *pap* operon), toxin (*cnf1*, *hly* operon, *aslA*), invazin (*daaA-F*, *draA-D*) és a *hra* protectin virulencia gén, valamint néhány rezisztencia gén (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrB19*, *catB3*) csak a C2/H30Rx izolátumokban volt jelen ($p < 0,01$). Az *aac(3)-IIa* nagyobb gyakorisággal fordult elő a C2/H30Rx alklád izolátumai között mint a C1-M27 izolátumoknál (26,7% vs. 6,1%, $p < 0,05$).

Összefüggést találtunk a gentamicinnel szembeni rezisztencia és az *aac(3)-IIa* gén jelenléte ($p < 0,001$), az amikacinnal szembeni rezisztencia és az *aac(6')-Ib-cr* gén jelenléte ($p < 0,001$), valamint a tobramycinnel szembeni rezisztencia és az *aac(3)-IIa* vagy az *aac(6')-Ib-cr* gén valamelyikének jelenléte ($p < 0,001$) között.

4.2.4. Az *E. coli* ST131 izolátumok filogenetikai elemzése

A C1-M27 alkládon belül egy nagy, 33 izolátumot tartalmazó klasztert tudtunk azonosítani (klaszter A). A klaszter A izolátumai 18 egészségügyi intézményből származtak: három izolátum 2015-ből, kettő 2016-ból, nyolc 2017-ből, négy 2018-ból és 16 izolátum 2021-ből. A fő plazmid replikon típus az IncF volt ($n=33$). Ebből 31 izolátumnál F1:A2:B20, egy-egy esetén F2:A2:B20 és F1:A2:B- FAB formulát tudtunk azonosítani. Egyéb Inc csoportokat is találtunk, mint például IncI ($n=2$), IncX1 ($n=4$), IncX3 ($n=1$), IncX4 ($n=2$), IncN ($n=1$) és IncB/O/K/Z ($n=1$). A Col-szerű plazmid replikonok is jelen voltak az klaszter A izolátumai között: Col(MG828) ($n=29$), Col156 ($n=30$), Col(BS512) ($n=15$), ColRNAI ($n=8$), Col8282 ($n=4$), Col(pHAD28) ($n=2$) és Col(KPHS6) ($n=1$).

A C2/H30Rx alkládon belül öt klasztert tudtunk azonosítani (klaszter B-F). Az izolátumokat 15 egészségügyi intézményből küldték be: két izolátum 2015-ből, kettő

2016-ból, három 2017-ből, öt 2018-ból és 18 izolátum 2021-ből. A fő plazmid replikon típus az IncF volt (n=28), és a következő FAB-formulákat találtuk: F31/F36:A4:B1 (n=10), F2:A1:B- (n=6), F1:A1:B16 (n=5), F31:A1:B1 (n=1), F-:A1:B16 (n=1), F1:A1:B20 (n=1), F2/F36:A4:B1 (n=1), F2:A-:B10 (n=1), F24:A-:B1 (n=1) és F48:A1:B49 (n=1), míg két izolátumnál nem találtunk IncF-típusú plazmidot. A C2/H30Rx izolátumok között más Inc-típusokat is találtunk, ilyen az IncI (n=5), IncX1 (n=1), IncX4 (n=1), IncB/O/K/Z plazmid (n=1), IncY (n=1) és IncQ1 (n=1). A Col-szerű plazmid replikonok is jelen voltak: Col(MG828) (n=9), Col156 (n=16), Col(BS512) (n=2), ColRNAI (n=8), Col8282 (n=6) és Col(pHAD28) (n=8).

Hét izolátum alkotta a klaszter B-t. Az izolátumokat 2018-ban (n=4 izolátum) és 2021-ben (n=3) gyűjtötték három egészségügyi intézményből. A C2 alklád jellegzetes rezisztencia és virulencia génjei mellett a *qnrB19* (n=6), *sul2* (n=5), *aph(6)-Id* (n=5) és *aph(3'')-Ib* (n=5) rezisztencia géneket tudtunk kimutatni a klaszteren belül. Az EC12 kivételével minden izolátum hordozta az *astA* és az *east1* virulencia gént. Minden izolátum C virotípussal rendelkezett, kivéve az EC2-t, amely egyedül rendelkezett B virotípussal és *iroBCDEN* operonnal. A hét izolátumból öt hordozott F1:A1:B16 FAB formulájú plazmidot.

A klaszter C-t alkotó két izolátum különböző évekből és egészségügyi intézményekből származott, és szintén különböző FAB-formulával rendelkezett (F1:A1:B20 és F1:A1:B16). Mindkét izolátumnál C virotípust találtunk.

A klaszter D-t alkotó 13 izolátumot kilenc különböző egészségügyi intézményből és különböző évekből gyűjtötték: minden évből egyet és kilenc izolátumot 2021-ből. A C2 alklád izolátumaira a jellemző rezisztencia és virulencia génjei mellett *hyl* operon-t és *cnf1* gént hordoztak és C virotípussal rendelkeztek. A klaszterben 11 izolátum hordozott *bla_{OXA-1}* és *aac(6')-Ib-cr* rezisztencia géneket is. A 13 izolátumból tíz rendelkezett az F31/F36:A4:B1 FAB formulájú plazmiddal.

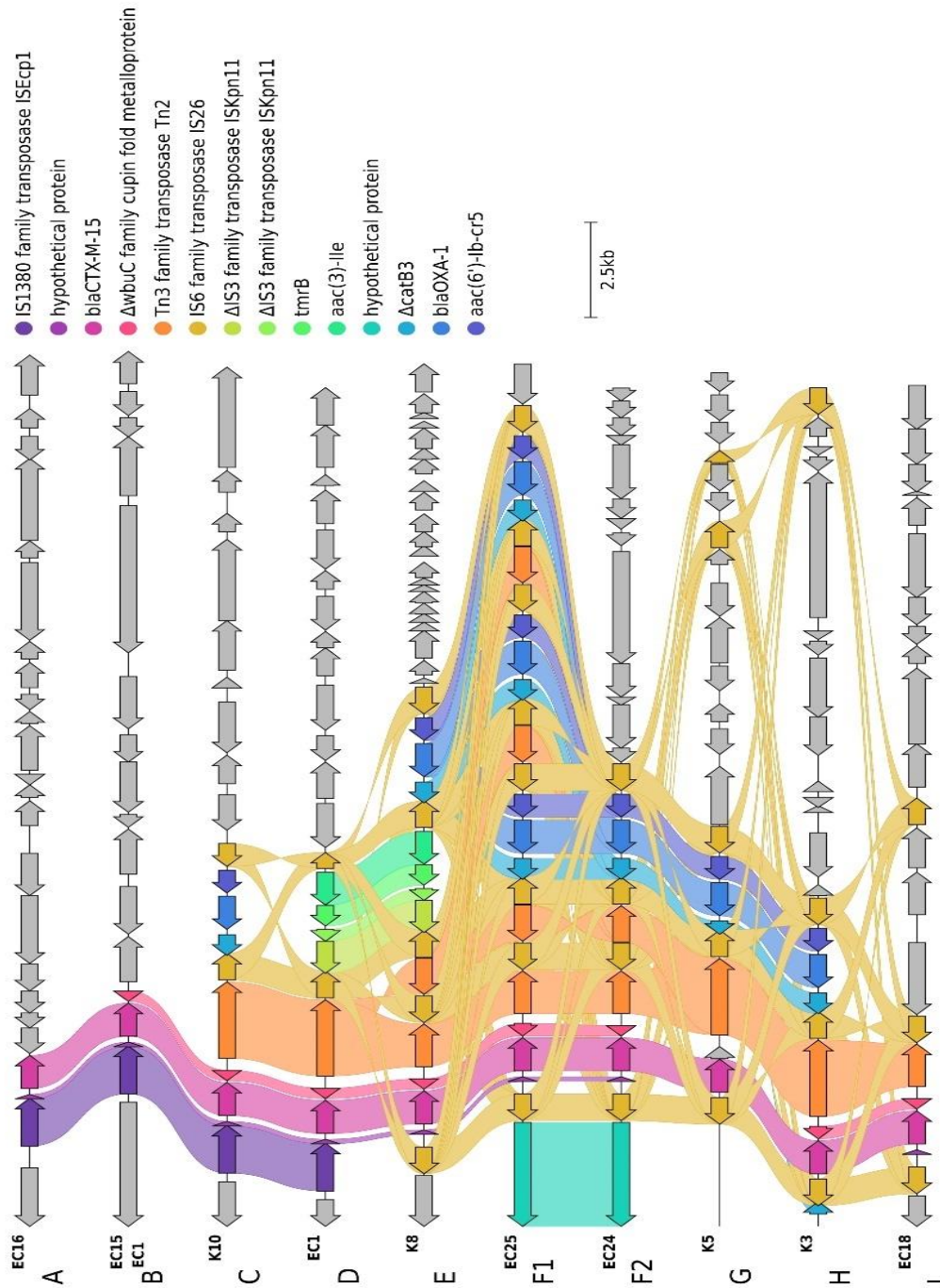
Négy izolátum alkotta az klaszter E-t, mindegyiket 2021-ben izolálták négy különböző egészségügyi intézményből. A C2/H30Rx-re jellemző virulom és rezisztom mellett, az EC15 és EC23-nél azonosítottuk *nfaE*, *daaA-F*, *afa* operon és *draA-F* virulencia géneket, illetve a *pap* operon hiányát. Ez a két izolátum A virotípussal

rendelkezett, a másik kettő (EC16 és EC21) C virotípussal. A négy izolátum közül három az F2:A1:B- FAB-formulájú plazmidot hordozott.

Az klaszter F-t alkotó négy izolátum különböző évekből és különböző egészségügyi intézményekből származtak. Mindegyik izolátum hordozta az *nfaE*, *daaA*-*F* és *afa* virulencia gént, nem rendelkezett *pap* operonnal és A virotípusa volt. A négy izolátumból három rendelkezett az F2:A1:B- FAB formulával.

4.2.5. A *bla*_{CTX-M-15} lokalizációja és genetikai környezete a C2/H30Rx izolátumokban

A *bla*_{CTX-M-15} gének lokalizációját és genetikai környezetét részletesen megvizsgáltuk a 19 kiválasztott C2/H30Rx hibrid szekvencia elemzésével. Egyetlen, 2015-ből származó izolátum hordozta plazmidon (F2:A1:B-) a *bla*_{CTX-M-15} gént. A többi 18 izolátumban a *bla*_{CTX-M-15} *ISEcp1* (n=7) vagy *IS26* (n=11) inszerciós elemhez társítható kromoszómális integrációját mutattuk ki. A *bla*_{CTX-M-15} genetikai környezete és a hozzá kapcsolódó IS elemek alapján 10 csoportot (*A-I csoport*) tudtunk elkülöníteni (16. ábra).



16. ábra: A *bla*_{CTX-M-15} kromoszómán és plazmidon lévő genetikai környezetének lineáris szekvencia-összehasonlítása (22 117 és 23 084 bp közötti tartomány). A gének funkció szerint vannak csoportosítva és színekkel jelölve. A színekkel jelölt nyilakkal jelzett gének megfelelnek az ábra jobb felső sarkában lévő köröknek. A szürke nyilak azokat a géneket jelzik, amelyek között nincs hasonlóság. A sorokat átívelő színes hullámos vonalak a Clinker által azonosított homológ géncsoportok szekvencia homológiáját jelzik. A csoportokat „A-I” jelöli a kijelölt izolátum neve és genom szekvenciája mellett.

Az *A* csoportban az *ISEcp1*-hez társítható orf-*bla*_{CTX-M-15} szekvencia volt jelen, és a környezetében nem mutattunk ki más antibiotikum rezisztencia gént.

A *B* csoportban a *bla*_{CTX-M-15} genetikai környezete hasonló volt az *A* csoportéhoz, de azt követte a cupin fold metalloprotein *wbuC*-t kódoló gén 273 bp hosszúságú szekvenciája.

A *C* csoportban megfigyelt genetikai környezet két különböző szegmensből állt. Az első szegmens megfelelt a *B* csoport szekvenciájának (*ISEcp1*-orf-*bla*_{CTX-M-15}-*wbuC*), amelyet egy második szegmens követett. A második szegmens egy Tn2-hez és IS26-hoz társítható kompozit transzpozon volt, amely Δ *catB3*-*bla*_{OXA-1}-*aac*(6')-*Ib-cr5* rezisztencia géneket hordozott.

A *D* csoportban a *bla*_{CTX-M-15} genetikai környezete két különböző transzpozíciós egységből álló szegmensből épült fel. Az első szegmens megfelelt a *B* csoportnak (*ISEcp1*-orf-*bla*_{CTX-M-15}-*wbuC*). A második szegmens egy IS26-hoz társított kompozit transzpozon volt, amely Δ *ISKpn11*-*tmrB*-*aac*(3)-*Ila* szekvenciát hordozta. A két szegmenst a Tn2 kötötte össze.

Az *E* csoport első szegmensében az orf-*bla*_{CTX-M-15}-*wbuC* géneket hordozó IS26-hoz társított kompozit transzpozon volt jelen, amelyet két másik, különböző szegmens követett. A második szegmens megfelelt a *D* csoport második szegmensének (Δ *ISKpn11*-*tmrB*-*aac*(3)-*Ila*), a harmadik szegmens pedig a *C* csoport második szegmensének (Δ *catB3*-*bla*_{OXA-1}-*aac*(6')-*Ib-cr5*).

Az *F* csoportban a *bla*_{CTX-M-15} gén genetikai környezete két különböző szegmensből állt. Az első szegmens megfelelt az IS26-hoz társított *bla*_{CTX-M-15}-nek. A második szegmens az IS26-hoz kötött, Δ *catB3*-*bla*_{OXA-1}-*aac*(6')-*Ib-cr5*-t hordozó kompozit transzpozon volt. A két szegmenst a Tn2 kötötte össze. Az *F2* csoportban a második szegmens egy kópában fordult elő, míg az *F1* csoportban a második szegmens három egymást követő kópiában szerepelt.

A *G* csoportban a *bla*_{CTX-M-15} gén genetikai környezete két szegmensből állt. Az első szegmens IS26-*bla*_{CTX-M-15} gént tartalmazta, a második szegmens az *F2* csoport második szegmenséhez (Δ *catB3*-*bla*_{OXA-1}-*aac*(6')-*Ib-cr5*) hasonlított.

A *H* csoportban a *bla*_{CTX-M-15} genetikai környezetének szerkezete nagyon hasonló volt a *G* csoporthoz, de mindkét szegmenst plazmidon találtuk meg.

Az *I.* csoportban az IS26-hoz kapcsolt orf-*bla*_{CTX-M-15}-*wbuC*-Tn2-IS26 volt jelen, és környezetében nem mutattuk ki más antibiotikum rezisztencia gént.

Az *ISEcp1*-hez társított *bla*_{CTX-M-15} (*A-D* csoport) esetében az *A* csoportban található *bla*_{CTX-M-15} egy kópiáját az EC16 izolátumban (klaszter E) találtuk meg. Az EC15 izolátumban (klaszter E) megtaláltuk a *B* csoportban található *bla*_{CTX-M-15} három kópiáját, ahol egyik *ISEcp1*-közvetített inszerciós szekvencia a másik kettővel ellentétes orientációban volt. A K10 izolátumban (klaszter C) a *C* csoportú szerkezet egy kópiáját találtuk meg. A klaszter B mind a négy izolátumban (EC1, EC2, EC3, EC7) az *ISEcp1*-hez társított *bla*_{CTX-M-15} gén két példánya jelen volt a baktérium kromoszómájában integrálódva azonos pozícióban. A *bla*_{CTX-M-15} egyik példánya a *B* csoportú szerkezethez tartozott, míg a második *D* csoportú kópia 3' irányban 84 842 bp távolságra volt jelen a genomban. Az IS26-hoz társított *bla*_{CTX-M-15} (*E-I* csoport) esetében az *E* csoport szerkezetének egy kópiáját négy izolátumban (K4, K6, K8, EC19-Klaszter D), az *F1* csoport szerkezetének egy kópiáját egy EC25 izolátumban (Klaszter F), az *F2* csoport szerkezetének egy kópiáját két izolátumban (EC24 és EC22) találtuk.

A K5 izolátum képezte a *G* csoportot, az F31/F36:A1:B1-szerű plazmid integrálódott a kromoszómába, ahol az IS26 közvetítésű inszerciós egység a 23S riboszomális RNS kódoló régiója mellett találtuk meg 5' irányban. A *H* csoportú szerkezet egy F2:A1:B-szerű plazmidon (91 036 bp) helyezkedett el, amelyet a K3 izolátumból (klaszter F) mutattuk ki. Az *I.* csoportú szerkezetet három izolátumban (EC10, EC18-klaszter D és K7-klaszter F) figyeltük meg.

4.2.6. A *bla*_{CTX-M-27} lokalizációja és genetikai környezete a C1-M27 izolátumokban

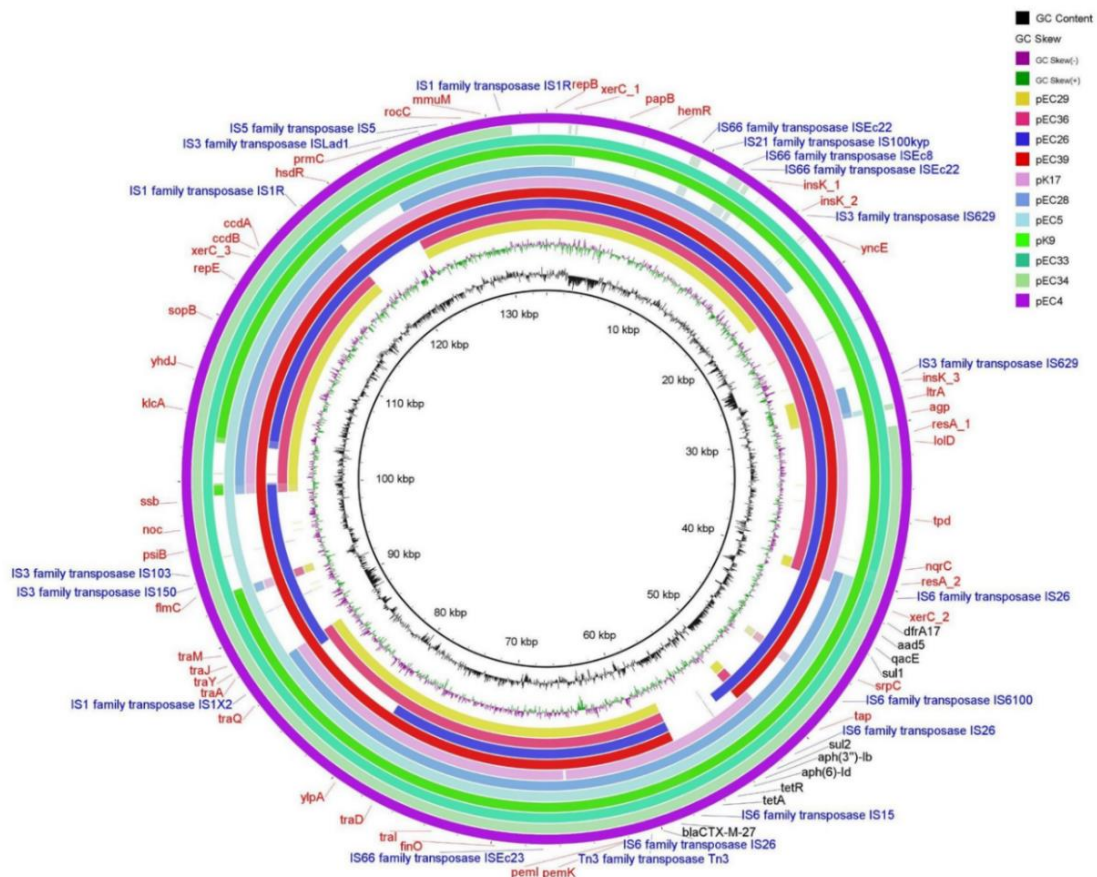
Minden vizsgált *bla*_{CTX-M-27} gént IncF-szerű plazmidok hordozták (17. ábra, 11. táblázat). Az rekonstruált plazmidok mérete az EC4 esetében 133 550 bp, az EC5 esetében 98 865 bp, az EC26 esetében 134 637 bp, az EC28 esetében 96 681 bp, az EC29 esetében 80 412 bp, az EC33 esetében 137 256 bp, az EC34 esetében 105 606 bp, az EC36 esetében 100 608 bp, az EC39 esetében 127 181 bp, a K9 esetében 139 893 bp és

a K17 esetében 110 045 bp volt. A tizenegy vizsgált izolátumból kilenc hordozta az IncF(F1:A2:B20) plazmidot, egy az IncF(F2:A2:B20) plazmidot, egy izolátum pedig az IncF(F1:A2:B-) plazmidot (10. táblázat).

10. táblázat: A C1-M27 *E. coli* izolátumokhoz tartozó FAB formulák

FAB formula	izolátumok
F1:A2:B20	EC4, EC5, EC28, EC26, EC33, EC36, EC39, K9, K17
F1:A2:B-	EC34
F2:A2:B20	EC29

Az IncF plazmidok három régióban hordoztak antibiotikum rezisztencia géneket (18. ábra). Az I. régió a *bla*_{CTX-M-27} gént tartalmazta, ezt 11 izolátumban találtuk meg, ezen belül 10 izolátumnál a régiót az IS6 családhhoz társított kompozit transzpozon hordozta. A II. régió a *tetA*, *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*, *sul2* géneket kódoló szekvenciát tartalmazta, amit hét izolátumban találtuk meg, ezen belül 6 izolátumnál a régiót az IS6 családhhoz társított kompozit transzpozon hordozta. A III. régió a *dfrA17*, *aadA5*, *qacEΔ1*, *sul1*, *mph(A)* géneket kódoló szekvenciát tartalmazta, amit nyolc izolátumban találtuk meg, beleértve 6 izolátumot, amelyek az IS6 családhhoz társított kompozit transzpozon régióját hordozták. Az EC29 és EC36 izolátumok csak az I. régiót hordozták, a K17 izolátumok az I. és II. régiót, az EC26 és EC39 izolátumok pedig az I. és III. régiót. Hat izolátum (EC4, EC5, EC28, EC33, EC34 és K9) rendelkezett az I., II. és III. régióval is.



17. ábra: Tizenegy *bla*_{CTX-M-27} -et hordozó IncF plazmid BRIG ábrázolása ESBL-termelő *E. coli* ST131 C1-M27 izolátumokban. Az összehasonlításokat a pEC4 referencia szekvenciához vonatkoztatva végeztük el. A belső gyűrűk a GC-tartalmat (fekete) és a GC-eltolódást (lila/zöld) jelölik. A többi gyűrű a C1-M27 *E. coli* *bla*_{CTX-M-27} -et hordozó tizenegy IncF plazmid BLAST-összehasonlítását mutatja. Egy gyűrűn belül a referenciához nézett szekvencia átfedést a kiválasztott színt mutatja, míg annak hiányában fehér marad azon a részen. A külső gyűrű kiemeli a pEC4 génjeit, amelyeket különböző színekkel ábrázolunk. Az annotált gének piros színnel vannak megjelenítve, kivéve az AMR-géneket fekete színnel, az MGE-t pedig kék színnel jelöltük.

11. táblázat: Az *E. coli* ST131 hibrid szekvenciájú izolátumok főbb genetikai jellemzői

Al-klád	Klasz-ter típus	Klaszter specifikus virulencia gének	<i>bla</i> _{CTX-M} gén lokalizáció	<i>bla</i> _{CTX-M} -hez társított IS elem	<i>bla</i> _{CTX-M} kópia száma	A <i>bla</i> _{CTX-M} genetikai környezete					Kiegészítő antibiotikum rezisztencia gének	Izolátum
						<i>bla</i> _{CTX-M} genetikai környezetének kategóriája	Első szegmens	Második szegmens	Harmadik szegmens	Negyedik szegmens		
C1-M27	A	<i>traT</i> , <i>senB</i> , <i>mcbA</i> , <i>pic</i>	plazmid	IS6 család	1	I. Régió	<i>bla</i> _{CTX-M-27}	-	-	-	-	EC29, EC36
						II-I Régió		<i>tetA-aph(6)-Id-aph(3'')-Ib-sul2</i>	-	-		K17
						I - III Régió		<i>dfrA17-aadA5-qacEΔ1-sul1-mpH(A)</i>	-	-		EC39, EC26
						I- II- III Régió		<i>tetA-aph(6)-Id-aph(3'')-Ib-sul2</i>	<i>dfrA17-aadA5-qacEΔ1-sul1-mpH(A)</i>	-		EC4, EC5, EC28, EC33, EC34, K9
C2/H30 Rx	B	<i>astA</i> , <i>east1</i>	kromoszóma	ISEcp1	2	B, D Csoport	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>tmrB-aac(3)-IIa</i>	-	-	<i>qnrB19, sul2, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib</i>	EC1, EC2, EC3, EC7
	C	-			1	C Csoport		<i>ΔcatB3-bla_{OXA-1}</i>	-	-	-	K10

	D	<i>hyl, cnf1</i>		IS26		I Csoport	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>					
						F2 Csoport	-	-	-		EC10, EC18	
						F1 Csoport	<i>ΔcatB3-bla_{OXA-1}-aac(6')-Ib-cr5</i>	-	-		EC24, EC22	
						E Csoport	<i>ΔcatB3-bla_{OXA-1}-aac(6')-Ib-cr5</i>	<i>ΔcatB3-bla_{OXA-1}-aac(6')-Ib-cr5</i>	<i>ΔcatB3-bla_{OXA-1}-aac(6')-Ib-cr5</i>		EC25	
	E	-	ISEcp1	3	B Csoport	<i>tmrB-aac(3)-IIa</i>	<i>ΔcatB3-bla_{OXA-1}-aac(6')-Ib-cr5</i>	-	K4, K6, K8, EC19			
		<i>nfaE, daaA-F, afa operon, draA-D</i>		A Csoport	-	-	-	EC15				
	I Csoport			-	-	-	EC16					
	G Csoport			<i>ΔcatB3-bla_{OXA-1}-aac(6')-Ib-cr5</i>	-	-	K7					
	H Csoport			<i>ΔcatB3-bla_{OXA-1}-aac(6')-Ib-cr5</i>	-	-	K5					
	F			plazmid	IS26	1						K3

4.3. Karbapenemáz-termelő *Escherichia coli* ST131 izolátumok vizsgálata, 2023

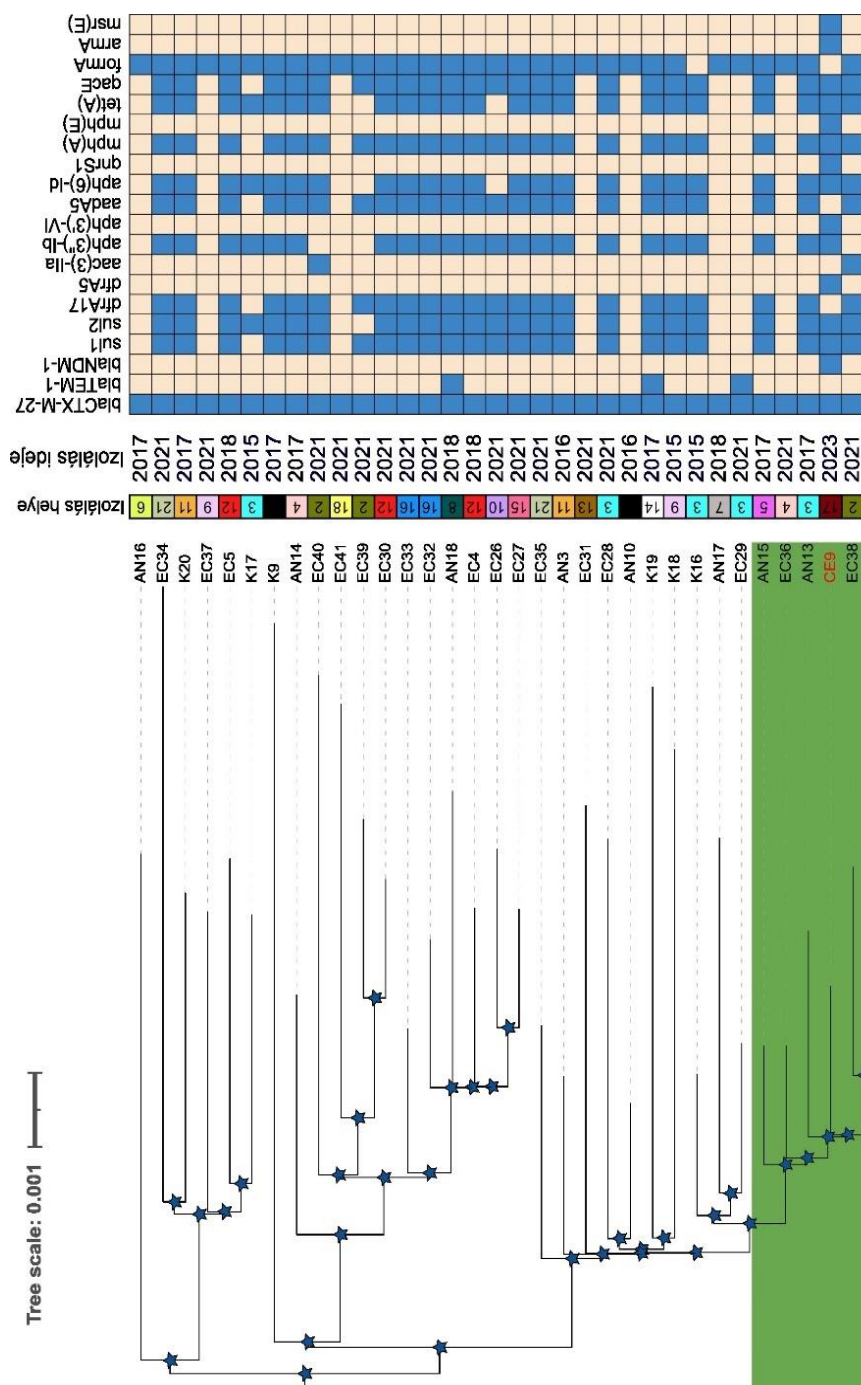
4.3.1. NDM-1- és CTX-M-27-termelő *E. coli* ST131 izolátum

Az első hazai karbapenemáz-termelő ST131 izolátumot 2023. márciusában izolálták Magyarországon. A beküldött izolátum egy NDM-1- és CTX-M-27-termelő *E. coli* ST131-nek (CE9) bizonyult. Az izolátum antibiogramja alapján cefiderocol, colistin és aztreonam/avibactam antibiotikumon kívül az összes cefalosporin, penicillin, monobaktám, aminoglikozid, fluorokinolon antibiotikum származékkal szemben rezisztens volt (12. táblázat).

12. táblázat: NDM-1- és CTX-M-27-termelő *E. coli* ST131 izolátum antimikrobiális érzékenysége Az NDM1- és CTX-M-27-termelő *E. coli* ST131 különböző antimikrobiális hatóanyagokkal szembeni érzékenységének összehasonlítása. Az NA a nem alkalmazott kifejezésre utal. Az interpretációhoz az EUCAST szerinti érzékeny (E), megnövelt expozíció mellett érzékeny (M) és rezisztens (R) kategóriákat használtuk.

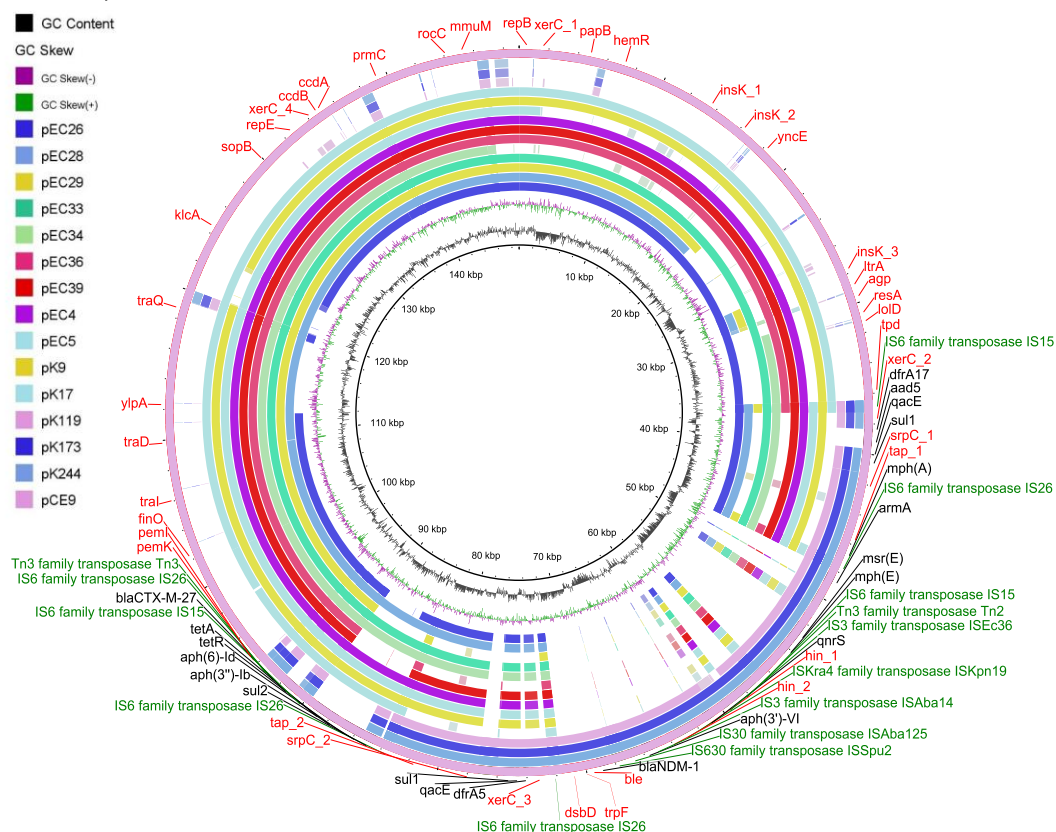
Antimikrobiális hatóanyag	CE9		
	MIC (mg/l)	Korong (mm)	Interpretáció
Ceftazidim/avibactam	>8	NA	R
Ceftolozan/tazobactam	>8	NA	R
Aztreonam	>16	NA	R
Ceftazidim	>32	NA	R
Ceftriaxon	>256	NA	R
Cefepim	>8	NA	R
Piperacillin	>32	NA	R
Piperacillin/tazobactam	>128	NA	R
Colistin	≤1	NA	E
Trimethoprim/sulfamethoxazol	>8	NA	R
Amikacin	>32	NA	R
Tobramycin	>32	NA	R
Gentamicin	>32	NA	R
Meropenem	16	NA	R
Imipenem	>8	NA	R
Ertapenem	32	NA	R
Ciprofloxacin	>8	NA	R
Levofloxacin	>8	NA	R
Cefiderocol	NA	24	E
Aztreonam/avibactam	0,125	NA	E

A cgMLST vizsgálat alapján a CE9 izolátum, a retrospektív vizsgálatba bevont C1-M27 izolátumok közül öt *E. coli* izolátummal mutatott közeli rokonságot (≤ 10 allél különbség): AN12, AN13, AN15, EC36, EC38. A CE9 és a C1-M27 törzsek filogenetikai kapcsolatát egy neighbour-joining filogenetikai törzsfán ábrázoltuk, amely az 19. ábra látható. Az egy klaszterbe tartozó *E. coli* izolátumok öt különböző egészségügyi intézményből származtak.



19. ábra: *E. coli* ST131 C1-M27 alkládba tartozó izolátumok ($n=34$) cgMLST-n alapuló neighbour-joining filogenetikai fája és antibiotikum rezisztencia génjei. A közeli rokonságot mutató törzseket (≤ 10 allél különbség) zöld színű téglalap jelöli. A filogenetikai fa mellett a következő információk szerepelnek: izolálás helye és ideje (2015-2018, 2021, 2023) és a hordozott antibiotikum rezisztencia gének. Az antibiotikum rezisztencia gének meglétét kék, hiányát barack színű négyzet jelöli.

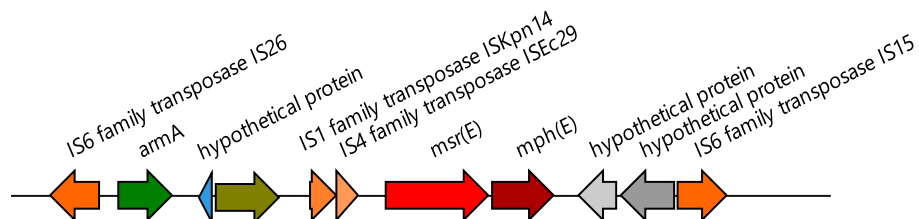
A karbapenemázis nem termelő C1-M27 törzsekhez képest találtunk olyan rezisztencia géneket, amelyek csak a CE9-nél voltak jelen ($p < 0,001$): *bla_{NDM-1}*, *armA*, *msr(E)*, *mph(E)*, *qnrS1*, *aph(3')-VI*, *dfrA5*. Ezeket a rezisztencia géneket a CE9 izolátum rezisztencia plazmidja hordozta. A rezisztencia plazmid ~149000 bp méretű volt, F1:A2:B20 FAB formulával rendelkezett, és öt kompozit transzpozont hordozott. Az öt kompozit transzpozon felépítése a következő volt: I, *IS6-armA-msr(E)-mph(E)-IS6*; II, *IS6-qnrS1-aph(3')-VI-bla_{NDM-1}-IS6*; III, *IS6-dfrA17-aadA5-ΔqacE-sul1-mph(A)-IS6*; IV, *IS6-sul2-aph(3'')-Ib-aph(6)-Id-tetA-IS6*; V, *IS6-bla_{CTX-M-27}-IS6*. A plazmid tartalom összehasonlításához 3 NDM-1-termelő *Klebsiella pneumoniae* (Függelék, Táblázat 3.) és 11 C1-M27 reprezentatív izolátumot használtunk (20. ábra). Az NDM-1-termelő *Klebsiella pneumoniae* izolátumok ugyanabból az egészségügyi intézményből származtak, mint a CE9.



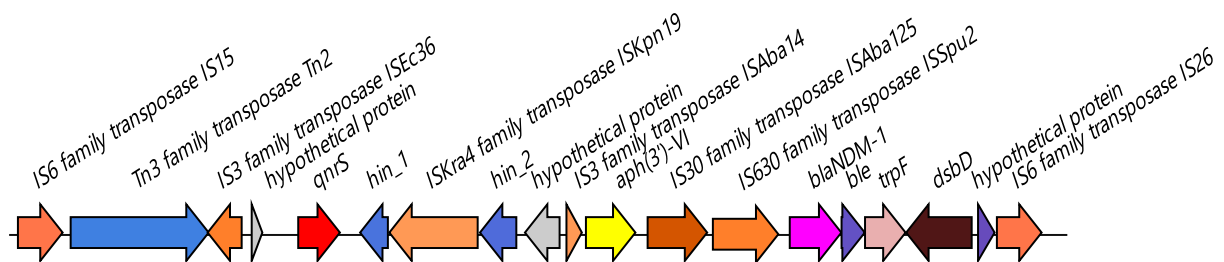
20. ábra: pCE9 plazmid szerkezetének összehasonlítása 11 db C1-M27 *E. coli* és 3db *K. pneumoniae* rezisztencia plazmidjaival. A plazmid szekvenciák koncentrikus körként jelennek meg. A belső körök a GC-tartalmat (fekete) és a GC-eltolódást (lila/zöld) mutatják. Egy körön belül a referencia pCE9 plazmidhoz illesztett szekvencia átfedést a kiválasztott színt mutatja, míg annak hiánya fehér marad. A pCE9 plazmidon kódolt antibiotikum rezisztencia gének feketével, a MGE-k zölddel vannak megjelenítve.

Az *bla*_{NDM-1}-hordozó plazmidokon (pK173, pK119, pK244) az I-II. transzpozont találtuk meg (21. ábra). Az összehasonlításhoz használt *bla*_{CTX-M-27}-hordozó plazmidokon (pEC4, pEC5, pEC26, pEC28, pEC29, pEC33, pEC34, pEC36, pEC39, pK9, pK17) az III-V. transzpozont találtuk meg (22. ábra). A III. transzpozon szerkezete megegyezett az C1-M27 izolátumok plazmidjában kimutatott III. régiójával, a IV. transzpozon szerkezete a II. régióval és a V. transzpozon szerkezete az I. régióval.

I, *IS6-armA-msr(E)-mph(E)-IS6*

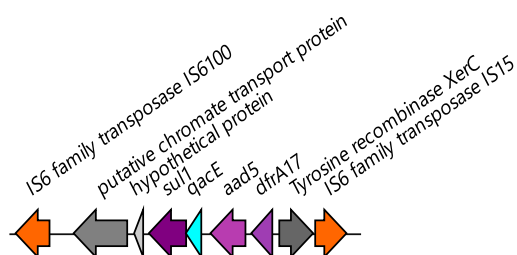


II, *IS6-qnrS1-aph(3')-VI-bla*_{NDM-1}-*IS6*

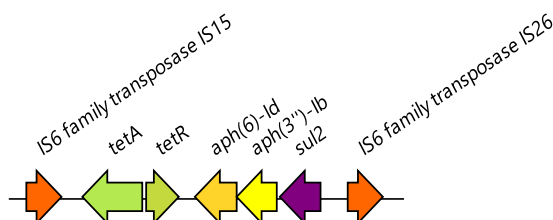


21. ábra: Az *bla*_{NDM-1}-hordozó plazmidokon található transzpozonok sematikus ábrája

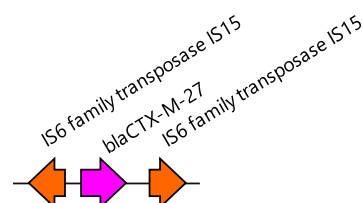
III, *IS6-dfrA17-aadA5-ΔqacE-sul1-mph(A)-IS6*



IV, *IS6-sul2-aph(3'')-Ib-aph(6)-Id,-tetA-IS6*



V, *IS6-bla_{CTX-M-27}-IS6*



22. ábra: Az *bla_{CTX-M-27}*-hordozó plazmidokon található transzpozonok sematikus ábrája

4.3.2. OXA-244- és CTX-M-15-termelő *E. coli* ST131 izolátum

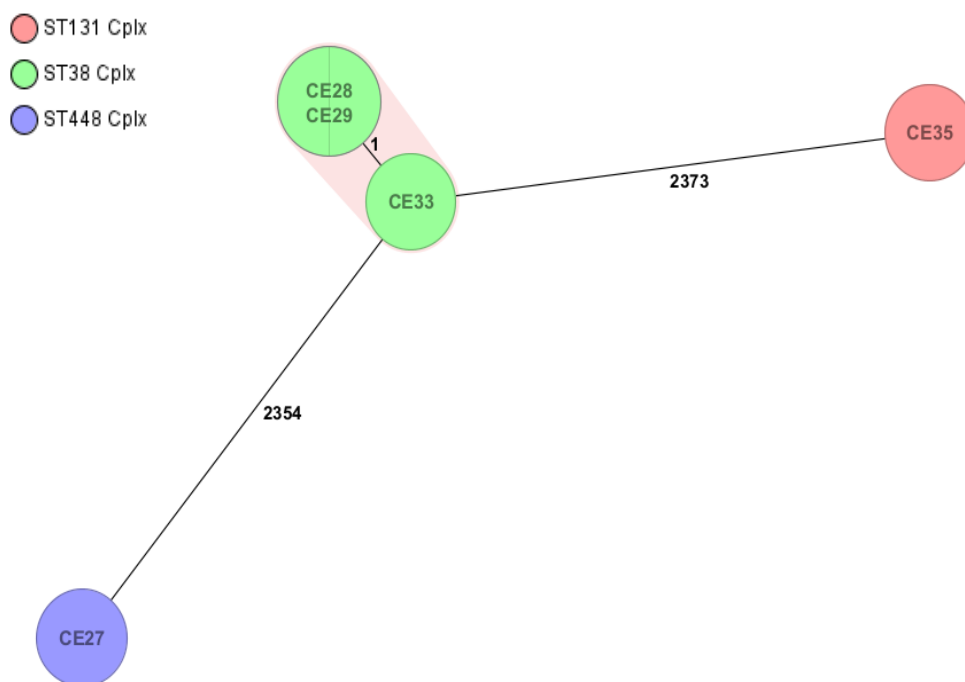
A második karbapenemáz termelő *E. coli* ST131 izolátumot (CE35) 2023-ban májusában azonosítottuk laboratóriumunkban. Ez az izolátum OXA-244- és CTX-M-15-termelőnek bizonyult. A CE35 antibiogramja alapján az izolátum rezisztens volt a vizsgált cefalosporinok közül a ceftolozan/tazobactamra, ceftazidimre, ceftriaxonra, cefepimre, aztreonam/avibactamra továbbá aztreonamra, penicillinekre (piperacillin és

piperacillin/tazobactam) és trimethoprim/sulfamethoxazol-ra. A karbapenem antibiotikumok közül ertapenemmel szemben mutatott rezisztenciát, míg imipenemre és meropenemre érzékenyek bizonyult. A fluorokinolon származékok közül ciprofloxacinra rezisztensnek, míg levofloxacinra maximális dózis, mellett érzékenyek bizonyult. Az aminoglikozidokra és colistinre érzékenyek bizonyult a törzs (13 táblázat).

13. táblázat: OXA-244- és CTX-M-15-termelő *E. coli* ST131 izolátum antimikrobiális érzékenysége. Az NA a nem alkalmazott kifejezésre utal. Az interpretációhoz az EUCAST szerinti érzékeny (E), megnövelt expozíció mellett érzékeny (M) és rezisztens (R) kategóriákat használtuk. Az ATU (Area of Technical Uncertainty) a Technikai Bizonytalanság Területe kategóriába esik.

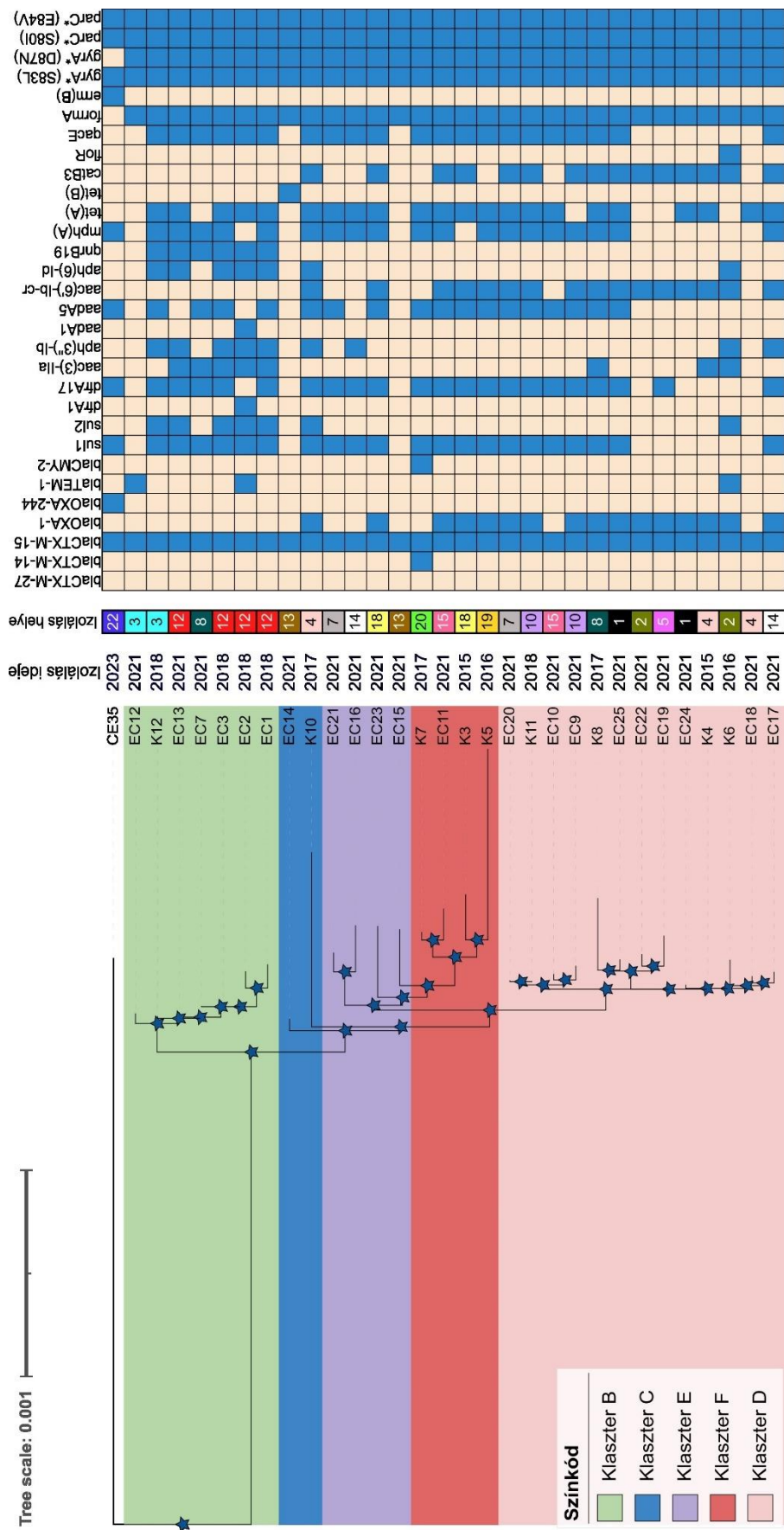
Antimikrobiális hatóanyag	CE35		
	MIC (mg/l)	Korong (mm)	Interpretáció
Ceftazidim/avibactam	≤1	NA	E
Ceftolozan/tazobactam	8	NA	R
Aztreonam	>16	NA	R
Ceftazidim	>32	NA	R
Ceftriaxon	>256	NA	R
Cefepim	>8	NA	R
Piperacillin	>32	NA	R
Piperacillin/tazobactam	128	NA	R
Colistin	≤1	NA	E
Trimethoprim/sulfamethoxazol	>8	NA	R
Amikacin	≤ 4	NA	E
Tobramycin	0,5	NA	E
Gentamicin	1	NA	E
Meropenem	≤0,125	NA	E
Imipenem	≤1	NA	E
Ertapenem	1	NA	R
Ciprofloxacin	1	NA	R
Levofloxacin	1	NA	M
Cefiderocol	NA	23	ATU
Aztreonam/avibactam	0,125	NA	E

A CE35 izolátumon kívül négy további OXA-244-termelő izolátum érkezett be a NRL-be (Függelék, Táblázat 4.), de ezek egyike sem tartozott az ST131-be: CTX-M-27-termelő CE28, CE29 és CE33 izolátumok az ST38-ba, míg az ESBL génnel nem rendelkező CE27 az ST448-ba tartozott. A CE35 és a további négy izolátum két különböző egészségügyi intézetből származtak. Az öt izolátum közül egyedül a CE28, CE29 és CE33 között lehet feltételezni epidemiológiai kapcsolatot (≤ 10 allél különbség), a többi izolátum között több mint 2354 allél különbség található (23. ábra).



23. ábra: Az OXA-244-termelő *Escherichia coli* izolátumok core genom MLST-alapú minimális feszítő fája. A cgMLST fát a SeqSphere+ 2517 allélból alapján készítette el. A klaszterek küszöbértéke ≤ 10 allél különbség. A színek a csoport törzseinek különböző komplex, illetve szekvenciatípusait jelzik. Az allél különbségek száma a két csomópont között van feltüntetve.

A CE35 izolátum az ST131 A kládjába tartozott, így a filogenetikai fán elkülönül a retrospektív vizsgálatból származó C2/H30Rx izolátumaitól, és egyetlen korábban beazonosított klaszterhez sem tartozott (24. ábra). Az izolátum *bla*_{CTX-M-15}, *sul1*, *dfrA17*, *aad5*, *mph(A)* rezisztencia gének mellett az *bla*_{OXA-244}, *erm(B)* génekkel, illetve a szubsztitúciós génmutációk közül a *prmB(E123D)*-el rendelkezett, de hiányzott a *gyrA(D87N)* mutáció.



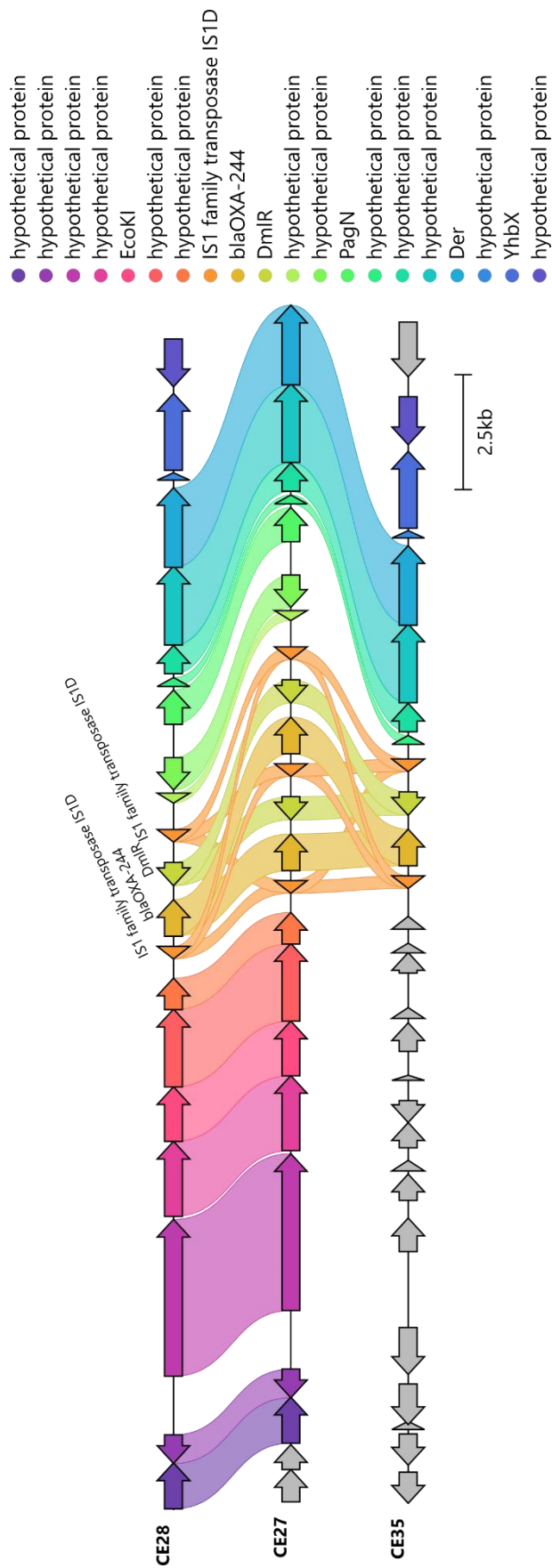
24. ábra: *E. coli* ST131 C2/H30Rx alkládában (n=30) és A kládba (CE35, n=1) tartozó izolátumok Maximum Likelihood elemzése alapján készített filogenetikai törzsfája és antibiotikum rezisztencia gényjei. A különböző színű négyzetek a filogenetikai törzsfák klaszterit jelzik, a csillag szimbólum pedig a bootstrapping-értékeket (LRT: >0,8 és UF bootstrapping >0,95). A filogenetikai fa mellett felsorolva a következő információk szerepelnek: izolálás ideje (2015-2018, 2021, 2023) és a hordozott antibiotikum rezisztencia gének. Az antibiotikum rezisztencia gének meglétét kék, hiányát barack színű négyzet jelöli. A * szimbólum a kinolon rezisztenciát meghatározó régióban lévő mutációkat jelöli.

A rezisztencia gének közül a *bla*_{CTX-M-15} és *bla*_{OXA-244} gén a CE35 izolátum kromoszómáján helyezkedett el, míg a *sul1*, *dfrA17*, *aad5*, *mph(A)*, *erm(B)* gének az izolátumban található F1:A1:B16 pMLST-vel rendelkező plazmidon helyezkedtek el. A CE28, CE29, CE33 izolátum rezisztencia génjei közül csak az *bla*_{OXA-244} helyezkedett el kromoszómán (25. ábra, 14. táblázat).

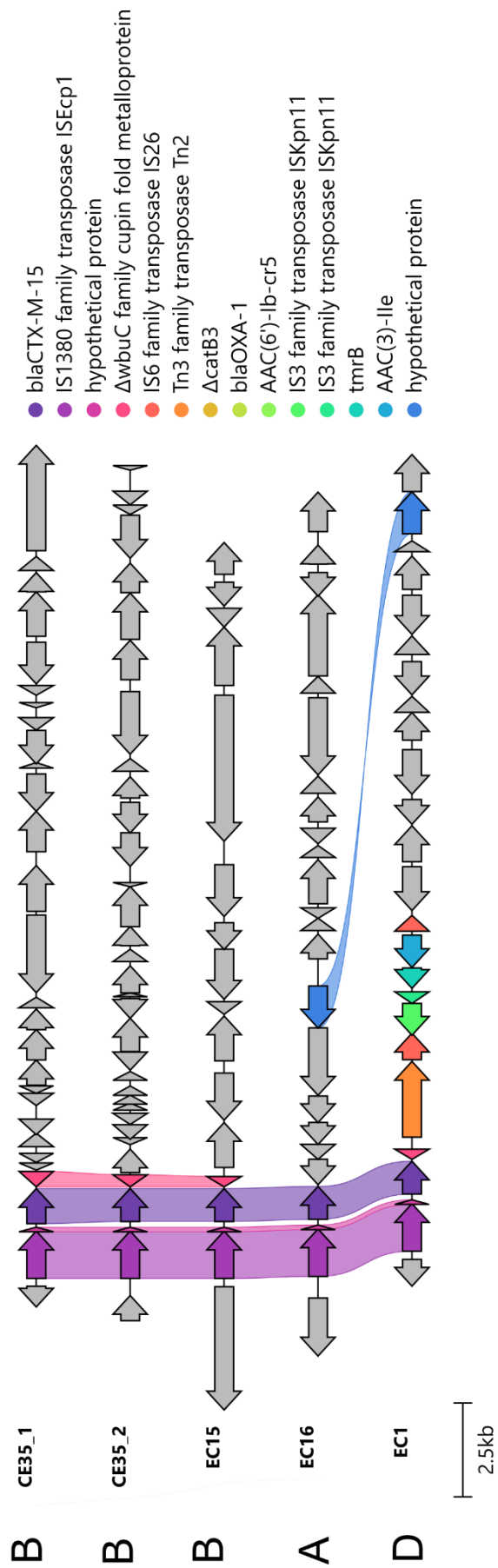
14. táblázat: Az OXA-244-termelő *E. coli* izolátumok rezisztomja. A táblázatban a rezisztencia gén jelenlétét a + szimbólum jelzi, a kromoszómán (zöld) vagy plazmidon (sárga) való elhelyezkedését pedig a háttér színe emeli ki.

Izolátum	CE35	CE27	CE28	CE29	CE33
ST	ST131	ST1448	ST38	ST38	ST38
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	+				
<i>bla</i> _{CTX-M-27}			+	+	+
<i>bla</i> _{OXA-244}	+	+	+	+	+
<i>bla</i> _{TEM}			+	+	
<i>sul1</i>	+		+	+	+
<i>sul2</i>			+	+	+
<i>dfrA17</i>	+		+	+	+
<i>dfrA14</i>					+
<i>erm(B)</i>	+				
<i>mph(A)</i>	+		+	+	
<i>aadA5</i>	+		+	+	
<i>aph(6)-Id</i>			+		+
<i>aph(3'')-Ib</i>			+	+	+
<i>tet(A)</i>			+		+

A három szekvencia típusból származó izolátumok hibrid genom elemzése alapján ugyanaz az *bla*_{OXA-244} gén és a *DmlR* transzkripció regulátor egy IS1 családba tartozó kompozit transzpozonon helyezkedik el mindhárom izolátum kromoszómájában. A CE27 esetén ez a kompozit transzpozon egymást követő két kópiában fordul elő (25. ábra). A CE35 izolátumban a *bla*_{CTX-M-15} két kópiájának ISEcp1 inszerciós elemhez társítható kromoszómális integrációját mutattuk ki. Az eddig általunk felállított *bla*_{CTX-M-15} genetikai környezetét jellemző csoportosítás alapján a B csoportba tartozik (26. ábra).



25. ábra: A *blaOXA-244* kromoszómán lévő genetikai környezetének lineáris szekvencia-összehasonlítása (~25 000 bp mérettartomány). A gének funkcióját tekintve vannak csoportosítva és színekkel jelölve. A színekkel jelölt gének megfelelnek az ábra jobb felső sarkában lévő köröknek. A szürke nyílak azokat a géneket jelölik, amelyek között nincs hasonlóság. A sorokat átívelő színes hullámos vonalak a Clinker által azonosított homológ géncsoportok szekvencia-homológiáját jelölik.



26. ábra: A *ISEcp1*-hez kapcsolódó *bla*_{CTX-M-15} kromoszómán lévő genetikai környezetének lineáris szekvencia összehasonlítása. A gének funkció szerint vannak csoportosítva és színekkel jelölt. A színekkel jelölt gének megfelelnek az ábra jobb felső sarkában lévő köröknek. A szürke nyílak azokat a géneket jelölik, amelyek között nincs hasonlóság. A sorokat átívelő színes hullámos vonalak a Clinker által azonosított homológ géncsoportok szekvencia homológiáját jelölik. A csoportokat „A-D” jelöli a kijelölt izolátum neve és genom szekvenciája mellett.

5. Megbeszélés

5.1. Egy prospektív, monocentrikus felmérés keretében gyűjtött *Escherichia coli* invazív izolátumok vizsgálata, 2018. október-november

5.1.1. Hazai incidencia adatok

Vizsgálatunk szerint a harmadik generációs cefalosporin-rezisztens *E. coli* okozta invazív fertőzés incidencia sűrűsége 0,11 volt 1000 betegnaponként, míg az incidenciája 0,79 volt 1000 kórházi felvételenként. Nem találtunk korábbi adatokat a hazai harmadik generációs cefalosporin-rezisztens *E. coli* invazív fertőzések előfordulásáról.

De Kraker és munkatársai az EARS-Net adatbázisának elemzésével vizsgálták a főbb bakteriális kórokozók véráramfertőzéseinek tendenciáiban bekövetkezett változásokat 2002-2008 között. 2008-ban a harmadik generációs cefalosporin-rezisztens *E. coli* által okozott invazív fertőzések átlagos incidencia sűrűsége Európában 0,03/1000 betegnap volt. Azonban jelentős különbséget találtak Európa északi és déli régióinak incidencia sűrűsége között: míg északon ez 0,002/1000 betegnap volt, addig délen ez az arány 0,06 /1000 betegnap volt. Európa keleti régiójában (beleértve Magyarországot is) az incidencia sűrűség az átlagoshoz hasonló volt (0,02/1000 betegnap) (153). Ezt az eredményt támasztja alá Martelius és munkatársai 2015-ös tanulmánya, egy 1999-2013 közötti finn akut kórházi osztályokon végzett prospektív vizsgálat, amely szerint incidencia sűrűség 0,008/1000 betegnap volt (154). Egy másik tanulmányban De Angelis és munkatársai 2018-ban egy római oktató kórház 9 éves (2007-2015) adatainak elemzésével 0,1/1000 betegnap incidencia sűrűséget találtak (2).

A mi vizsgálatunkban talált incidencia sűrűség jelentősen megnőtt a 2008-ban Európa keleti régiójában számított átlagos incidencia-sűrűséghez képest, és hasonlóvá vált a római vizsgálatban talált értékhez.

5.1.2. Az izolátumok rezisztomja és molekuláris epidemiológiája

Vizsgálatunkban a 25 *E. coli* izolátumból hat (24%) bizonyult harmadik generációs cefalosporin rezisztensnek és ESBL-termelőnek. 2010-ben Pál T. és munkatársai 2010 márciusa és novembere között három magyarországi egyetemi kórházban gyűjtött véráramfertőzésekben származó 117 *E. coli* izolátum között 26 ESBL-termelőt találtak (22,2%), amelyek közül kilenc kizárólag *bla*_{CTX-M-15}-t hordozó ST131 klónhoz tartozott (113). Az ESBL-termelő *E. coli*-k aránya a mi vizsgálatunkban is hasonló volt, azonban az ST131-esek aránya magasabb volt (83,3% vs. 34,6%). Továbbá az öt ST131 izolátumból kettő a C1-M27 alkládba tartozott. A C1-M27 alkládhoz tartozó első hazai ESBL-termelő invazív *E. coli* izolátumokat 2015-ben küldtek be az NRL-be. 2018-ban Jánvári és munkatársai obszervációs vizsgálata szerint az NRL-ben vizsgált invazív ESBL-termelő *E. coli* izolátumok 45 %-a (75/168) az ST131 klónhoz tartozott, ahol a C2/H30Rx és a C1-M27 alklád aránya 1:0,8 volt (114).

Vizsgálatunkban az véráramfertőzésből származó *E. coli* izolátumok közül a ST131, beleértve a C1-M27 (két izolátum) és a C2/H30Rx alkládot (három izolátum), bizonyult a domináns multidrogo-rezisztens *E. coli* klónnak. A három ST131 C2/H30Rx izolátum viszonylag szoros genetikai rokonságot mutatott (≤ 6 allélkülönbség), ami arra utalhat, hogy két kórházi osztályt (Infektológia Osztályról, I. Belgyógyászati Osztály) érintő fel nem fedezett járványról volt szó, ezt azonban a plazmid replikon elemzés eredményei nem erősítették meg.

Minden izolátum rezisztens volt a ceftriaxonnal és a cefotaximmal szemben. A CTX-M-15 ESBL-t tartalmazó izolátumok rezisztensek voltak a ceftazidimmal szemben, míg a CTX-M-27-et expresszáló izolátumok fogékonyak maradtak, valószínűleg azért, mert ezek az enzimek rosszul hidrolizálják a ceftazidimet. Továbbá a C2/H30Rx izolátumok rezisztenciát mutattak a tobramycinnel és a gentamicinnel szemben, mert rendelkeznek *aac(3)-IIa* aminoglikozid-modifikáló enzimmal (155).

Találtunk egy izolátumot, amely a ST1193 globális magas kockázatú klónhoz tartozott (156). Legjobb tudomásunk szerint ez a vizsgálat mutatta ki először az ST1193 *E. coli* jelenlétét Magyarországon. Ez a klón Ázsiában széles körben elterjedt (157,158). Egy 2017-es tanulmány alapján az ST1193 volt a második leggyakoribb szekvencia típus

(99 izolátum 23,7%-a) az ST131 (37,3%) után a ciprofloxacinnal rezisztens invazív *E. coli* izolátumok között egy koreai egyetemi kórházban 2013-2014 között (159). Európán belül is több helyen említést tesznek erről a klónról. Egy 2019-es németországi tanulmányban írták le, hogy az ESBL-termelő *E. coli* ST1193 aránya 0,6% (3/495) volt 2015-2016 között (160). Egy 2020-as délnyugat-angliai vizsgálatban a vizeletmintákból származó 836 *E. coli* közül 11 tartozott az ST1193-hoz 2017-2018 között (161).

5.1.3. Az izolátumok FAB formulái és plazmid replikonjai

A bakteriális genom feltérképezésére bevett eljárásnak számít a short-read módszerű teljes genom szekvenálás, azonban a szekvenálás során a DNS-t rövid, néhány száz bázispár hosszúságú szegmensekre bontják. A teljes genom összeszerelése során ez sokszor fragmentált összeszerelt genom szekvenciákhoz vezet (draft genom), ami megnehezíti a plazmid szekvenciák elkülönítését a kromoszómális szekvenciáéktól. További nehézséget okoz, hogy a plazmidok gyakran tartalmaznak ismétlődő szekvenciákat, illetve a mobilis genetikai elemeket, amelyek megnehezítik a pontos térképezést (plazmid vagy kromoszóma eredet) és zavart okozhatnak az összeszerelés során, ami hamis vagy hiányos plazmid rekonstrukciót eredményezhet. A short-read szekvenálási adatokból jelenleg rendelkezésre álló plazmid predikációs programok azt próbálják megállapítani, hogy az összeszerelt szekvenciák a plazmid eredetű (PlasmidFinder, cBar), vagy teljes plazmidsekvenciákat szertnének rekonstruálni a readokból vagy az assembly grafikonból (Recycler, PlasmidSPAdes, PLACNET) (162,163). Ez azonban továbbra sem oldja meg az ismétlődő szekvenciákat tartalmazó kis kontigok beazonosítását. A probléma kiküszöbölésére a long-read szekvenálás jelenthet megoldást. Mivel azonban ebben a vizsgálatban csak short-read szekvenciák álltak a rendelkezésünkre, a legpontosabb plazmid rekonstrukció elérése érdekében úgy döntöttünk, hogy az izolátumok szekvenciáit illesztettük az ST131-hez köthető referencia plazmidokhoz.

Ismert, hogy a szűk gazdaspektrumú IncF típusú plazmidok a fluoroquinolon rezisztens ST131 H30 kládokkal együtt fejlődtek ki. Az F2:A1:B- plazmid a C2/H30Rx alcsoporthoz kapcsolódik, míg az F1:A2:B20 plazmid erősen kapcsolódik a C1/H30R

alcsoporthoz (86). A Col-szerű plazmidok jelenlétét az ST131 és az ST1193 *E. coli* klónokban is leírták már, azonban ezeknek a plazmidoknak a pontos szerepe még mindig nem pontosan ismert (96). A vizsgálatunkban minden izolátum különböző Inc-típusú (F, Q) replikonokat tartalmazott, és az Ec5 kivételével Col-típusú (pHAD28, BS512, 156, 8282) replikonokat is tartalmaztak. A C1-M27 izolátumok az 1. csoport plazmid replikonokat (IncFII_1, IncFIA_2, IncFIB_20) hordozta. Az Ec4 izolátum szekvenciája nagyobb átfedést mutatott az 1. csoport referencia plazmidjával (96%), mint az Ec5 izolátum és az 1. referencia szekvenciáé (72%). A C2/H30Rx izolátumok nem kódolták együtt a 2. referencia csoport plazmid replikonokat (IncFII_2, IncFIA_1). Az Ec1 és Ec3 szekvenciái 70%-os homológiát mutattak az F2:A1:B- 2. csoport plazmidokkal, Ec2 pedig 47%-ot. Az Ec1 és Ec3 azonos replikonokat tartalmaztak a pU1 plazmiddal (pMLST: F1:A1) (96). A Ec1 és Ec3 szekvencia lefedettsége a pU szekvenciával 91% és 92% volt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy ez a két izolátum a pU1-hez hasonló plazmidot hordozott. Az ST1193 izolátum más replikonokat (IncFII_4-szerű, IncFIB_10) tartalmazott, mint a Group1 és Group2 plazmidok. Kondratyeva tanulmánya alapján az 1. referencia csoport plazmid replikonjai és *bla*_{CTX-M-27} az ST131 C1 alkládjában fordultak elő, míg a 2. referencia csoport plazmidra specifikus replikonok és *bla*_{CTX-M-15} kizárólag a C2 alklád izolátumaira korlátozódtak (96). A pU1 plazmidon található rezisztencia gének közül a *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *sul2*, *sul1*, *tetA*, *catB*, *tmrB* géneket megtaláltuk az Ec1 és Ec2 izolátumban. A tanulmányban található C1 plazmid rezisztencia génjeit: *tetA*, *sul1*, *sul2*, *dfrA17*, *aadA5*, *mph(A)*, pedig a Ec4, Ec5 izolátumban találtuk meg (96). A gének plazmid vagy kromoszómális lokalizációt nem tudjuk meghatározni a short-read szekvencia elemzés alapján.

5.1.4. Az izolátumok virulomja

Az ST131 extraintestinalis *E. coli* izolátumok virulenciát kódoló gének széles skálájával rendelkezhetnek, beleértve az adhézineket, invázinokat, vasfelvevő faktorokat, toxinokat, amelyek lehetővé teszik számukra, hogy a gazdasejtekhez kötődjenek, behatoljanak a gazdaszövetekbe és kikerüljék a gazdaszervezet védelmi mechanizmusait (164,165). Számos tanulmány foglalkozott azzal, hogy az ST131 virulenciafaktorok

tartalmában különbségek vannak, és csak néhány virulenciagént azonosítottak következetesen minden törzsben (120). Az általunk talált virulenciagének közül néhány az ST131 izolátumokhoz társult, mint például a *sat*, *iha*, *iucD*, *ompT*, *usp* (166–168). Ugyanezen géneket az ST1193 izolátumokban is már leírták (156,158,167), és ezeket mi szintén megtaláltuk az Ec6 izolátumnál. Az izolátumok olyan sziderofórokat hordoztak, amelyek lehetővé teszik számukra a túlélést vasszegény körülmények között: aerobaktin (*iucABCD*), yersiniabaktin (*irp2*), és az Ec2 izolátum a salmochelin (*iroBCDEN*) operont is hordozta. Az Ec2 a B virotípussal rendelkezett, míg az ST131 mindkét alkládjába tartozó többi izolátum a C virotípussal. A globálisan elterjedt C virotípust a legelterjedtebb *E. coli* ST131 virotípusként írták le (95,120). Csak kevés adat található az irodalomban a B virotípussal rendelkező ST131 izolátumok jelentőségéről (120,169). Blanco és munkatársai azt találták, hogy a B virotípus elsősorban az idősebb életkorral és alacsonyabb fertőzési aránnyal, a C virotípus a magasabb fertőzési aránnyal, a D virotípus pedig a fiatalabb életkorral és a közösségben szerzett fertőzésekkel hozható összefüggésbe (120).

5.2. Retrospektív, multicentrikus vizsgálata a C2/H30Rx és C1-M27 ST131 izolátumok populáció struktúrájának feltérképezésére, 2015-2018, 2021

Az prospektív vizsgálatban szereplő Ec1, Ec2, Ec3, Ec4, Ec5 izolátumok megegyeznek a retrospektív vizsgálatban szereplő EC1, EC2, EC3, EC4, EC5 izolátumokkal.

5.2.1. ST131 helyzete és a COVID-19 világjárvány hatása

Magyarországon először 2010-ben azonosították a CTX-M-15-öt termelő ST131 klónt, majd 2015-ben a C1-M27 alkládba tartozó ESBL-termelő invazív *E. coli* izolátumokat. Azóta az ESBL-termelő ST131 klón és alkládjainak száma és aránya fokozatosan emelkedett 2018-ig. 2018-ban az Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központban vizsgált invazív ESBL-termelő *E. coli* izolátumok 45%-a (75/168) tartozott az ST131 klónhoz, ahol a C2/H30Rx és C1-M27 arány 1:0,8 volt (170), ami már 2021-ben 67,7%-ra (157/232) emelkedett 1:0,5 arány mellett.

Az EARS-Net éves jelentésének adatai szerint 2015 és 2018 között, Magyarországon megnőtt az izolált 3GCR, invazív *Escherichia coli* kórokozók száma (n=399-ről 536-ra). 2021-ben az invazív mintákból izolált 3GCR *E. coli*-k száma majdnem megegyezett a 2018-as értékkel (n=504). Az *E. coli* izolátumoknál talált harmadik generációs cefalosporin rezisztencia aránya is hasonló tendenciát mutatott. A rezisztencia aránya 2015-2018 között növekedést mutatott (16,7 %-ról 22,6 %-ra), majd 2018 óta pedig meglehetősen stabilan stagnál (2021-ben 20,4 %) (171). Eközben az Európai Unióból (EU) és az Európai Gazdasági Térségből (EGT) jelentett 3GCR, invazív *E. coli* rezisztencia száma 2017 és 2021 között csökkent (99 266-ról 87 526-ra). Hasonló tendencia volt megfigyelhető a harmadik generációs cefalosporin rezisztencia arányában az invazív *E. coli* izolátumok között (14,9%-ról 13,8%-ra (171). Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a 3GCR, invazív *E. coli* rezisztensek aránya nem változott a COVID-19 pandémia alatt (vagy legalábbis 2021 végéig) sem Magyarországon, sem Európában.

Az ST131 izolátumok esetében nem találtunk változást a 2015-2018 és 2021 közötti izolátumok populáció struktúrájában: a legtöbb klaszter folytonosságot mutatott (mindkét időszak izolátumai megtalálhatóak a klaszterekben), kivéve a klaszter E-t, amelynek izolátumai kizárólag 2021-ből származtak. Azt azonban nem lehet megállapítani, hogy ennek a klaszternek az izolátumai korábban is jelen voltak már, vagy valamilyen módon a COVID-19 pandémiához kapcsolódott a megjelenésük.

5.2.2. Az izolátumok antibiotikum rezisztenciája, rezisztomja és virulomja

Ebben a vizsgálatban valamennyi izolátum rezisztensnek bizonyult a ceftriaxonnal és a ciprofloxacinnal szemben, de a CTX-M-15-öt termelő izolátumok nagyobb arányban mutattak rezisztenciát a ceftazidimmal szemben, mint a CTX-M-27-et termelő izolátumok. Bár a CTX-M-27 is rendelkezik az *Asp240Gly* aminosavcserével, amely a CTX-M-15-ben a ceftazidim-rezisztenciáért felelős, általában alacsonyabb MIC értékek mérhetők *in vitro* (32,36,37). Valamennyi izolátum érzékeny volt a karbapenemekre. Alacsony hazai karbapenem rezisztenciáról számolnak be az EARS-Net adatai, ahol 2015 és 2021 között csak egy karbapenem rezisztens izolátumot jelentettek Magyarországról. A két colistin rezisztens *E. coli* C1-M27 izolátum (EC34 és EC35)

(3,2%-os rezisztenciaarány ebben a gyűjteményben) ugyanabból az egészségügyi intézményből származott 2021-ből. Hasonlóan alacsony szintű colistin rezisztenciát figyeltek meg egy korábbi magyarországi vizsgálatban, ahol 146 vizsgált *E. coli* izolátum közül egy izolátum mutatott *mcr-1*-hez kapcsolódó colistin rezisztenciát, és hat izolátum volt colistin toleráns 2010-2011-ben, négy izolátum pedig 2016-ban (172). Vizsgálatunkban egyik izolátum sem rendelkezett plazmid mediált colistin rezisztencia (*mcr*) génekkel. Csak az EC34-ben volt *pmrB* (L14R) mutáció, amely erősen összefügg a colistin rezisztenciával (173). A 63 izolátum mindegyike rendelkezett ugyanazzal az aminosav szubsztitúcióval a *pmrB*-ben (E123D), amelyet már leírtak a kromoszóma mediált colistin rezisztenciával összefüggésben (60,174). Ugyanakkor (a két izolátum kivételével) továbbra is colistin érzékenyek bizonyultak. Egy koreai vizsgálatban szintén *pmrB* (E123D) szubsztitúcióval rendelkező *E. coli* izolátumokat találtak colistin érzékenyek (61). Így az eredményeink és az irodalmi adatok alapján valószínűleg a E123D mutáció nem játszik szerepet a colistin rezisztenciában, azonban további vizsgálatot igényel felderíteni az EC35 colistin rezisztenciájának hátterét.

A C2/H30Rx izolátumok az aminoglikozid modifikáló enzimek miatt alacsonyabb érzékenységi arányt mutattak amikacinnal, tobramycinnel és gentamicinnel szemben, mint a C1-M27 izolátumok (155,175). Az aminoglikozid modifikáló enzimek közül az *aac(6')-Ib-cr* csak a C2/H30Rx izolátumokban volt jelen, míg az *aac(3)-IIa* és az *aph(6)-Id* a C2/H30Rx és a C1-M27 izolátumokban egyaránt jelen volt. A szakirodalom szerint az *aac(3)-IIa* a gentamicinnel és a tobramycinnel, míg az *aac(6')-Ib-cr* az amikacinnal és a tobramycinnel szemben mutat rezisztenciát (176). Vizsgálatunkban ugyanilyen összefüggéseket találtunk ezen aminoglikozid modifikáló enzimek génjeinek jelenléte és a megfelelő antibiotikumok között. Az azonosított *gyrA* és *parC* mutációk jól ismertek a ciprofloxacinnal szembeni rezisztenciáért. További rezisztencia mechanizmusok, mint a *qnrA* vagy az *aac(6')-Ib-cr* szintén hozzájárulhatnak a fluorokinolon rezisztenciához. A C2 alklád izolátumai között a *qnrA* és az *aac(6')-Ib-cr* szintén jelen volt (177,178).

A C1-M27 izolátumokban a virulencia gének mediánszáma alacsonyabb volt (25 gén) a C2/H30Rx izolátumokhoz képest (29 gén). Habár a C1-M27 alklád izolátumai kevesebb virulencia gént hordoznak, ezek a gének (pl. *traT*, *senB*) szignifikánsan a C1-

M27 alkládra jellemzők és befolyásolhatják azok kórokozó képességét. Számos irodalom számol be az egyes ExPEC virulenciafaktorok valószínűsíthető jelentőségéről és a húgyúti fertőzésekkel való kapcsolatukról. Egyes ExPEC izolátumok a húgyutakban képesek elkerülni a gazdaszervezet immunválaszát a szérum rezisztenciával összefüggésbe hozható külső membránfehérje (*traT*) termelésével (179). A C1 alkládra jellemző *pic* és mindkét alkládban előforduló *sat* az EAEC-ben, de az UPEC ExPEC törzsekben is előfordulnak (180). A C2/H30Rx alklád izolátumai jellemző virulencia gének többségét (*pap* operon, *afa* operon, *hyl* operon, *draA-D*, *nfaE*) szintén húgyúti fertőzésekkel kapcsolatban írták le (106,181–184). Illetve mindkét kládban előforduló adhézióért felelős gének pl (*fimH*), vas felvételért felelős gének, sziderofórok (*chu* operon, *fyuA*) szintén húgyúti fertőzéseket okozó ExPEC izolátumokban írták le (185,186). Ezenkívül a C2/H30Rx alklád egyes izolátumai további, az alkládra jellemző virulencia génnel is rendelkeztek, amelyek szükségesek lehetnek súlyos bakterémia kialakulásához, és szerepet játszhatnak a vér-agy gát inváziójában, mint például a citotoxikus nekrotizáló faktor 1 (*cnf1*) és az *aslA*, amely MNEC izolátumokra jellemző meningitist képes okozni, de leírták már a hasmenést, a húgyúti fertőzést és a bakterémiát okozó izolátumban is (10,187,188). Mindkét alkládban jelenlévő *ompA* és *fimH* is a vér-agy gát invázióhoz kapcsolódó gének közé tartoznak (10,189).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az invazív mintákból származó ST131 izolátumok olyan virulencia génekkel rendelkeznek, amelyek számos, a húgyutakat kolonizáló és fertőző patogén törzsre, az UPEC-re jellemzők. Mivel klinikai és epidemiológiai adatok nem álltak rendelkezésre, a specifikus virulencia gének jelenléte arra utalhat, hogy az izolátum eredetileg milyen elsődleges, például egy húgyúti fertőzés forrása volt, mielőtt a véráramba jutott. Míg más izolátumok egyéb virulencia repertoárral is rendelkeznek, amelyek az UPEC-től eltérő eredetet (pl NMEC) is felvet.

Habár az ST131 C alkládokon belül és alkládok között a virulencia gének változó számban voltak jelen a kollekciókban, a leggyakoribb virotípus mindkét kládban a C volt, csakúgy, mint az irodalomban (95): C1-M27 alklád minden izolátumára, míg a C2/H30Rx alklád 23 izolátumára volt jellemző. A C2/H30Rx alklád hat izolátumára A, míg egy izolátumára B virotípus volt a jellemző. A változó virulencia mintázatot mutató és a különböző virotípusú izolátumok fertőző képességét állatmodellekkel lehetne

vizsgálni, amilyen a nagy viasmoly lárva (*Galleria mellonella*) letalitás vagy szépszises egér letalitás vizsgálat. Mi a vizsgálataink során nem végeztünk állatkísérleteket, ezért csak irodalmi adatok állnak rendelkezésünkre. Mora és mtsai. szubkután szépszises egérkísérletes vizsgálata során vizsgálták a különböző virotípusú és szerotípusú ST131 klinikai izolátumok virulenciáját, eredményeik szerint az A, B és C virotípuson belüli ST131 izolátumok rendelkeztek a legmagasabb letalitással (ST131-el fertőzött egereknek $\geq 80\%$ -a elpusztult 7 napon belül), illetve az elhalálozás idejében találtak még különbséget: az A virotípus izolátumaival fertőzött egerek szignifikánsan gyorsabban pusztultak el a többi virotípushoz képest (az egerek $\geq 80\%$ -a elpusztult a fertőzést követő 24 órán belül) (168). Ciesielczuk a *Galleria mellonella*-val végzett állatkísérletében azt találta, hogy öt extraintestinalis patogén *E. coli* (ST131, ST95, ST73, ST69 és ST127) közül az ST131 szignifikánsan virulensebb, mint a többi ST (190). Ennek azonban ellentmond az Alghoribi és mtsai., mivel a *Galleria mellonella* kísérletükben az ST131 izolátumok voltak a legkevésbé virulensek (191). Mivel ellentmondásosak az irodalmi adatok ezért mindenképpen további állatkísérletre lenne szükség annak érdekében, hogy eldönthessük, hogy az izolátumok virulencia készlete és virotípusa mennyire játszik szerepet azok patogenitásában, illetve annak mértékében.

5.2.3. A mobilis genetikai elemekkel társított *bla*_{CTX-M-15} lokalizációja és genetikai környezete a C2/H30Rx izolátumokban

Ebben a vizsgálatban short-read szekvenálás mellett bevezettük laboratóriumunkban a long-read szekvenálást is, így hibrid szekvencia elemzés alapján rekonstruáltuk a bakteriális kromoszómát és a plazmidokat. A bioinformatikai elemzéseknél azt láttuk, hogy a C2/H30Rx izolátumok plazmid szekvencia összeszerelése során nem sikerült zárt ciklikus plazmid struktúrát rekonstruálnunk. Ezért az elemzéseink során a plazmidok, mint önálló egységek jellemzése helyett, a *bla*_{CTX-M} és az AMR gének genetikai környezetére összpontosítottunk.

Az IncFII-típusú plazmidokról kimutatták, hogy főként a *bla*_{CTX-M-15} génhez kapcsolódnak (86). Ebben a vizsgálatban a 19 C2/H30Rx izolátum közül csak egy 2015-ből származó izolátum hordozta a *bla*_{CTX-M-15}-öt kódoló C2-asszociált F2:A1:B-

plazmidot. A fennmaradó 18 izolátumban kimutattuk a *bla*_{CTX-M-15} gén egy vagy több kópiájának kromoszómális integrációját. A *bla*_{CTX-M-15} kromoszómális integrációját már korábban is leírták néhány tanulmányban, amelyek helyi elterjedésről számoltak be Írországon és Japánban (85,192). A mi vizsgálatainkban ezt a jelenséget nem lokális szinten találtunk meg. A 18 izolátumot öt klaszterbe tudtuk besorolni, ami tizenhat egészségügyi intézményből származott. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a kromoszómális *bla*_{CTX-M-15}-öt hordozó C2/H30Rx ST131 izolátumok konvergens módon keletkezettek és terjedhettek el Magyarországon.

Különbség mutatkozott a *bla*_{CTX-M-15} genetikai környezetének transzlokációjáért felelős IS típusok esetében. Kétféle IS által közvetített transzlokálódó elemet mutattunk ki: Az *ISEcp1* a *bla*_{CTX-M-15} gén előtt helyezkedett el, illetve az IS26 a *bla*_{CTX-M-15} gén előtt és után épült be. Voltak olyan IS26 vagy *ISEcp1* transzpozon szerkezetek is, amelyeket egy vagy több IS26-társult transzlokálható egységekből álltak. Az IS26 egyike azon IS-típusnak, amelyről kimutatták, hogy a replikáció során inkább kointegrátumokat alkot, minthogy egyedül mozogjon új helyre (98,193). Ezáltal, ha a plazmid és a kromoszómális DNS egyaránt tartalmaznak homológ szekvenciákat, akkor lehetővé tehetik a rekombinációt és ezáltal kointegrált molekulát képeznek, amely beépülhet a kromoszómába. Az IS26 szintén megtalálható transzpozonokban mint „építő egységek”, amelyek transzpozíciós elemek mellé interkalálódva képesek tandem amplifikációs egységeket képezni az AMR plazmidokban vagy kromoszómákban (99). Az IS26-hoz hasonlóan az *ISEcp1* által közvetített transzpozíció egy *ISEcp1*-en keresztül zajlik, és olyan genetikai transzpozíciós eseményeket közvetít, amelyek homológ rekombinációt foglalnak magukban. Mindkét IS-család felelős lehet a *bla*_{CTX-M} gének magasabb szintű expressziójáért, amelyek fontos szerepet játszanak az antibiotikum rezisztencia gének elterjedésében a Gram-negatív baktériumok között (103). Az *ISEcp1* és/vagy IS26 által közvetített *bla*_{CTX-M-15} transzpozíció jelenségét már korábban is leírták több tanulmányban (57,105–108) Shawa és munkatársai leírták az *ISEcp1*-*bla*_{CTX-M-15} és más *catB3*, *bla*_{OXA-1}, *aac(6')-Ib-cr5* gének együttes előfordulását a CTX-M-15-öt termelő *E. coli* ST131 kromoszómális környezetében (45,105).

Ebben a vizsgálatban a *bla*_{CTX-M-15} egy vagy több példányának és genetikai környezetének kromoszómális integrációját az *ISEcp1* vagy az IS26 közvetítette.

Ezenkívül az IS26 által közvetített *bla*_{CTX-M-15} gént egy izolátumban (*F1 csoport*) a Tn2-IS26-*ΔcatB3-bla*_{OXA-1}-*aac(6')-Ib-cr5*-IS26 szegmens három példánya követte. Shropshire és munkatársai leírták a *bla*_{CTX-M-15} és a *bla*_{OXA-1} IS26 által közvetített amplifikációját a karbapenem rezisztens *E. coli* ST131 genomjában, és feltételezték, hogy az IS26-*bla*_{CTX-M-15}- Δ Tn2 okozhatja a *bla*_{CTX-M-15} genetikai környezetének amplifikációját (107,108). A mi vizsgálatainkban az *ISEcp1* által közvetített amplifikáció négy izolátumban is előfordult. A *bla*_{CTX-M-15}-öt kódoló plazmidok horizontális géntranszferén kívül tehát a kompozit transzpozonhoz kötött antimikrobiális rezisztencia gének több, az IS26 vagy *ISEcp1* által közvetített kromoszómális inszerciós eseményen estek át. Az antimikrobiális rezisztenciagének különböző IS által közvetített kromoszómális integrációjának egymástól független, konvergens megjelenése arra utal, hogy ez a folyamat evolúciós potenciállal bírhat. A plazmid fitness terhet róhat a gazdaszervezetre, ugyanakkor diverzitást is biztosít, ezzel elősegítve a sikeres klónok világméretű elterjedését (194–196).

5.2.4. A *bla*_{CTX-M-27} lokalizációja és genetikai környezete a C1-M27 izolátumokban

A C2 alkláddal ellentétben a C1-M27 izolátumokban az összes *bla*_{CTX-M-27} és AMR gént az IncF plazmidon hordozták. A C1-M27 ST131 izolátumok többségénél F1:A2:B20 plazmidot találtunk. Az F1:A2:B20 plazmid típus erősen kötődik a C1/H30R alkládhoz (93). Ebben a vizsgálatban egy F1:A2:B- plazmiddal rendelkező izolátum hordozta az I., II., III. régiót, míg voltak F1:A2:B20 izolátumok, amelyek az I. és III vagy I. régiót hordozták. A vizsgált izolátumoknál az összes, az IS6 családdal kapcsolódó, AMR-géneket hordozó kompozit transzpozont plazmidon találtuk meg, amely összhangban áll az irodalomban található számos példával (197,198). Hasonló, AMR-génekből álló régiókat (I., II., III.) már korábban is találtak más C1-M27 izolátumok F1:A2:B20 plazmidjaiban, és volt már példa arra is, hogy *bla*_{CTX-M-27} nélküli AMR géneket tartalmazó régiókat találtak a *bla*_{CTX-M-14}-et kódoló F1:A2:B20 plazmidban (38,199). Ezek az eredmények arra mutatnak rá, hogy habár a C1 alkládhoz tartozó leggyakoribb plazmid továbbra is F1:A2:B20 FAB típusú, azonban a plazmidban található transzpozonok és a hozzájuk köthető régiók változatosságot mutatnak. Továbbá

a régióknak nem volt kitüntetett, elhatárolt helyük a klaszteren belül, így nem tulajdonítottunk nekik evolúciós hajtóerőt.

A vizsgálatban a C1 és C2 alkládokban a leggyakoribb Col-szerű replikon típus a Col156 (30 vs. 16) volt, amelyet a Col(MG828) (29 vs. 9) követett. A Col-szerű plazmidok vagy replikonok pontos szerepe nem világos. A Col-szerű plazmidok vagy replikonok olyan mobilizálható vektorok, amelyeket az Enterobacteriaceae családban az antibiotikum rezisztencia plazmidok horizontális géntranszfer útján történő terjedésének elősegítőjeként írtak le (45,96,200).

5.2.5. A C1 és C2 alkládok hazai elterjedése

Eredményeink arra utalnak, hogy a C2 és C1 alkládok eltérő módon alakulhattak ki és terjedhettek el Magyarországon. A C1-M27 változat a 2015-2016 körüli magyarországi megjelenése óta egy klasztert alkotott. Ezt a hipotézist az is alátámasztja, hogy a C1-M27 izolátumok nagy hasonlóságot mutattak a virulom és a rezisztencia tekintetében, és 93,9%-uk F1:A2:B20 plazmidot hordozott. Ezzel szemben a C2/H30Rx klaszterek egymástól függetlenül jelenhettek meg az országban. A kompozit transzpozonok vagy az IncF-szerű plazmidok egy része beépülhetett a kromoszómába, majd utóbbiak később fokozatosan eltűnhettek a *bla*_{CTX-M-15} genetikai környezetéből. Mire a C1-M27 klón megjelent, már Magyarországon is jelen voltak a kromoszómában kódolt *bla*_{CTX-M-15}-tel rendelkező C2/H30Rx klónok. A C2 alklád Magyarországon konvergens evolúciós folyamaton mehetett keresztül, és ezek a klónvonalak még 2021-ben is kimutathatók voltak. Bár a C1 klonális leszármazási vonalban az ESBL és egyéb AMR gének jelenlétét biztosító kompozit transzpozonok a C2-hez hasonlóan az IS6/IS26-hoz köthetők, az nem került át kromoszómális környezetbe, és a C2-től eltérően klonális elterjedésen ment keresztül. Továbbá sem a C1, sem a C2 alkládok nem voltak képesek egymást kiszorítani, hanem stabilan egymás mellett léteztek és terjedtek. A C2 alkládon belül a *bla*_{CTX-M-15} két példányát tartalmazó klaszter B izolátumok helyi klonális elterjedést mutattak, és valószínűleg egymástól függetlenül alakultak ki Magyarországon.

5.3. Karbapenemáz-termelő *Escherichia coli* ST131 izolátumok, 2023

A karbapenemekkel szembeni rezisztencia kialakulása az *E. coli* ST131 baktériumok körében különösen nagy aggodalomra ad okot, mivel ezek a szerek gyakran az utolsó hatékony terápiás lehetőséget jelentik a súlyos fertőzésekben szenvedő személyek kezelésében.

Az NRL-be beküldött izolátumok közül először 2023-ban sikerült kimutatnunk NDM-1-típusú karbapenemáz- és CTX-M-27-típusú ESBL-termelő ST131 izolátumot és egy OXA-244- és CTX-M-15-termelő ST131 izolátumot. Nemzetközi viszonylatban már a kétezres évek elején is írtak le karbapenemáz-termelő ST131 izolátumokat. Egy genomális epidemiológiai tanulmány feldolgozta az SMART (antimikrobiális rezisztencia tendenciáinak megfigyelésére irányuló Merck-tanulmány) és az AstraZeneca surveillance programjainak eredményét, ami arra irányult, hogy jellemezze a karbapenemáz-termelő *E. coli* ST131 izolátumokat, amit öt kontinens 16 országából gyűjtöttek 2002-2013 közötti időszakból. A 42 db ST131 izolátumból 24 (58%) volt pozitív *bla*_{KPC}-re, 13 (31%) *bla*_{OXA-48}-szerű, 3 (7%) *bla*_{NDM-1}-re és 1 (2%) *bla*_{IMP-14}-re. Vizsgálatukban a C virotípushoz tartozó H30-R volt a leggyakoribb vonal az ST131 törzsek között (azaz 58%), amely a *bla*_{KPC}-val társult, és különösen 2012-2013-ban volt kiemelkedő (84). Több tanulmány szerint az ST131 szerepet játszhatott a *bla*_{KPC}-val rendelkező *E. coli* globális elterjedésében (84,201,202). Más karbapenemázokról, mint például a VIM, IMP és OXA-48-szerű enzimekről kisebb mértékben számoltak be (42,84,203). Egy nemzetközi tanulmány szerint, amely 2015 és 2017 között 62 országból származó klinikai izolátumokat vizsgált, az ST131 számos altípusát hordozta a karbapenemázoknak. Az ST131 A kládjába tartozó izolátumok közül kimutattak KPC-3- és OXA-48-termelő 1-1 izolátumot, az ST131 C1-M27 NDM-1-termelő és OXA-232-termelő izolátumot. Az ST131 C1/H30R *bla*_{CTX-M-27} -től eltérő alkládban előfordultak a KPC-2-, KPC-3-, KPC-18 karbapenemáz termelő izolátumok. Az ST131 C2/H30Rx alklád izolátumainál a KPC-2, KPC-3, NDM-1, NDM-5, OXA-48 és OXA-181 karbapenemázokat találták meg, továbbá egy törzsnél pedig a *bla*_{NDM-1} és a *bla*_{VIM-1} együttes hordozását (204). Frissen leírt ST131-el kapcsolatba hozható karbapenem rezisztencia hátterében az OXA-244-termelő izolátumok álltak. Az OXA-244, az OXA-48 pontmutációs változata (Arg214Gly), nem gyakran leírt karbapenemáz, amely

csökkent aktivitással rendelkeznek a karbapenemekkel szemben. Az CTX-M-15- és OXA-244-termelő *E. coli* ST131 izolátumot írtak már le németországi klinikai izolátumoknál (205), olaszországi klinikai izolátumoknál 2022-2023-ban (83) és 2019-ben ugyanezen a földrajzi területen OXA-244-et termelő ST131 H5:O16 *E. coli*-t mutattak ki csatornavízben (206). A Norvégiában 2020-2022-ben járványt okozó OXA-244 karbapenemáz-termelő *Escherichia coli* ST131 és ST38 izolátumokról tettek jelentést (207).

5.3.1. NDM-1- és CTX-M-27- termelő *E. coli* ST131 izolátum

A vizsgálatunkban leírt első CE9 karbapenemáz termelő ST131 izolátum a C1-M27 alkládba tartozott. Az előző fejezetben látható, hogy mind a két ST131 C alkládban írtak le NDM-1-termelő ST131 izolátumot. Ebben az esetben az CE9 izolátum F1:A2:B20 plazmidja a *bla*_{NDM-1} és a *bla*_{CTX-M-27} géneket együttesen kódolta, és az AMR-gének 5 kompozit transzpozonon (KT) helyezkedtek el. Ezek a kompozit transzpozonok a *K. pneumoniae* (KT I-II) és a korábbi vizsgálatban szereplő *E. coli* ST131 (KT III-V) izolátumokban is megtalálhatóak voltak. Ez felveti az lehetőségét annak, hogy a C1-M27 IncF plazmidjába integrálódott bele a *K. pneumoniae* NDM-1-et kódoló plazmid kompozit transzpozonjai, ezzel kialakítva ezt az új konstrukciót. A CE9 izolátum közeli rokonságot mutatott retrospektív vizsgálatban szereplő öt *E. coli* izolátummal, amelyek összesen három különböző évből és öt különböző helyről származtak, ami arra enged következtetni, hogy az ST131 izolátumok között nem figyelhető meg kórházi terjedés. A CE9 izolálásának idejében, ugyanabban az egészségügyi intézményben három NDM-1-termelő *K. pneumoniae* klón volt jelen, ami felvetette a lehetőségét annak, hogy a régóta jelen lévő klaszter A izolátumai képesek voltak felvenni a környezetükben megtalálható karbapenemáz géneket. Tóth és mtsai. vizsgálata arról számol be hogy 2022.01-2023.10 között, ebből az egészségügyi intézményből 65 vizsgált *K. pneumoniae* izolátumból 36 (3 különböző klón: ST107, ST147, ST395) hordozott NDM-1 termelő plazmidot (208). Mivel mindössze egy NDM-1-termelő ST131-ről van tudomásunk, ezért nehéz rekonstruálni, hogy hogyan történhetett meg, csupán hipotéziseket lehet felállítani.

Az CE9 izolátum esetén az AMR géneket a C1 alkládra jellemző F1:A2:B20 plazmidon hordozta és továbbra is egy klasztert alkotott a többi C1 izolátummal, illetve szoros genetikai rokonságot mutatott további öt korábbi ST131 izolátummal.

Ha a plazmidoknál kisebb mobilis genetikai elemek szintjén beszélünk a horizontális gének terjedéséről, akkor azt látjuk, hogy az antibiotikum rezisztencia gének kompozit transzpozonokkal képesek egységenként beépülni, amivel ritka CTX-M-27 és NDM-1 kombináció létrejöttét okozhatta. Az IS6 családjába tartozó kompozit transzpozonok klasszifikációja nem egyszerű. A leggyakrabban ismert az IS26, de ezzel azonosnak vagy nagyon közeli rokonainak ismert IS-ek közül néhányról (IS46, IS160, IS15, IS15Δ, IS6) szintén kimutatták, hogy kointegrátumokat képeznek (99,209). Mivel a különböző bioinformatikai eszközökkel (MGE, ISfinder, Prokka) a kompozit transzpozonokat alkotó IS15 és IS6-t nem tudta elkülöníteni egymástól, ezért használtuk az IS6 család megnevezést. A pCE9 az *bla*_{NDM-1} és *armA* MDR régiója a plazmid replikációja során létrejött kointegrátum szétválásából vagy az IS6 család által közvetített transzpozonok átviteléből származhatott.

További NDM-1- és CTX-M-27-termelő ST131 izolátumok megjelenéséről és elterjedéséről nincs tudomásunk. Azonban az ilyen ritka rekombinációs események által létrejött plazmidok megjelenése magába foglalja a veszélyt, hogy elterjedhet és járványokat okozhat. A Gong és társai leírtak Beijingben egy 18 hónapon át tartó KPC-2 karbapenem-rezisztens ST131 kórházi járványt, amely során az ST131 izolátumokban három féle *bla*_{KPC-2}-t hordozó plazmidot találtak, amelyek *E. coli*-ból, *K. pneumoniae*-ból és egy összetett plazmidból származtak. Az összetett plazmidok MDR régiója különböző *bla*_{KPC-2}-t hordozó plazmidok rekombinációjából vagy az IS26 által közvetített transzpozonok átviteléből származhatott (210). Ez az eset is rámutat arra, hogy az IS26 közvetítésével különféle multidrog-rezisztencia gének horizontálisan terjedhetnek a plazmidok között (210).

5.3.2. OXA-244- és CTX-M-15- termelő *E. coli* ST131 izolátum

A második karbapenemáz-termelő ST131 izolátumot is 2023-ban küldték be az NRL-be. A CE35 izolátum OXA-244- és CTX-M-15- termelőnek bizonyult, és az ST131 A kládjába tartozott. Ezen izolátum egyetlen klaszterhez sem tartozott, és habár epidemiológiai adatok nem állnak rendelkezésünkre, a vizsgálataink alapján a legvalószínűbb magyarázat az izolátum megjelenésére a külföldi behurcolás. Az emberi konfliktusok, mint például a háború, jelentős mértékben hozzájárulnak az antimikrobiális rezisztencia terjedéséhez. Az Egészségügyi Világszervezet és más szervezetek jelentései szerint az elmúlt években jelentősen nőtt a konfliktusok miatt kitelepített emberek száma. Az érintett országokból, mint például Afganisztán, Szíria és Ukrajna (2022-2023-as adatok alapján), érkező menekültek különösen nagy kockázatot jelentenek az AMR terjedésére, ami főként a szomszédos országokat érinti, mivel a kitelepített emberek 70%-át a szomszédos országokban szállásolják el (211,212).

Az *E. coli* ST131 izolátumokra jellemző *gyrA*(S83L)-t megtaláltuk, azonban a *gyrA*(D87N) szubsztitúciót nem. White és mtsai. is írtak már le egyetlen *gyrA*(S83L) mutációval rendelkező *E. coli* ST131 izolátumokat, amelyek közül nyolc az A és kettő a B kládba tartozott (213). Mindkét *gyrA* szubsztitúciós mutációját kapcsolatba hozzák a magas szintű flourokinolon rezisztenciával. Az S83L szubsztitúció azonban önmagában ugyanolyan mértékű ciprofloxacinnal rezisztenciát biztosít az *E. coli* számára, mint az S83L és a D87N kombinációja, míg a D87N szubsztitúció önmagában alacsonyabb rezisztenciát biztosít. (214,215). Továbbá, összefüggést találtak az S83L és D87N kettős mutáció és a levofloxacin rezisztencia között, míg ez nem volt igaz a *gyrA* S83L egyetlen mutációja esetében (216). Ezek az összefüggések alátámasztják azt, hogy a CE35 izolátum miért volt rezisztens ciprofloxacinnal, míg levofloxacinra továbbra is érzékeny maradt. Emellett látható, hogy habár a legtöbb cefalosporinnal szemben rezisztensnek bizonyult az izolátum, továbbra is érzékeny maradt aminoglikozidokra és az ertapenem kivételével a karbapenemekre (imipenem, meropenem). Ezt a jelenséget az OXA-244-et termelő *E. coli* különböző szekvenciájú izolátumaiban is leírták már: Hoyos-Mallecot és mtsai. ST38, ST361, ST1722, ST3541 (217), Grevskott és mtsai. ST38 (207) és AbuAlshaar és mtsai. ST131 (206)) esetében. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az OXA-244-et termelő izolátumokra jellemző az imipenem és meropenem típusú

karbapenemekkel szembeni továbbra is fennálló érzékenység. Ez megnehezítheti a OXA-244-termelő izolátumok felismerését és emiatt potenciális kockázatot jelent mind a betegellátásban, mind a rezisztens izolátumok kisselektálódásában és elterjedésében.

Vizsgálatunkban három különböző ST-be tartozó izolátumot találtunk, amelynél a *bla*_{OXA-244} karbapenemáz gén a kromoszómába integrálódott, ami arra utalhat, hogy a terjedés inkább a *bla*_{OXA-244}-et hordozó, IS1 családba tartozó kompozit transzpozonokhoz kapcsolódik, és nem plazmidokhoz. Ezen összetett transzpozonok transzpozíciója vagy rekombinációs eseményei beépíthették a *bla*_{OXA-244}-et az izolátumok kromoszómáiba, akár több példányban is, mint a CE27 izolátum esetében. Az IS1 egyszerű inszerciákat, vagy kointegrátumokat hoz létre, így a transzpozíció konzervatív (replikáció nélküli) és replikatív módon is végbemehet (218). IS1 családba tartozó IS1R és IS1D transzpozázok által határolt *bla*_{OXA-48}-szerű genetikai elemeket több esetben is leírtak *E. coli* izolátumokban (219,220). Ezenkívül a kromoszómálisan elhelyezkedő IS1 kompozit transzpozon által közrefogott *bla*_{OXA-244} gén egyedüli vagy más génekkel kombinált szekvenciáját megtalálták *E. coli* ST131 izolátumban Olaszországban (206), ST167-ben Csehországban (221), ST349, ST131 és ST38-ban Norvégiában (207,222), ST38-ban Németországban (223). Ezek az adatok azt jelzik, hogy a CE35-ben található *bla*_{OXA-244} gént egy olyan kompozit transzpozon hordozza, amely általában az IS1 családhoz társítható, főként kromoszómálisan és számos szekvencia típusban előfordul.

Az CE35-nál látható *bla*_{CTX-M-15} gén kromoszómális lokalizációja a már hazai ST131 C2 alkládnál is megfigyelt jelenséghez hasonlít, ami pedig tovább erősíti azt a lehetőséget, hogy a CTX-M-15 kromoszómába integrálódása evolúciós előnyt jelenthet a klónok számára.

Magyarországon eddig öt OXA-244-termelő *E. coli* izolátum jelenlétét tudtunk megerősíteni, ebből azonban már az egyik ST131-ba tartozott. 2021 júliusában az ECDC közzétett egy kockázatértékelést, ami rámutatott az OXA-244-et termelő *E. coli* prevalenciájának növekedésére Európában és az egészségügyi ellátással összefüggő terjedés kockázatára (224). Emellett Emeraud és mtsai. azt találták, hogy a OXA-244 változatot nehéz kimutatni a CRE-szűrő lemezekben a karbapenemáz alacsony hidrolitikus aktivitása miatt (225). Ezért a globális közegészségügy szempontjából különös

aggodalomra ad okot, hogy a nehezen kimutatható OXA-244 egyik változatát már egy olyan magas kockázatú klónhoz társulva tudtuk hazánkban is kimutatni, mint az ST131.

A vizsgálatainkban talált ST131 izolátumok közül 2023-ig csak harmadik generációs cefalosporin-rezisztens izolátumokat találtunk, és 2023-ban azonosítottuk az első karbapenemáz-termelő izolátumokat. Ez a folyamat megegyezik az *E. coli*-nál leírt antibiotikum rezisztencia spirál állomásaival. Tóth mtsai. tanulmányában egy magyarországi kórház antibiotikum fogyasztás és rezisztencia kapcsolatát vizsgálta, aminek kapcsán összefüggést mutattak ki a cefalosporin fogyasztás és a cefalosporin rezisztencia között (2015-2018-ban), valamint a cefalosporin rezisztencia és a karbapenem fogyasztás (2015-2016-ban) között (226,227). Általánosan a Gram-negatív baktériumokra vetített hipotézis szerint a cefalosporinok használata előidézte a cefalosporin rezisztencia terjedését a *Klebsiella spp.* és *E. coli* fajokban, ami a karbapenemek használatának növekedéséhez vezetett. Ez viszont a karbapenem rezisztens *P. aeruginosa* és *A. baumannii* megjelenését okozta, ami végül a colistin használatának növekedéséhez vezetett (226,227). A vizsgálat időszakában Magyarországon olyan alacsony volt a karbapenem rezisztencia aránya Enterobacteriaceae esetében, hogy ezeket az összefüggéseket nem tudták megvizsgálni *E. coli*-nál. A karbapenem rezisztens *E. coli* izolátumok incidenciája azonban várhatóan növekedni fog.

6. Következtetések

Munkám során az NNGYK-ba beküldött, véráramfertőzésből származó, C2/H30Rx vagy C1-M27 alkládba tartozó *E. coli* ST131 izolátumokat jellemeztem, kitérve az izolátumok virulomjára, rezisztomjára, az alkládokra jellemző *bla*_{CTX-M} genetikai környezetének jellemzésére, valamint a populáció szerkezetük meghatározására. Legjobb tudomásunk szerint ez az első tanulmány, ami országos szinten vizsgálja az *Escherichia coli* ST131 klón elterjedését. A vizsgálatainkban először mértük fel az ST131 prevalenciáját helyi szinten egy prospektív vizsgálatban. Ezt követően egy rertospektív vizsgálatban országos szinten határoztuk meg az ST131 C alkládjainak populációs szerkezetét és genetikai hátterét. Végül beszámoltunk két olyan 2023-ban újonnan megjelent ST131 izolátumokról, amelyek karbapenemáz-termelőnek bizonyultak. A hazai ST131 izolátumok rezisztenciájának mintázata összhangban van az antibiotikum rezisztencia spirál hipotézisével. A vizsgálataink során az egyik legmondernebb eljárást használtuk, a teljes genom szekvenálást. Az NRL-ben a molekuláris epidemiológiai kapcsolatok feltérképezésére a short-read szekvenálást használjuk, azonban a mobilis genetikai elemek jellemzéséhez szükségünk volt arra, hogy bevezessük a long-read szekvenálást is.

6.1. Prospektív, monocentrikus vizsgálat, 2018. október-november

A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy a 2018 októbere és novembere között egy budapesti kórházban véráramfertőzésből izolált invazív *E. coli*-k 24%-a ESBL-termelőnek bizonyult. Már ez a rövid távú vizsgálat is az ST131 dominanciáját mutatta, és azt, hogy mindkét C alklád jelen volt ebben az időszakban. A vizsgálat során sikerült azonosítanunk először az ST1193 hazai jelenlétét, amit külföldön már számos helyen leírtak. Emellett sikerült megállapítani a harmadik generációs cefalosporin-rezisztens *E. coli* invazív fertőzések incidenciáját (0,79 volt 1000 kórházi felvételenként) és incidencia sűrűségét (0,11 volt 1000 betegnaponként), amelyről vonatkozóan nem találtunk korábbi hazai adatokat.

6.2. Retrospektív, multicentrikus vizsgálat, 2015-2018 és 2021

Ez volt az első vizsgálat Magyarországon, mely a hazai *E. coli* ST131 C2/H30Rx és C1-M27 alkládjába tartozó, izolátumok populáció struktúráját vizsgálta genom-szinten. Ennél a vizsgálatnál vezettük be a long-read szekvenálást a laboratóriumunkban, amely kulcsfontosságúnak bizonyult a *bla*_{CTX-M} genetikai környezetének jellemzéséhez. A C2 alkládban a *bla*_{CTX-M-15} gén főként kromoszómálisan lokalizálódott, addig a C1-M27 alklád izolátumai plazmidon hordozták a *bla*_{CTX-M-27} rezisztencia gént. Az eredményeink arra utalnak, hogy az IS6/IS26 és *ISEcp1* által közvetített génszakaszok transzpozíciója jelentős evolúciós szereppel bírhatnak. Mindkét alklád egyaránt képes volt fennmaradni és terjedni, de eltérő evolúciós utakat követett. A C1-M27 izolátumok homogén klonális csoportot alkottak (klaszter A), míg a C2/H30Rx izolátumait öt klaszterbe lehetett sorolni, amelyek hipotézisünk szerint egymástól függetlenül jelentek meg.

6.3. Karbapenemáz-termelő ST131 *Escherichia coli* izolátumok, 2023

2023-ban Magyarországon két különböző karbapenemáz-termelő *E. coli* ST131 izolátumot azonosítottunk. A két ST131 izolátum különböző leszármazási vonallal, AMR génekkel rendelkezett és különböző módon jelenhettek meg. Ezek az izolátumok általánosan jellemzik az új rezisztens izolátumok megjelenésének két fő mechanizmusát: új törzs behurcolása (OXA-244- és CTX-M-15-termelő izolátum) vagy a már jelen lévő baktérium törzsek AMR génjeinek kombinálódása (NDM-1- és CTX-M-27-termelő izolátum). A multirezisztens *E. coli* mikorevolúciójának megértéséhez elengedhetetlen a klonális változások mellett a mobilis genetikai elemek vizsgálata, mivel az AMR gének terjedése több útvonalon is végbemehet. Ez a vizsgálat rámutat az ST131 klón evolúciójának következő szakaszára, ami a karbapenemáz-termelő izolátumok megjelenését okozta és ez előre vetíti azoknak a hazai elterjedését egy olyan szelektív környezetben, ahol a karbapenemek használata egyre gyakoribbá válik.

7. Összefoglalás

A 2010-es évek közepére a multidrog-rezisztens baktériumok közül a harmadik generációs cefalosporin-rezisztens (3GCR) *Escherichia coli* okozta megbetegedések terhe nőtt a legnagyobb mértékben a fertőzések és a halálesetek számát tekintve Európában. A 3GCR *E. coli* globális elterjedése az ST131 magas kockázatú klón C/H30 kládjához kapcsolódik, amely fluorokinolon és harmadik generációs cefalosporinokkal szemben is rezisztens. A C klád két alkládból áll: a C2/H30Rx-ként meghatározott C2 izolátumok főként a *bla*_{CTX-M-15} ESBL-gént hordozzák, addig a C1/H30R-ként meghatározott C1-M27 izolátumok a *bla*_{CTX-M-27-t}.

Munkánk célja volt, hogy a Magyarországon jelenlévő C1-M27 és C2/H30Rx alkládba tartozó *E. coli* ST131 izolátumok genetikai hátterét, rezisztomát, virulomját, mobilis genetikai elemeit és a populáció struktúráját megvizsgáljuk.

A prospektív vizsgálatunk eredményei alapján elmondhatjuk, hogy 2018. októbere és novembere között egy egészségügyi intérményben vett véráramfertőzésekéből származó *E. coli* izolátumok 24%-a bizonyult ESBL-termelőnek, és az ST131 dominanciája kimutatható volt.

A multicentrikus, retrospektív vizsgálatunk alapján elmondhatjuk, hogy a 2015-2018 és 2021-ből származó *E. coli* ST131 alkládok izolátumai eltérő módon jelenhettek meg és terjedhettek el Magyarországon. Míg a C1-M27 alklád izolátumai a 2015-ös hazai megjelenésüket követően egy klasztert alkotva terjedtek az országban, addig a C2/H30Rx klaszterek egymástól függetlenül terjedtek, és ezek a leszármazási vonalak még 2021-ben is kimutathatók voltak. A *bla*_{CTX-M-15} és *bla*_{CTX-M-27} gének terjedése szintén eltérő utat követett. A C2 alkládban a *bla*_{CTX-M-15} *ISEcp1* vagy *IS26* által közvetített kromoszómális integrációját figyeltük meg. Ezzel szemben a C1-M27 izolátumok az IncF plazmidon hordozták a *bla*_{CTX-M-27-et}.

A karbapenemáz-termelő két ST131 izolátumot először 2023-ban azonosítottunk Magyarországon. A C1 izolátum plazmidja a *bla*_{NDM-1-et} hordozó transzpozon és egy *bla*_{CTX-M27-t} hordozó plazmid homológ rekombinációjának eredménye volt, a *bla*_{OXA-244-et} hordozó izolátum külföldi behurcolását lehetett valószínűsíteni. Ez a vizsgálat rámutat az ST131 klón evolúciójának következő állomására, amely a karbapenemáz-termelő izolátumok megjelenését vetíti elő Magyarországon.

8. Summary

The burden of disease caused by third-generation cephalosporin-resistant (3GCR) *Escherichia coli* had increased the most among multidrug resistant bacteria in terms of the attributable number of infections and deaths in Europe by the mid-2010s. The global dissemination of 3GCR *E. coli* is associated with the high-risk clone ST131 subclade C2/H30Rx, which is characterized by resistance to fluoroquinolones as well as third-generation cephalosporins. Clade C comprises two subclades: C2 isolates defined as C2/H30Rx carry mostly the ESBL gene *bla*_{CTX-M-15}, the C1-M27 isolates defined as C1/H30Rx carry the *bla*_{CTX-M-27}.

The aim of this study was to characterize the genetic background, virulome, resistome, mobile genetic elements and population structure of *E. coli* ST131 isolates belonging to the C2/H30Rx or C1-M27 subclades from Hungary.

Results of our prospective study showed that 24% of *E. coli* isolated from blood cultures at a major tertiary-care hospital collected between October and November 2018, proved to be ESBL-producers, and the dominance of ST131 was detected there.

Results of our multicenter, retrospective study indicated that the population of the two subclades of *E. coli* ST131 collected between 2015-2018 and 2021 may have emerged and spread in different ways in Hungary. While the C1-M27 subclade isolates formed one cluster and disseminated across the country following their appearance in 2015, the C2/H30Rx clusters disseminated independently, with these clonal lineages were still detectable in 2021. The spread of the *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CTX-M-27} genes also followed different ways. In the C2 subclade, we observed chromosomal integration of the *bla*_{CTX-M-15} mediated either by *ISEcp1* or by *IS26*. In contrast, the C1-M27 isolates harboured *bla*_{CTX-M-27} on IncF plasmids.

Two carbapenemase-producing ST131 isolates were first identified in Hungary in 2023. While the plasmid of the C1 isolate was the result from homologous recombination between an *bla*_{NDM-1}-carrying transposon and a *bla*_{CTX-M-27}-carrying plasmid, the isolate harbouring *bla*_{OXA-244} was likely to be imported from abroad. This study highlights the next stage in the evolution of the ST131 clone, which predicts the emergence of carbapenemase-producing isolates in Hungary.

9. Irodalomjegyzék

1. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*. 2016;2016(May):1–8.
2. De Angelis G, Fiori B, Menchinelli G, D’Inzeo T, Liotti FM, Morandotti GA, et al. Incidence and antimicrobial resistance trends in bloodstream infections caused by ESKAPE and *Escherichia coli* at a large teaching hospital in Rome, a 9-year analysis (2007–2015). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(9):1627–36.
3. Yu Z, Tang J, Khare T, Kumar V. The alarming antimicrobial resistance in ESKAPEE pathogens: Can essential oils come to the rescue? *Fitoterapia*. 2020;140(November 2019):104433.
4. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(1):56–66.
5. Éva DC. *ESCHERICHIA*. *Klin és Járványügyi Bakteriológiai Kézikönyv*. 1999;Melánia ki:357–65.
6. Sora VM, Meroni G, Martino PA, Soggiu A, Bonizzi L, Zecconi A. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Virulence Factors and Antibiotic Resistance. *Pathogens*. 2021;10(11):1355.
7. Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*. 2015;2015(4):1–12.
8. Basavaraju M, Gunashree BS. *Escherichia coli*: An Overview of Main Characteristics. In: *Escherichia coli - Old and New Insights* [Internet]. IntechOpen; 2023. p. 116–24. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/84764>
9. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):123–40.
10. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jan 7;8(1):26–38.
11. Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(1):37–54.

12. Smit CCH, Lambert M, Rogers K, Djordjevic SP, Van Oijen AM, Keighley C, et al. One Health Determinants of *Escherichia coli* Antimicrobial Resistance in Humans in the Community: An Umbrella Review. *Int J Mol Sci.* 2023;24(24).
13. Garcia A, Fox JG, Besser TE. Zoonotic Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: A One Health Perspective. *ILAR J.* 2010;51(3):221–32.
14. Marshall BM, Levy SB. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(4):718–33.
15. Cheng G, Ning J, Ahmed S, Huang J, Ullah R, An B, et al. Selection and dissemination of antimicrobial resistance in Agri-food production. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8(1):1–13.
16. Delahoy MJ, Wodnik B, McAliley L, Penakalapati G, Swarthout J, Freeman MC, et al. Pathogens transmitted in animal feces in low- and middle-income countries. *Int J Hyg Environ Health.* 2018;221(4):661–76.
17. Graham DW, Collignon P, Davies J, Larsson DGJ, Snape J. Underappreciated role of regionally poor water quality on globally increasing antibiotic resistance. *Environ Sci Technol.* 2014;48(20):11746–7.
18. Lazarus B, Paterson DL, Mollinger JL, Rogers BA. Do Human Extraintestinal *Escherichia coli* Infections Resistant to Expanded-Spectrum Cephalosporins Originate From Food-Producing Animals? A Systematic Review. *Clin Infect Dis.* 2015;60(3):439–52.
19. Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, Muzammil S, Rasool M, Yasmeen N, et al. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11(November):1–20.
20. Delrose, N. (2024). One Health: Interdependence Between Human, Animal & Environmental Health. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-667045071c7de84ccc0ba82a-one-health-interdependence-between-human-animal-and-environm>.
21. Adams-Sapper S, Diep BA, Perdreau-Remington F, Riley LW. Clonal composition and community clustering of drug-susceptible and -resistant *Escherichia coli* isolates from bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.*

- 2013;57(1):490–7.
22. Bonnin RA, Bernabeu S, Emeraud C, Naas T, Girlich D, Jousset AB, et al. In Vitro Activity of Imipenem-Relebactam, Meropenem-Vaborbactam, Ceftazidime-Avibactam and Comparators on Carbapenem-Resistant Non-Carbapenemase-Producing Enterobacterales. *Antibiotics*. 2023;12(1):1–10.
 23. EUCAST. Expected Resistant Phenotypes Version 1.2 January 2023. 2023;(January):1–8.
 24. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268–81.
 25. C Reygaert W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*. 2018;4(3):482–501.
 26. Álvarez-Martínez FJ, Barrajón-Catalán E, Micol V. Tackling antibiotic resistance with compounds of natural origin: A comprehensive review. *Biomedicines*. 2020;8(10):1–30.
 27. Poolman JT, Wacker M. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, a common human pathogen: challenges for vaccine development and progress in the field. *J Infect Dis*. 2016;213(1):6–13.
 28. Patriarca G, Schiavino D, Lombardo C, Altomonte G, Decinti M, Buonomo A, et al. Tolerability of aztreonam in patients with IgE-mediated hypersensitivity to beta-lactams. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2008;21(2):375–9.
 29. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*. 2020;8(1):1–13.
 30. Poirel L, Madec J-Y, Lupo A, Schink A-K, Kieffer N, Nordmann P, et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr*. 2018 Jul 27;6(4).
 31. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDDD. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):565–91.

32. Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases: An update on their characteristics, epidemiology and detection. JAC-Antimicrobial Resist. 2021;3(3).
33. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. Front Microbiol. 2012;3(APR).
34. Bajaj P, Singh NS, Viridi JS. *Escherichia coli* β -lactamases: What really matters. Front Microbiol. 2016;7(MAR):1–14.
35. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(6):1211–33.
36. Poirel L, Gniadkowski M, Nordmann P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. J Antimicrob Chemother. 2002;50(6):1031–4.
37. Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C, et al. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. J Antimicrob Chemother. 2003;52(1):29–35.
38. Hayashi M, Matsui M, Sekizuka T, Shima A, Segawa T, Kuroda M, et al. Dissemination of IncF group F1:A2:B20 plasmid-harboring multidrug-resistant *Escherichia coli* ST131 before the acquisition of *bla*_{CTX-M} in Japan. J Glob Antimicrob Resist. 2020;23:456–65.
39. Matsumura Y, Johnson JR, Yamamoto M, Nagao M, Tanaka M, Takakura S, et al. CTX-M-27- and CTX-M-14-producing, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* of the H30 subclonal group within ST131 drive a Japanese regional ESBL epidemic. J Antimicrob Chemother. 2014;70(6):1639–49.
40. Coolen JPM, Den Drijver EPM, Kluytmans JAJW, Verweij JJ, Lamberts BA, Soer JACJ, et al. Development of an algorithm to discriminate between plasmid- and chromosomal-mediated AmpC β -lactamase production in *Escherichia coli* by elaborate phenotypic and genotypic characterization. J Antimicrob Chemother. 2019;74(12):3481–8.
41. Peter-Getzlaff S, Polsfuss S, Poledica M, Hombach M, Giger J, Böttger EC, et al.

- Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*: Comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis. J Clin Microbiol. 2011;49(8):2924–32.
42. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom K-A, Matsumura Y. The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. Clin Microbiol Rev. 2019;33(1).
 43. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, present, and future. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(11):4943–60.
 44. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. Ther Adv Infect Dis. 2016;3(1):15–21.
 45. Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, de Maio N, Moore CE, Sebra R, et al. Evolutionary history of the global emergence of the *Escherichia coli* epidemic clone ST131. MBio. 2016;7(2).
 46. Pitout JDD, Finn TJ. The evolutionary puzzle of *Escherichia coli* ST131. Infect Genet Evol. 2020;81(February):104265.
 47. Karczmarczyk M, Martins M, Quinn T, Leonard N, Fanning S. Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Food-Producing Animals. Appl Environ Microbiol. 2011;77(20):7113–20.
 48. Atac N, Kurt-Azap O, Dolapci I, Yesilkaya A, Ergonul O, Gonen M, et al. The Role of AcrAB–TolC Efflux Pumps on Quinolone Resistance of *E. coli* ST131. Curr Microbiol. 2018;75(12):1661–6.
 49. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. Microbiol Spectr. 2014;2(5).
 50. Chen X, Zhang W, Pan W, Yin J, Pan Z, Gao S, et al. Prevalence of qnr, aac(6′)-Ib-cr, qepA, and oqxAB in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(6):3423–7.
 51. Hooper DC, A. JG. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance David. Physiol Behav. 2017;176(3):139–48.
 52. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. Clin Microbiol Rev. 2003;16(3):430–50.

53. Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(2):523–37.
54. Lioy VS, Goussard S, Guerineau V, Yoon E-J, Courvalin P, Galimand M, et al. Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host. *RNA.* 2014;20(3):382–91.
55. Carattoli A. Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2227–38.
56. Li J, Zhang H, Ning J, Sajid A, Cheng G, Yuan Z, et al. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8(1):1–13.
57. Awosile BB, Agbaje M. Genetic Environments of Plasmid-Mediated *bla*_{CTXM-15} Beta-Lactamase Gene in Enterobacteriaceae from Africa. *Microbiol Res (Pavia).* 2021;12(2):383–94.
58. Bodendoerfer E, Marchesi M, Imkamp F, Courvalin P, Böttger EC, Mancini S. Co-occurrence of aminoglycoside and β -lactam resistance mechanisms in aminoglycoside- non-susceptible *Escherichia coli* isolated in the Zurich area, Switzerland. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;56(1):106019.
59. Mondal AH, Khare K, Saxena P, Debnath P, Mukhopadhyay K, Yadav D. A Review on Colistin Resistance: An Antibiotic of Last Resort. *Microorganisms.* 2024;12(4):772.
60. Abavisani M, Bostanghadiri N, Ghahramanpour H, Kodori M, Akrami F, Fathizadeh H, et al. Colistin resistance mechanisms in Gram-negative bacteria: A Focus on *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol.* 2023;76(2):1–13.
61. Choi Y, Lee JY, Lee H, Park M, Kang KJ, Lim SK, et al. Comparison of Fitness Cost and Virulence in Chromosome- and Plasmid-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2020;11(May):1–14.
62. Hussein NH, AL-Kadmy IMS, Taha BM, Hussein JD. Mobilized colistin resistance (mcr) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Mol Biol Rep.* 2021;48(3):2897–907.

63. Lakshmanan D, Ramasamy D, Subramanyam V, Saravanan SK. Mobile colistin resistance (mcr) genes and recent developments in colistin resistance detection. *Lett Appl Microbiol*. 2023;76(9):1–13.
64. Sun J, Chen C, Cui CY, Zhang Y, Liu X, Cui ZH, et al. Plasmid-encoded tet(X) genes that confer high-level tigecycline resistance in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol*. 2019;4(9):1457–64.
65. Pournaras S, Koumaki V, Spanakis N, Gennimata V, Tsakris A. Current perspectives on tigecycline resistance in Enterobacteriaceae: susceptibility testing issues and mechanisms of resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(1):11–8.
66. Moore IF, Hughes DW, Wright GD. Tigecycline is modified by the flavin-dependent monooxygenase TetX. *Biochemistry*. 2005;44(35):11829–35.
67. Guntari N, Sjatha F, Tjampakasari CR. Dihydrofolate Reductase (dfr) and Dihydropteroate Synthase (sul) Gene Mutations in *Escherichia coli* Trimethoprim-Sulfamethoxazole Resistance. 2024;8(1):51–9.
68. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol*. 1984;157(2):690–3.
69. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(10):4555–8.
70. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*. 2013;5(1):58–65.
71. Riley LW. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(5):380–90.
72. Clermont O, Gordon D, Denamur E. Guide to the various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology*. 2015;161(5):980–8.
73. Weissman SJ, Johnson JR, Tchesnokova V, Billig M, Dykhuizen D, Riddell K, et al. High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(5):1353–60.

74. Spratt BG. Exploring the Concept of Clonality in Bacteria. In: Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology. Totowa, NJ: Humana Press; 2004. p. 323–52.
75. Johnson JR, Nicolas-Chanoine MH, Deb Roy C, Castanheira M, Robicsek A, Hansen G, et al. Comparison of *Escherichia coli* ST131 pulsotypes, by epidemiologic traits, 1967-2009. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(4):598–607.
76. Neoh H min, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol*. 2019;74(March):103935.
77. Manges AR, Geum HM, Guo A, Edens TJ, Fibke CD, Pitout JDD. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(3).
78. Gilchrist CA, Turner SD, Riley MF, Petri WA, Hewlett EL. Whole-Genome Sequencing in Outbreak Analysis. *Clin Microbiol Rev*. 2015 Jul;28(3):541–63.
79. Kocsis B, Gulyás D, Szabó D. Emergence and Dissemination of Extraintestinal Pathogenic High-Risk International Clones of *Escherichia coli*. *Life*. 2022;12(12).
80. Baquero F. The 2010 Garrod Lecture: The dimensions of evolution in antibiotic resistance: Ex unibus plurum et ex pluribus unum. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(8):1659–72.
81. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of Clonally Related *Escherichia coli* Strains Expressing Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(14):195–200.
82. Rasoulinasab M, Shahcheraghi F, Feizabadi MM, Nikmanesh B, Hajihasani A, Aslani MM. Distribution of ciprofloxacin-resistance genes among ST131 and non-ST131 clones of *Escherichia coli* isolates with ESBL phenotypes isolated from women with urinary tract infection. *Iran J Microbiol*. 2021;13(3):294–302.
83. Piazza A, Corbella M, Marchetti VM, Merla C, Mileto I, Kuka A, et al. Clinical isolates of ST131 *bla*_{OXA-244}-positive *Escherichia coli*, Italy, December 2022 to July 2023. *Eurosurveillance*. 2024;29(8):1–7.
84. Peirano G, Bradford PA, Kazmierczak KM, Badal RE, Hackel M, Hoban DJ, et al.

- Global Incidence of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* ST131. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(11):1928–31.
85. Ludden C, Decano AG, Jamrozy D, Pickard D, Morris D, Parkhill J, et al. Genomic surveillance of *Escherichia coli* ST131 identifies local expansion and serial replacement of subclones. *Microb Genomics*. 2020;6(4).
 86. Johnson TJ, Danzeisen JL, Youmans B, Case K, Llop K, Munoz-Aguayo J, et al. Separate F-Type Plasmids Have Shaped the Evolution of the H30 Subclone of *Escherichia coli* Sequence Type 131. *mSphere*. 2016;1(4):1–15.
 87. Ben Zakour NL, Alsheikh-Hussain AS, Ashcroft MM, Khanh Nhu NT, Roberts LW, Stanton-Cook M, et al. Sequential acquisition of virulence and fluoroquinolone resistance has shaped the evolution of *Escherichia coli* ST131. *MBio*. 2016;7(2):1–11.
 88. Pitout JDD, DeVinney R. *Escherichia coli* ST131: A multidrug-resistant clone primed for global domination. *F1000Research*. 2017;6(0):1–7.
 89. Pitout JDD, Chen L. The Significance of Epidemic Plasmids in the Success of Multidrug-Resistant Drug Pandemic Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Dis Ther*. 2023;12(4):1029–41.
 90. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(5):1121–37.
 91. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Larsen MV, Lund O, Villa L, et al. In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):3895–903.
 92. Petty NK, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM, et al. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(15):5694–9.
 93. Matsumura Y, Pitout JDD, Gomi R, Matsuda T, Noguchi T, Yamamoto M, et al. Global *Escherichia coli* Sequence Type 131 Clade with *bla*_{CTX-M-27} Gene. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(11):1900–7.

94. Alba P, Taddei R, Cordaro G, Fontana MC, Toschi E, Gaibani P, et al. Carbapenemase IncF-borne *bla*_{NDM-5} gene in the *E. coli* ST167 high-risk clone from canine clinical infection, Italy. *Vet Microbiol*. 2021;256:109045.
95. Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Madec J-Y. *Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(3):543–74.
96. Kondratyeva K, Salmon-Divon M, Navon-Venezia S. Meta-analysis of Pandemic *Escherichia coli* ST131 Plasmidome Proves Restricted Plasmid-clade Associations. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–11.
97. Siguier P, Gournay E, Varani A, Ton-Hoang B, Chandler M. Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. Chandler M, Craig N, editors. *Microbiol Spectr*. 2015;3(2).
98. Harmer CJ, Hall RM. IS26 cannot move alone. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(6):1428–32.
99. Varani A, He S, Siguier P, Ross K, Chandler M. The IS6 family, a clinically important group of insertion sequences including IS26. *Mob DNA*. 2021;12(1):1–18.
100. Harmer CJ, Hall RM. IS26 and the IS26 family: versatile resistance gene movers and genome reorganizers. Detweiler CS, editor. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2024;88(2).
101. Poirel L, Lartigue M-F, Decousser J, Nordmann P. ISEcp1B-Mediated Transposition of *bla*_{CTX-M} in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(1):447–50.
102. Zong Z, Partridge SR, Iredell JR. ISEcp1-Mediated Transposition and Homologous Recombination Can Explain the Context of *bla*_{CTX-M-62} Linked to *qnrB2*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(7):3039–42.
103. Lipszyc A, Szuplewska M, Bartosik D. How Do Transposable Elements Activate Expression of Transcriptionally Silent Antibiotic Resistance Genes? *Int J Mol Sci*. 2022;23(15).
104. Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 2013;39(1):79–101.

105. Shawa M, Furuta Y, Mulenga G, Mubanga M, Mulenga E, Zorigt T, et al. Novel chromosomal insertions of ISEcp1-*bla*CTX-M-15 and diverse antimicrobial resistance genes in Zambian clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2021;10(1):1–16.
106. Biggel M, Moons P, Nguyen MN, Goossens H, Van Puyvelde S. Convergence of virulence and antimicrobial resistance in increasingly prevalent *Escherichia coli* ST131 papGII+ sublineages. *Commun Biol*. 2022;5(1):1–10.
107. Shropshire WC, Aitken SL, Pifer R, Kim J, Bhatti MM, Li X, et al. IS26-mediated amplification of *bla*_{OXA-1} and *bla*_{CTX-M-15} with concurrent outer membrane porin disruption associated with de novo carbapenem resistance in a recurrent bacteraemia cohort. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(2):385–95.
108. Biggel M, Xavier BB, Johnson JR, Nielsen KL, Frimodt-Møller N, Matheecussen V, et al. Horizontally acquired papGII-containing pathogenicity islands underlie the emergence of invasive uropathogenic *Escherichia coli* lineages. *Nat Commun*. 2020;11(1).
109. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(2):273–81.
110. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: A pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(1):1–14.
111. Olesen B, Frimodt-Møller J, Leihof RF, Struve C, Johnston B, Hansen DS, et al. Temporal Trends in Antimicrobial Resistance and Virulence-Associated Traits within the *Escherichia coli* Sequence Type 131 Clonal Group and Its H30 and H30-Rx Subclones, 1968 to 2012. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(11):6886–95.
112. ECDC. Antimicrobial resistance in the EU in 2012. *Vet Rec*. 2014 Apr 5;174(14):341–341.
113. Pal T, Darwish D, Sonnevend A, Kristof K, Szabo J, Urban E. Emergence of *Escherichia coli* O25b-ST131 clone among Hungarian bloodstream isolates. 22nd

- European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). 2012.
114. Jánvári L, Damjanova I, Topf J, Mag T, Mestyan G, Szolyka G, et al. Countrywide dissemination of CTX-M-27-producing *Escherichia coli* ST131 subclade C1-M27 in Hungary, 2015-2017. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). 2018.
 115. Ebrahimi MT, Hedayati MA, Pirlar RF, Mortazavi N, Nazari M, Ahmadi A, et al. Investigation of the biofilm formation in extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* ST131 strains and its correlation with the presence of fimH, afa, and kpsMSTII genes. J Appl Genet. 2023;64(2):367–73.
 116. Downing T. Tackling Drug Resistant Infection Outbreaks of Global Pandemic *Escherichia coli* ST131 Using Evolutionary and Epidemiological Genomics. Microorganisms. 2015;3(2):236–67.
 117. Banerjee R, Johnson JR. A new clone sweeps clean: The enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(9):4997–5004.
 118. Banerjee R, Robicsek A, Kuskowski MA, Porter S, Johnston BD, Sokurenko E, et al. Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Sequence Type 131 and Its H30 and H30-Rx Subclones among Extended-Spectrum- β -Lactamase-Positive and -Negative *E. coli* Clinical Isolates from the Chicago Region, 2007 to 2010. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(12):6385–8.
 119. Van der Bij AK, Peirano G, Pitondo-Silva A, Pitout JDD. The presence of genes encoding for different virulence factors in clonally related *Escherichia coli* that produce CTX-Ms. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;72(4):297–302.
 120. Blanco J, Mora A, Mamani R, López C, Blanco M, Dahbi G, et al. Four main virotypes among extended-spectrum- β -lactamase-producing isolates of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131: Bacterial, epidemiological, and clinical characteristics. J Clin Microbiol. 2013;51(10):3358–67.
 121. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, 2024.

<http://www.eucast.org>.

122. Pitout JDD, Reisbig MD, Venter EC, Church DL, Hanson ND. Modification of the double-disk test for detection of enterobacteriaceae producing extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. *J Clin Microbiol*. 2003;41(8):3933–5.
123. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method. Version 7.0, 2022. <http://www.eucast.org>.
124. Matsumura Y, Pitout JDD, Peirano G, DeVinney R, Noguchi T, Yamamoto M, et al. Rapid Identification of Different *Escherichia coli* Sequence Type 131 Clades. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(8).
125. Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe R V. PulseNet: The Molecular Subtyping Network for Foodborne Bacterial Disease Surveillance, United States. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(3):382–9.
126. Zhou Z, Alikhan NF, Mohamed K, Fan Y, Achtman M. The EnteroBase user’s guide, with case studies on Salmonella transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome Res*. 2020;30(1):138–52.
127. Bharti R, Grimm DG. Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Brief Bioinform*. 2021;22(1):178–93.
128. Logsdon GA, Vollger MR, Eichler EE. Long-read human genome sequencing and its applications. *Nat Rev Genet*. 2020 Oct 5;21(10):597–614.
129. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing. *Microb Genomics*. 2017;3(10).
130. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol*. 2019;37(5):540–6.
131. Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, et al. Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*. 2014;9(11).
132. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol*.

- 2017;13(6):1–20.
133. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010;26(5):589–95.
 134. Mikheenko A, Prjibelski A, Saveliev V, Antipov D, Gurevich A. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics*. 2018;34(13):i142–50.
 135. Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068–9.
 136. Tonkin-Hill G, MacAlasdair N, Ruis C, Weimann A, Horesh G, Lees JA, et al. Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. *Genome Biol*. 2020;21(1):1–21.
 137. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, Von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Mol Biol Evol*. 2020;37(5):1530–4.
 138. Tonkin-Hill G, Lees JA, Bentley SD, Frost SDW, Corander J. Fast hierarchical Bayesian analysis of population structure. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(11):5539–49.
 139. R Core Team. A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. [Internet]. 2018. Available from: <https://www.r-project.org/>
 140. Willems RJL, Top J, van Schaik W, Leavis H, Bonten M, Sirén J, et al. Restricted Gene Flow among Hospital Subpopulations of *Enterococcus faecium*. Keim PS, editor. *MBio*. 2012;3(4):e00151-12.
 141. Yu G, Smith DK, Zhu H, Guan Y, Lam TTY. Ggtree: an R Package for Visualization and Annotation of Phylogenetic Trees With Their Covariates and Other Associated Data. *Methods Ecol Evol*. 2017;8(1):28–36.
 142. Schliep KP. phangorn: Phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*. 2011;27(4):592–3.
 143. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W293–6.

144. Mutti M, Sonnevend Á, Pál T, Junttila S, Ekker H, Galik B, et al. Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* 81009, a Representative of the Sequence Type 131 C1-M27 Clade with a Multidrug-Resistant Phenotype. *Genome Announc.* 2018;6(8):1–2.
145. Ghosh H, Bunk B, Doijad S, Schmiedel J, Falgenhauer L, Spröer C, et al. Complete genome sequence of *bla*_{CTX-M-27}-encoding *Escherichia coli* strain H105 of sequence type 131 lineage C1/H30R. *Genome Announc.* 2017;5(31):30–1.
146. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(12):3491–500.
147. Joensen KG, Scheutz F, Lund O, Hasman H, Kaas RS, Nielsen EM, et al. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5).
148. Chen L, Zheng D, Liu B, Yang J, Jin Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D694–7.
149. Gilchrist CLM, Chooi YH. Clinker & clustermap.js: Automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics.* 2021;37(16):2473–5.
150. Orlek A, Phan H, Sheppard AE, Doumith M, Ellington M, Peto T, et al. Ordering the mob: Insights into replicon and MOB typing schemes from analysis of a curated dataset of publicly available plasmids. *Plasmid.* 2017;91:42–52.
151. Johansson MHK, Bortolaia V, Tansirichaiya S, Aarestrup FM, Roberts AP, Petersen TN. Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *J Antimicrob Chemother.* 2021;76(1):101–9.
152. Alikhan N-F, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics.* 2011;12(1):402.
153. de Kraker MEA, Jarlier V, Monen JCM, Heuer OE, van de Sande N, Grundmann H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: Trends from the

- European antimicrobial resistance surveillance system. Clin Microbiol Infect. 2013;19(9):860–8.
154. Martelius T, Jalava J, Kärki T, Möttönen T, Ollgren J, Lyytikäinen O. Nosocomial bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins, Finland, 1999–2013: Trends, patient characteristics and mortality. Infect Dis (Auckl). 2016;48(3):229–34.
 155. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol Rev. 1993;57(1):138–63.
 156. Johnson TJ, Elnekave E, Miller EA, Munoz-Aguayo J, Flores Figueroa C, Johnston B, et al. Phylogenomic Analysis of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Sequence Type 1193, an Emerging Multidrug-Resistant Clonal Group. Antimicrob Agents Chemother. 2018;63(1):1–15.
 157. Al-Farsi HM, Camporeale A, Ininbergs K, Al-Azri S, Al-Muharrmi Z, Al-Jardani A, et al. Clinical and molecular characteristics of carbapenem non-susceptible *Escherichia coli*: A nationwide survey from Oman. PLoS One. 2020;15(10 October).
 158. Wu J, Lan F, Lu Y, He Q, Li B. Molecular characteristics of ST1193 clone among phylogenetic group B2 Non-ST131 fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli*. Front Microbiol. 2017;8(NOV).
 159. Kim Y, Oh T, Nam Y, Cho S, Lee H. Prevalence of ST131 and ST1193 Among Bloodstream Isolates of *Escherichia coli* not Susceptible to Ciprofloxacin in a Tertiary Care University Hospital in Korea, 2013 - 2014. Clin Lab. 2017;63(09/2017).
 160. Valenza G, Werner M, Eisenberger D, Nickel S, Lehner-Reindl V, Höller C, et al. First report of the new emerging global clone ST1193 among clinical isolates of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* from Germany. J Glob Antimicrob Resist. 2019;17:305–8.
 161. Findlay J, Gould VC, North P, Bowker KE, Williams MO, MacGowan AP, et al. Characterization of cefotaxime-resistant urinary *Escherichia coli* from primary

- care in South-West England 2017-18. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(1):65–71.
162. Arredondo-Alonso S, Willems RJ, van Schaik W, Schürch AC. On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. *Microb Genomics.* 2017;3(10).
 163. van der Graaf-Van Bloois L, Wagenaar JA, Zomer AL. RFPlasmid: predicting plasmid sequences from short-read assembly data using machine learning. *Microb Genomics.* 2021;7(11).
 164. Sarowska J, Futoma-Koloch B, Jama-Kmiecik A, Frej-Madrzak M, Ksiazczyk M, Bugla-Ploskonska G, et al. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. *Gut Pathog.* 2019;11(1):1–16.
 165. Dahbi G, Mora A, Mamani R, López C, Alonso MP, Marzoa J, et al. Molecular epidemiology and virulence of *Escherichia coli* O16: H5-ST131: Comparison with H30 and H30-Rx subclones of O25b: H4-ST131. *Int J Med Microbiol.* 2014;304(8):1247–57.
 166. Johnson JR, Johnston B, Clabots C, Kuskowski MA, Castanheira M. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Dis.* 2010;51(3):286–94.
 167. Coelho A, Mora A, Mamani R, López C, González-López JJ, Larrosa MN, et al. Spread of *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131 producing CTX-M-15 and SHV-12 with high virulence gene content in Barcelona (Spain). *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(3):517–26.
 168. Mora A, Dahbi G, López C, Mamani R, Marzoa J, Dion S, et al. Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 *Escherichia coli* clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes. *PLoS One.* 2014;9(1).
 169. Lanza VF, de Toro M, Garcillán-Barcia MP, Mora A, Blanco J, Coque TM, et al. Plasmid Flux in *Escherichia coli* ST131 Sublineages, Analyzed by Plasmid Constellation Network (PLACNET), a New Method for Plasmid Reconstruction

- from Whole Genome Sequences. PLoS Genet. 2014;10(12).
170. Tóth K, Tóth Á, Kamotsay K, Németh V, Szabó D. Population snapshot of the extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* invasive strains isolated from a Hungarian hospital. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2022;21(1):1–13.
 171. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 - 2021 data. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control and World Health Organization; 2023. [Internet]. 2023. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>
 172. Juhász E, Iván M, Pintér E, Pongrácz J, Kristóf K. Colistin resistance among blood culture isolates at a tertiary care centre in Hungary. J Glob Antimicrob Resist. 2017;11:167–70.
 173. Wan F, Xu L, Ruan Z, Luo Q. Genomic and Transcriptomic Analysis of Colistin-Susceptible and Colistin-Resistant Isolates Identify Two-Component System EvgS/EvgA Associated with Colistin Resistance in *Escherichia coli*. Infect Drug Resist. 2021;14:2437–47.
 174. Zakaria AS, Edward EA, Mohamed NM. Genomic Insights into a Colistin-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Strain of O23:H4-ST641 Lineage Harboring mcr-1.1 on a Conjugative IncHI2 Plasmid from Egypt. Microorganisms. 2021;9(4).
 175. Ramirez MS, Tolmasky ME. Amikacin: Uses, resistance, and prospects for inhibition. Molecules. 2017;22(12).
 176. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat. 2010;13(6):151–71.
 177. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Chi HP, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: A new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med. 2006;12(1):83–8.
 178. Phan MD, Peters KM, Fraga LA, Wallis SC, Hancock SJ, Nhu NTK, et al. Plasmid-Mediated Ciprofloxacin Resistance Imparts a Selective Advantage on *Escherichia coli* ST131. Antimicrob Agents Chemother. 2022;66(1).

179. Firoozeh F, Saffari M, Neamati F, Zibaei M. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with cystitis and pyelonephritis. *Int J Infect Dis.* 2014 Dec;29:219–22.
180. Heimer SR, Rasko DA, Lockatell CV, Johnson DE, Mobley HLT. Autotransporter Genes *pic* and *tsh* Are Associated with *Escherichia coli* Strains That Cause Acute Pyelonephritis and Are Expressed during Urinary Tract Infection. *Infect Immun.* 2004;72(1):593–7.
181. Rahdar M, Rashki A, Miri HR, Ghalehnoo MR. Detection of *pap*, *sfa*, *afa*, *foc*, and *fim* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* isolates collected from patients with urinary tract infection. *Jundishapur J Microbiol.* 2015;8(8).
182. Moeinizadeh H, Shaheli M. Frequency of *hlyA*, *hlyB*, *hlyC* and *hlyD* genes in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from UTI patients in Shiraz. *GMS Hyg Infect Control.* 2021;16:Doc25.
183. Zalewska B, Piatek R, Bury K, Samet A, Nowicki B, Nowicki S, et al. A surface-exposed *DraD* protein of uropathogenic *Escherichia coli* bearing *Dr* fimbriae may be expressed and secreted independently from *DraC* usher and *DraE* adhesin. *Microbiology.* 2005;151(7):2477–86.
184. Korotkova N, Yarova-Yarovaya Y, Tchesnokova V, Yazvenko N, Carl MA, Stapleton AE, et al. *Escherichia coli* *DraE* adhesin-associated bacterial internalization by epithelial cells is promoted independently by decay-accelerating factor and carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule binding and does not require the *draD* invasin. *Infect Immun.* 2008;76(9):3869–80.
185. Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HLT. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2007;189(9):3532–46.
186. Spurbeck RR, Dinh PC, Walk ST, Stapleton AE, Hooton TM, Nolan LK, et al. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyua*, *chua*, and *yfcv* efficiently colonize the urinary tract. *Infect Immun.* 2012;80(12):4115–22.
187. Fabbri A, Travaglione S, Fiorentini C. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): Toxin biology, in Vivo applications and therapeutic potential.

- Toxins (Basel). 2010;2(2):283–96.
188. Hoffman JA, Badger JL, Zhang Y, Huang SH, Kim KS. *Escherichia coli* K1 aslA contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo. *Infect Immun*. 2000;68(9):5062–7.
 189. Dale AP, Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *J Infect*. 2015 Dec;71(6):615–26.
 190. Ciesielczuk H, Betts J, Phee L, Doumith M, Hope R, Woodford N, et al. Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. *Virulence*. 2015;6(2):145–51.
 191. Alghoribi MF, Gibreel TM, Dodgson AR, Beatson SA, Upton M. *Galleria mellonella* infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic *E. coli*. *PLoS One*. 2014;9(7).
 192. Hirai I, Fukui N, Taguchi M, Yamauchi K, Nakamura T, Okano S, et al. Detection of chromosomal *bla*_{CTX-M-15} in *Escherichia coli* O25b-B2-ST131 isolates from the Kinki region of Japan. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42(6):500–6.
 193. Harmer CJ, Hall RM. An analysis of the IS6/IS26 family of insertion sequences: Is it a single family? *Microb Genomics*. 2019;5(9).
 194. Yoon E-J, Gwon B, Liu C, Kim D, Won D, Park SG, et al. Beneficial Chromosomal Integration of the Genes for CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* for Stable Propagation. Bulman Z, editor. *mSystems*. 2020;5(5):1–13.
 195. Cerquetti M, Giufrè M, García-Fernández A, Accogli M, Fortini D, Luzzi I, et al. Ciprofloxacin-resistant, CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 clone in extraintestinal infections in Italy. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(10):1555–8.
 196. Palkovicova J, Sukkar I, Delafuente J, Valcek A, Medvecky M, Jamborova I, et al. Fitness effects of bla CTX-M-15-harbouring F2:A1:B– plasmids on their native *Escherichia coli* ST131 H 30Rx hosts. *J Antimicrob Chemother*. 2022;77(11):2960–3.
 197. Yasugi M, Hatoya S, Motooka D, Matsumoto Y, Shimamura S, Tani H, et al.

- Whole-genome analyses of extended-spectrum or AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from companion dogs in Japan. Ruan Z, editor. PLoS One. 2021;16(2):e0246482.
198. Matsuo N, Nonogaki R, Hayashi M, Wachino J-I, Suzuki M, Arakawa Y, et al. Characterization of *bla*_{CTX-M-27} /F1:A2:B20 Plasmids Harbored by *Escherichia coli* Sequence Type 131 Sublineage C1/ H 30R Isolates Spreading among Elderly Japanese in Nonacute-Care Settings. Antimicrob Agents Chemother. 2020;64(5).
 199. Zhang Y, Sun YH, Wang JY, Chang MX, Zhao QY, Jiang HX. A Novel Structure Harboring *bla*_{CTX-M-27} on IncF Plasmids in *Escherichia coli* Isolated from Swine in China. Antibiotics. 2021;10(4):1–11.
 200. Cherubini S, Perilli M, Azzini AM, Tacconelli E, Maccacaro L, Bazaj A, et al. Resistome and Virulome of Multi-Drug Resistant *E. coli* ST131 Isolated from Residents of Long-Term Care Facilities in the Northern Italian Region. Diagnostics. 2022;12(1).
 201. Cai JC, Zhang R, Hu YY, Zhou HW, Chen GX. Emergence of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates producing KPC-2 carbapenemase in China. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(2):1146–52.
 202. O'Hara JA, Hu F, Ahn C, Nelson J, Rivera JJ, Pasculle AW, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Escherichia coli*: Occurrence of ST131-fimH30 subclone harboring pKpQIL-like IncFIIk plasmid. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(7):4234–7.
 203. Matsumura Y, Peirano G, Bradford PA, Motyl MR, DeVinney R, Pitout JDD. Genomic characterization of IMP and VIM carbapenemase-encoding transferable plasmids of Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2018;73(11):3034–8.
 204. Peirano G, Chen L, Nobrega D, Finn TJ, Kreiswirth BN, DeVinney R, et al. Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Escherichia coli*, 2015–2017. Emerg Infect Dis. 2022 May;28(5):2008–14.
 205. Welker S, Boutin S, Miethke T, Heeg K, Nurjadi D. Emergence of carbapenem-resistant ST131 *Escherichia coli* carrying *bla*_{OXA-244} in Germany, 2019 to 2020. Eurosurveillance. 2020;25(46):1–8.

206. AbuAlshaar A, Piazza A, Mercato A, Marchesini F, Mattioni Marchetti V, Bitar I, et al. OXA-244-Producing ST131 *Escherichia coli* From Surface and Groundwaters of Pavia Urban Area (Po Plain, Northern Italy). *Front Microbiol.* 2022;13(June):1–14.
207. Grevskott DH, Radisic V, Salvà-Serra F, Moore ERB, Akervold KS, Victor MP, et al. Emergence and dissemination of epidemic-causing OXA-244 carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST38 through hospital sewage in Norway, 2020–2022. *J Hosp Infect.* 2024;145:165–73.
208. Á. Tóth, L. Buzgó, E. Ungvári, K. Tóth, D. Göbhardter, Á. Hajdu, R. Kollár, K. Kamotsay, B. Bence, K. Kristóf K, Papp, K. Wolfárt, V. Cser ID. High prevalence of hypervirulence-associated genes in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Hungary. In: ECCMID 2024.
209. Barker RF, Thompson D V., Talbot DR, Swanson J, Bennetzen JL. Nucleotide sequence of the transposable element IS15. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(17):6924.
210. Gong L, Tang N, Chen D, Sun K, Lan R, Zhang W, et al. A Nosocomial Respiratory Infection Outbreak of Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* ST131 With Multiple Transmissible blaKPC–2 Carrying Plasmids. *Front Microbiol.* 2020;11(September):1–9.
211. Pallett SJC, Boyd SE, O’Shea MK, Martin J, Jenkins DR, Hutley EJ. The contribution of human conflict to the development of antimicrobial resistance. *Commun Med.* 2023;3(1):5–8.
212. Zwittink RD, Wielders CCH, Notermans DW, Verkaik NJ, Schoffelen AF, Witteveen S, et al. Multidrug-resistant organisms in patients from Ukraine in the Netherlands, March to August 2022. *Eurosurveillance.* 2022;27(50):1–8.
213. White RT, Bull MJ, Barker CR, Arnott JM, Wootton M, Jones LS, et al. Genomic epidemiology reveals geographical clustering of multidrug-resistant *Escherichia coli* ST131 associated with bacteraemia in Wales. *Nat Commun.* 2024;15(1):1371.
214. Marcusson LL, Frimodt-Møller N, Hughes D. Interplay in the Selection of Fluoroquinolone Resistance and Bacterial Fitness. Levin BR, editor. *PLoS Pathog.* 2009;5(8):e1000541.

215. Machuca J, Briales A, Labrador G, Díaz-de-Alba P, López-Rojas R, Docobo-Pérez F, et al. Interplay between plasmid-mediated and chromosomal-mediated fluoroquinolone resistance and bacterial fitness in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(12):3203–15.
216. Fu Y, Zhang W, Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F, et al. Specific patterns of gyr A mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *BMC Infect Dis*. 2013;13(1):8.
217. Hoyos-Mallecot Y, Naas T, Bonnin RA, Patino R, Glaser P, Fortineau N, et al. OXA-244-Producing *Escherichia coli* Isolates, a Challenge for Clinical Microbiology Laboratories. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(9):1–7.
218. Ton-Hoang B, Turlan C, Chandler M. Functional domains of the IS1 transposase: Analysis in vivo and in vitro. *Mol Microbiol*. 2004;53(5):1529–43.
219. Hendrickx APA, Landman F, de Haan A, Witteveen S, van Santen-Verheuvél MG, Schouls LM. *bla*_{OXA-48}-like genome architecture among carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands. *Microb Genomics*. 2021;7(5).
220. Fan C, Wu YH, Decker CM, Rohani R, Gesell Salazar M, Ye H, et al. Defensive Function of Transposable Elements in Bacteria. *ACS Synth Biol*. 2019;8(9):2141–51.
221. Chudejova K, Kraftova L, Mattioni Marchetti V, Hrabak J, Papagiannitsis CC, Bitar I. Genetic Plurality of OXA/NDM-Encoding Features Characterized From Enterobacterales Recovered From Czech Hospitals. *Front Microbiol*. 2021;12(February):1–9.
222. Lindemann PC, Pedersen T, Oma DH, Janice J, Grøvan F, Chedid GM, et al. Intraregional hospital outbreak of OXA-244-producing *Escherichia coli* ST38 in Norway, 2020. *Eurosurveillance*. 2023;28(27):1–8.
223. Reichert F, Brinkwirth S, Pfennigwerth N, Haller S, Fritsch LS, Eckmanns T, et al. Prolonged carriage of OXA-244-carbapenemase-producing *Escherichia coli* complicates epidemiological investigations. *Int J Med Microbiol*. 2024;314:151595.

224. European Centre for Disease Prevention and Control. OXA-244-producing *Escherichia coli* in the European Union/European Economic Area and the UK since 2013, first update – 20 July 2021. ECDC: Stockholm; 2021.
225. Emeraud C, Biez L, Girlich D, Jousset AB, Naas T, Bonnin RA, et al. Screening of OXA-244 producers, a difficult-to-detect and emerging OXA-48 variant? J Antimicrob Chemother. 2020 May 3;75(8):2120–3.
226. Tóth H, Fésüs A, Kungler-Gorács O, Balázs B, Majoros L, Szarka K, et al. Utilization of Vector Autoregressive and Linear Transfer Models to Follow up the Antibiotic Resistance Spiral in Gram-negative Bacteria from Cephalosporin Consumption to Colistin Resistance. Clin Infect Dis. 2019;69(8):1410–21.
227. Tóth H, Buchholcz G, Fésüs A, Balázs B, Nagy JB, Majoros L, et al. Evolution of the Gram-Negative Antibiotic Resistance Spiral over Time: A Time-Series Analysis. Antibiotics. 2021;10(6):734.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

Kinga Tóth, Ivelina Damjanova, Levente Laczkó, Lilla Buzgó, Virág Lesinszki, Erika Ungvári, Laura Jánvári, Adrienn Hanczvikkell, Ákos Tóth, Dóra Szabó. Genomic Epidemiology of C2/H30Rx and C1-M27 Subclades of *Escherichia coli* ST131 Isolates from Clinical Blood Samples in Hungary. *Antibiotics*. 2024; 13(4): 363. **IF: 4.3**

Kinga Tóth, Ákos Tóth, Katalin Kamotsay, Viktória Németh, Dóra Szabó. Population snapshot of the extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* invasive strains isolated from a Hungarian hospital; *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2022; 21(1): 1-13. **IF: 5.7**

10.2. A disszertáció témájával kapcsolódó előadások jegyzéke

Tóth Kinga, Damjanova Ivelina, Buzgó Lilla, Lesinszki Virág, Ungvári Erika, Papp Katalin, Laczkó Levente, Szabó Dóra, Tóth Ákos: NDM-1- és CTX-M-27-termelő *Escherichia coli* ST131 klón első leírása Magyarországon; Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 50. kongresszusa, Bükkfürdő, 2023 (poszter prezentáció)

Kinga Tóth, Ivelina Damjanova, Levente Laczkó, Lilla Buzgó, Virág Lesinszki, Erika Ungvári, Dóra Szabó, Ákos Tóth: High frequency of chromosomal integration of *bla*_{CTX-M-15} among *Escherichia coli* ST131 isolates in Hungary, 33rd ECCMID konferencia. Koppenhága, 2023 (poszter prezentáció)

Tóth Kinga, Damjanova Ivelina, Hanczvikkell Adrienn, Buzgó Lilla, Lesinszki Virág, Ungvári Erika, Szabó Dóra, Tóth Ákos: Hemokultúrából származó ESBL-termelő *Escherichia coli* ST131 izolátumok molekuláris epidemiológiája Magyarországon;

Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 49. kongresszusa, Miskolc, 2022 (poszter prezentáció)

Kinga Tóth, Ákos Tóth, Dóra Szabó: Comparative genomic analysis of the subclades C2/H30Rx and C1-M27 of *Escherichia coli* ST131 high-risk clone across Hungary from 2007-2018; PhD Scientific Days 2021 conference, Budapest, 2021 (előadás)

Kinga Tóth, Ákos Tóth, Laura Jánvári, Erika Ungvári, Ivelina Damjanova, Dóra Szabó: Genomic analysis of the subclades C2/H30Rx and C1-M27 of *Escherichia coli* ST131 high risk clone across Hungary; 30. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 2020 (Az absztraktot elfogadták, de a konferencia a COVID-19 járvány kitörése miatt elmaradt)

Kinga Tóth, Judit Pásztai, Ivelina Damjanova, Katalin Kamotsay, Viktória Németh, Ákos Tóth, Dóra Szabó: Population snapshot of the CTX-M-producing *Escherichia coli* isolated from haemoculture in a Hungarian hospital; 18th International Congress of the Hungarian Society for Microbiology, Budapest, Hungary, 2019 (poszter prezentáció)

10.3. A disszertáció témájával nem kapcsolatos előadások jegyzéke

Tóth Kinga, Erdősi Tímea, Ungvári Erika, Mányoki-Vincze Adél, Tóth Ákos: Hazai *Streptococcus pyogenes* izolátumok jellemzése MIFKMT Mikrobiológiai Szekciójának Tudományos Ülése, Budapest, 2024

Tóth Ákos, Ungvári Erika, Erdősi Tímea, **Tóth Kinga**, Pappné Terhes Gabriella, Kristóf Katalin. *Streptococcus pyogenes* M1UK hipervirulens klón helyzete Magyarországon- a molekuláris epidemiológiai surveillance első eredményei. Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 50. Kongresszusa, Bükkfürdő, 2023 (poszter prezentáció)

Ungvári Erika, Kamotsay Katalin, **Tóth Kinga**, Berta Brigitta, Derzsy Noémi, Fodor Kinga, Tóth Ákos. Linezolid rezisztencia megjelenése különböző genetikai háttérű *Enterococcus* spp. izolátumokban egy budapesti kórházban. Magyar Infektológiai és

Klinikai Mikrobiológiai Társaság 50. Kongresszusa, Bükfürdő, 2023. (poszter prezentáció)

Ákos Tóth, Lilla Buzgó, Virág Lesinszki, **Kinga Tóth**, Erika Ungvári, Zsanett Kiss, Dániel Göbhardt, Ágnes Hajdu, Edit Székelyi-Szabó, Renáta Kollár, László Majoros, Bence Balázs, Katalin Mályi, Gabriella Gömöri, Ivelina Damjanova. Emergence of NDM-5 and OXA-232 co-producing *Klebsiella pneumoniae* ST395 in a tertiary-level hospital in Hungary. 33rd ECCMID konferencia. Koppenhága, Dánia, 2023 (poszter prezentáció)

Tóth Ákos, Buzgó Lilla, Lesinszki Virág, Ungvári Erika, **Tóth Kinga**, Kiss Zsanett, Göbhardt Dániel, Damjanova Ivelina. Karbapenémáz-termelő *Enterobacterales* hazai mikrobiológiai helyzete. Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság Tudományos ülése, Budapest, 2023.

Kinga Tóth, Noémi Derzsy, Brigitta Berta, Ákos Tóth, Erika Ungvári: A genom-alapú tipizálás szerepe egy kórházi MRSA halmozódás kivizsgálásában; Magyar Infektológiai és Klinikai Mikrobiológiai Társaság 48. kongresszusa, Debrecen, 2021 (poszter prezentáció)

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni Dr. Szabó Dórának, hogy elvállalta témavezetésem, támogatta munkámat és biztosította a kutatásom anyagi feltételeit.

A legnagyobb köszönet azonban mégis Dr. Tóth Ákost illeti, aki az MSc óta támogatja tudományos pályafutásomat és végigkísérte PhD munkámat is. Szeretném megköszönni neki, hogy mindig bizalommal fordulhattam hozzá, a tanácsait, a segítségét, valamint azt az időt és energiát, amit rám szánt. Bár a laboratórium és az intézet neve az évek során többször változott, ő mindig mellettem állt és segítette a publikációim és a dolgozat elkészülését.

Szeretnék köszönetet mondani a Bakteriológia I. munkacsoport jelenlegi és korábbi tagjainak a munkámban nyújtott segítségükért, a barátságos környezet biztosításáért és azért, hogy igyekeztek tiszteletben tartani a reggel 10-es szabályt. Különösen hálás vagyok Dr. Hanczvikkal Adriennek, Buzgó Lillának, hogy a laboratóriumi munkán túl is mellettem álltak. Köszönöm Dr. Ivelina Damjanovának és Lesinszki Virágnak a PFGE tipizálásában és elemzésében nyújtott segítségüket.

Köszönöm a Debreceni Egyetem Metagenomikai Intézetének munkatársainak, különösen Dr. Kardos Gábornak, hogy lehetőséget adott a long-read szekvenálás elsajátítására, valamint Dr. Laczkó Leventének, hogy gyorsan megoldotta és elvégezte az összes bioinformatikai vizsgálatot, ami már túlmutatott rajtam.

Köszönöm a Nemzeti Népegészségügyi és Gyógyszerészeti Központnak, hogy biztosította a feltételeket a laboratóriumi munkámhoz és támogatta a doktori munkám elvégzését. Köszönöm a lehetőséget, hogy tanulmányaimat a Semmelweis Egyetem Orvosi Mikrobiológiai Intézet és a Patológiai Doktori Iskola hallgatójaként végezhettem el.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Kelemen Andreának, akit boldogan nevezhetek a legjobb barátomnak, akire mind emberileg, mind szakmailag felnézek. Mindig támogatott és segített abban, hogy ne adjam fel és folytassam a munkámat.

Végül köszönöm a családomnak a támogatásukat, hogy megengedték, hogy időt töltssek a munkámmal, hogy meghallgatták minden panaszomat, és hogy békén hagytak, amikor szükségem volt rá.

Függelék

Függelék, Táblázat 1.: A 6 ESBL-termelő *E. coli* izolátum ST típusa, izolálás helye, ideje és kora (4.1. fejezetben található vizsgálathoz tartozó izolátumok)

Izolátum kódja	Egészségügyi intézmény	ST típus	ST131 alklád	izolálás ideje	Nem	Kor
Ec1	12	ST131	C2/H30Rx	2018.10.13	nő	63
Ec2	12	ST131	C2/H30Rx	2018.10.16	férfi	83
Ec3	12	ST131	C2/H30Rx	2018.10.30	férfi	77
Ec4	12	ST131	C1-M27	2018.10.12	férfi	38
Ec5	12	ST131	C1-M27	2018.10.24	nő	58
Ec6	12	ST1193	-	2018.10.12	nő	90

Függelék, Táblázat 2.: 30 C2/H30Rx és 33 C1-M27 ESBL-termelő *E. coli* ST131 izolálás helye, ideje, neme és kora (4.2. fejezetben található vizsgálathoz tartozó izolátumok). A sárgával jelölt izolátumok lettek kiválasztva long-read szekvenálásra.

Izolátum kódja	Egészségügyi intézmény	ST131 alklád	izolálás ideje	Nem	Kor
AN10	1	C1-M27	2016.08.29.	nő	52
AN12	2	C1-M27	2017.02.28.	férfi	54
AN13	3	C1-M27	2017.05.17.	nő	59
AN14	4	C1-M27	2017.04.23.	férfi	78
AN15	5	C1-M27	2017.05.07.	férfi	86
AN16	6	C1-M27	2017.09.19.	nő	75
AN17	7	C1-M27	2018.06.24.	férfi	87
AN18	8	C1-M27	2018.10.26.	nő	91
AN3	11	C1-M27	2016.04.08.	nő	68
EC1	12	C2/H30Rx	2018.10.13.	nő	63
EC2	12	C2/H30Rx	2018.10.16.	férfi	83
EC3	12	C2/H30Rx	2018.10.30.	férfi	77
EC4	12	C1-M27	2018.10.12.	férfi	38
EC5	12	C1-M27	2018.10.24.	nő	58
EC7	8	C2/H30Rx	2021.02.25.	nő	67
EC9	10	C2/H30Rx	2021.10.19.	férfi	66
EC10	15	C2/H30Rx	2021.04.11.	nő	46
EC11	15	C2/H30Rx	2021.10.05.	férfi	86
EC12	3	C2/H30Rx	2021.06.10.	nő	44

EC13	12	C2/H30Rx	2021.07.14.	nő	87
EC14	13	C2/H30Rx	2021.03.26.	nő	92
EC15	13	C2/H30Rx	2021.11.27.	férfi	49
EC16	14	C2/H30Rx	2021.10.03.	férfi	78
EC17	14	C2/H30Rx	2021.11.27.	férfi	64
EC18	4	C2/H30Rx	2021.07.31.	férfi	71
EC19	5	C2/H30Rx	2021.06.27.	férfi	77
EC20	7	C2/H30Rx	2021.02.06.	férfi	75
EC21	7	C2/H30Rx	2021.05.06.	nő	62
EC22	2	C2/H30Rx	2021.04.21.	férfi	70
EC23	18	C2/H30Rx	2021.09.22.	nő	52
EC24	1	C2/H30Rx	2021.12.09.	férfi	72
EC25	1	C2/H30Rx	2021.09.10.	nő	89
EC26	10	C1-M27	2021.10.21.	nő	80
EC27	15	C1-M27	2021.01.14.	férfi	64
EC28	3	C1-M27	2021.04.10.	nő	95
EC29	3	C1-M27	2021.10.21.	nő	91
EC30	12	C1-M27	2021.04.20.	férfi	74
EC31	13	C1-M27	2021.07.23.	férfi	70
EC32	16	C1-M27	2021.07.07.	férfi	76
EC33	16	C1-M27	2021.06.03.	férfi	74
EC34	21	C1-M27	2021.08.15.	férfi	64
EC35	21	C1-M27	2021.06.16.	nő	81
EC36	4	C1-M27	2021.05.01.	férfi	20
EC37	9	C1-M27	2021.03.11.	nő	60
EC38	2	C1-M27	2021.01.07.	nő	72
EC39	2	C1-M27	2021.04.27.	férfi	0
EC40	2	C1-M27	2021.09.09.	férfi	80
EC41	18	C1-M27	2021.08.27.	férfi	67
K3	18	C2/H30Rx	2015.08.23.	férfi	85
K4	4	C2/H30Rx	2015.12.18.	férfi	66
K5	19	C2/H30Rx	2016.04.19.	férfi	50
K6	2	C2/H30Rx	2016.05.19.	nő	59
K7	20	C2/H30Rx	2017.05.28.	nő	64
K8	8	C2/H30Rx	2017.02.09.	nő	68
K9	1	C1-M27	2017.09.18.	férfi	78
K10	4	C2/H30Rx	2017.12.25.	nő	91
K11	10	C2/H30Rx	2018.06.24.	férfi	70
K12	3	C2/H30Rx	2018.11.05.	férfi	86
K16	3	C1-M27	2015.07.07.	férfi	82
K17	3	C1-M27	2015.04.18.	férfi	74

K18	9	C1-M27	2015.09.08.	férfi	73
K19	14	C1-M27	2017.03.24.	férfi	58
K20	11	C1-M27	2017.08.16.	férfi	72

Függelék, Táblázat 3.: NDM-1-termelő *K. pneumoniae* és *E. coli* izolátum ST típusa, izolálás helye, ideje, neme és kora (4.3.1. fejezetben található vizsgálatához tartozó izolátumok). A 4.2.1. fejezetben szereplő további C1-M27 *E. coli* ST131 izolátumok megegyeznek a melléklet B táblázatában szereplő C1-M27 izolátumaival

Izolátum kódja	Izolátum	Egészségügyi intézmény	ST típus	Izolálás ideje	Nem	Kor
K119	<i>K. pneumoniae</i>	21	ST395	2022.03.04.	férfi	63
K173	<i>K. pneumoniae</i>	21	ST107	2022.10.15.	nő	72
K244	<i>K. pneumoniae</i>	21	ST147	2023.02.05.	férfi	56
CE9	<i>E. coli</i>	21	ST131 (C1-M27)	2023.03.14.	nő	83

Függelék, Táblázat 4.: OXA-244-termelő *E. coli* izolátum ST típusa, izolálás helye, ideje neme és kora (4.3.2. fejezetben található vizsgálatához tartozó izolátumok). A 4.3.2. fejezetben szereplő további C2/H30Rx *E. coli* ST131 izolátumok megegyeznek a melléklet B táblázatában szereplő C2/H30Rx izolátumaival.

Izolátum kódja	Egészségügyi intézmény	ST típus	izolálás ideje	Nem	Kor
CE33	12	ST38	2023.12.14.	nő	0
CE27	12	ST448	2023.07.31.	férfi	52
CE35	22	ST131 (A klád)	2023.05.03.	férfi	63
CE28	12	ST38	2023.11.20.	férfi	0
CE29	12	ST38	2023.11.20.	férfi	0