

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIA INTÉZET
ÁLTALÁNOS ÉS KÖRNYEZETI MIKROBIOLÓGIA TANSZÉK

36. OTDK Biológia Szekció

**A *bla*TEM gént hordozó *Escherichia coli* és *Klebsiella* törzsek
antibiotikum érzékenységének vizsgálata**



Témavezető: DR. GAZDAG ZOLTÁN
HÉNINGER RÉKA

Készítette: INHOF ÁRON
Biológia MSc

PÉCS, 2023

Tartalom

I. Bevezetés.....	3
I. 1 A rezisztencia kialakulása.....	3
I.2 A rezisztencia átadása	5
I.2.1 A plazmidok jelentősége.....	7
I.3 Rezisztens baktériumok a szennyvizekben.....	8
I.4 A béta-laktámok	8
I.5 A béta-laktám rezisztencia.....	9
II. Célkitűzés	10
III. Anyagok és módszerek	11
III.1 Mintavételezés.....	11
III.2 Antibiotikum érzékenység vizsgálata tesztkorong módszerrel.....	11
III.3 Plazmid DNS izolálása.....	12
III.4 TEM gén kimutatása PCR amplifikációval.	12
IV. Eredmények.....	14
IV.1 Antibiotikum érzékenység eredményei.....	14
IV.2 Multirezisztencia.....	16
IV.3 PCR amplifikáció eredményei	16
V. Eredmények értékelése	18
V. Összefoglalás	20
VI. Köszönetnyilvánítás	21
VII. Irodalomjegyzék.....	22
VIII. Ábrajegyzék	24

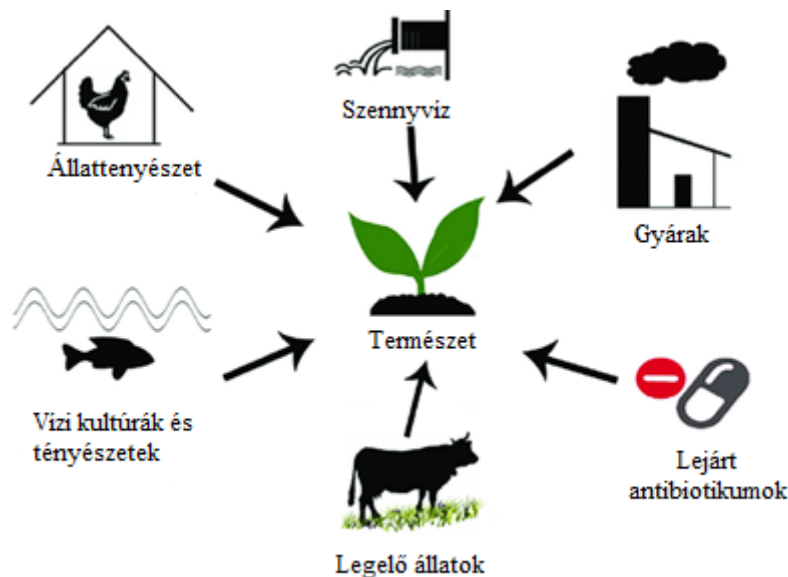
I. Bevezetés

Az antibiotikumok olyan kémiai anyagok melyek képesek meggátolni baktériumok növekedését, vagy egyenesen elpusztítják a mikroorganizmusokat, mindezt a fertőzés nagyságától függetlenül (S. B. Singh et al., 2017). Használatuk a 20. század óta egyre növekszik, jelenleg a bakteriális fertőzések elleni leggyakrabban használt gyógyszer csoport. Emberi felhasználás mellett az állatorvoslásban is rendkívül nagy mennyiségben alkalmazzák a különböző szereket. Azonban mindamellett, hogy ezek a szerek jócskán megnövelték az emberek átlagos várható élettartamát, használatuk komoly problémát von maga után, az antibiotikum rezisztens baktériumok megjelenésével. Érdekesség, hogy az 1970-es években sorra fedezték fel az új osztályait ezeknek az anyagoknak, mégis a 80-as évek óta teljesen új osztályt egyet sem fedeztek fel (WHO, 2014). Ez a negatív jelenség a gyógyszergyártók részéről többek között magyarázható azzal, hogy az előállításuk akár 10 évnél több időbe, és nem kevés pénzbe telik, a lehetséges előre nem látható mellékhatások okozta problémákról nem is beszélve. Mindezek hozzájárulnak ahhoz, hogy egyre kisebb a lelkesedés az antibiotikumok fejlesztése, újak felfedezése terén (Conly és Johnston, 2005). A rezisztencia kialakulásának szempontjából fontos tény az is, hogy ezeknek a szereknek a felhasználása (mind emberi, mind állati orvoslásban) nem különösebben van szabályozva és ellenőrizve (Khardori, 2006). Komoly probléma a gyógyszerek javasolt adagolásának figyelmen kívül hagyása, a felhasználatlan termékek nem megfelelő gyűjtése, kidobása, illetve, a szerek megelőző célzatú alkalmazása is, mely során egy egészséges állat kap gyógyszert, mert a fertőzés veszélye fent áll. Végül szintén problémát okoz az a jelenség, hogy a különböző antibiotikum kúrák a rezisztencia miatt egyre hatástalanabbak, ezt pedig még több antibiotikum beszedésével próbálják ellensúlyozni, mely még inkább segíti ezeknek a szereknek a természetbe való bejutását.

I. 1 A rezisztencia kialakulása

Az antibiotikum rezisztencia esetén fontos letisztázni, annak ellenére, hogy az emberi felhasználás erősen hozzájárul a probléma súlyosbodásához, nem az indította el a teljes folyamatot. A mikrobákban a rezisztenciára való képesség megjelenése természetes úton alakul ki (Dcosta et al., 2011). Azonban a folyamatos gyógyszer alkalmazás következtében, az evolúció tudományágából is ismert szelekciós nyomás hat a baktériumokra, azaz egy antibiotikumokkal teli környezetben a rezisztensek képesek növekedni és szaporodni. A kérdésre, hogy miért tudnak ezek a szerek felhasználás után a környezetbe kerülni, arra adja a választ, hogy az emberi és állati szervezetben a legtöbb antibiotikum csak részlegesen emésztődik, melynek következtében a természetbe kerülnek, akár az eredeti kémiai

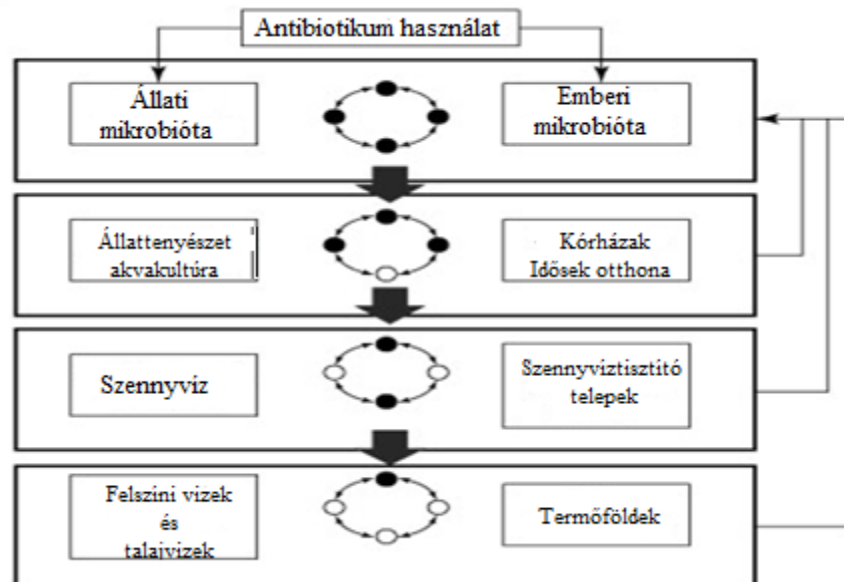
formájukban, akár átalakult bomlástermékek, úgynevezett metabolitokként (Winckler és Grafe, 2001). Miután a szervezetet elhagyták ezek az anyagok, többféle lehetséges esemény történhet. Először is az emberi felhasználás után a szennyvízbe kerülnek, ahonnan különböző okok miatt akár egyenesen a felszíni és talajvizekbe is belefolyhatnak (1. ábra). Mindemelett azt is fontos megemlíteni, hogy a jelenlegi szennyvízkezelési módszerek nem kifejezetten alkalmasak az antibiotikumok eltávolítására, ennek ellenére a szennyvíz a más természetű anyagok megtisztítása után különböző módon felhasználásra kerül (Carvalho & Santos, 2016). Az állati felhasználás után keletkező trágya alkalmazása a legjelentősebb az antibiotikum környezetbe való bejutásának szempontjából. A trágyázás következtében az antibiotikumok a talajba kerülnek, ahonnan szintén könnyedén bekerülhetnek a talajvízbe és felszíni vizekbe (Kemper, 2008). Ezen útvonalak mellett mindenképpen meg kell említeni a gyári előállítás, a nem felhasznált gyógyszerek kidobása és a vízi állatgazdálkodás esetében alkalmazott antibiotikumok környezetbe kerülését (Quaik et al., 2020).



1.ábra: Az antibiotikumok környezetbe való belépésének lehetséges útjai (Quaik et al., 2020).

Az antibiotikum rezisztencia a baktériumok azon képessége, amelynek segítségével képesek leküzdeni az ellenük felhasznált antibiotikumok hatásait. Ezen képesség kialakulhat a bakteriális kromoszóma mutációjával, vagy az antibiotikum rezisztencia gének (röviden ARG) meglétével és transzportjával (Coleman & Smith, 2014). A rezisztencia gének rekombinációjában, megváltozásában, baktériumok közötti átadásában nagy szerepe van az úgynevezett genetikai reaktoroknak, melyekben sok faj populációja és több generációi között van nagyméretű kapcsolat. Az antibiotikum rezisztencia kapcsán 4 ilyesfajta reaktort

érdeemes megemlíteni (2. ábra). A legfontosabb az emberi és az állati mikrobiom, ugyanis azt több mint 500 különböző baktérium alkotja. A második fajta reaktor esetében nagylétszámú állat vagy ember él, rövidebb vagy hosszabb ideig, viszonylag közel egymáshoz, így könnyedén átadhatnak egymásnak különböző baktériumokat. Ilyenek például a kórházak vagy a különböző állattenyésztetek. A harmadik reaktor főként az előző reaktorból visszamaradó anyagokból származik, például kórházak szennyvizéből. A negyedik reaktorban a természetes közegben lévő baktériumok lépnek kapcsolatba az előző reaktorokból származókkal, talaj és felszíni vizek vagy termőföldek területén. Könnyen belátható, hogy amennyiben sikeresen csökkenteni tudjuk a reaktorok közötti áramlásokat, a rezisztencia kialakulását is vissza lehet fogni (Baquero et al., 2008).

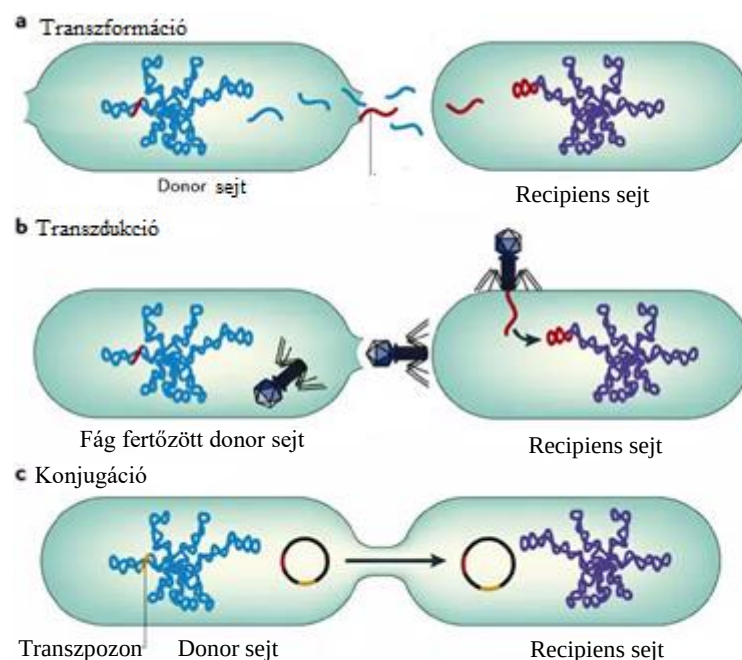


2.ábra: A négyfajta genetikai reaktor (a fehér pontok a környezet, a fekete pontok a mikrobiom baktériumai) (Baquero, 2008).

I.2 A rezisztencia átadása

Bár az antibiotikum felhasználás csökkentése hozzájárulhat ahhoz, hogy kevesebb rezisztens törzs alakuljon ki, mégsem teljes megoldása a problémának. Ennek oka a rezisztencia génekben keresendő, ugyanis ezek átadása két baktérium között gyakori folyamat, és ezután a rezisztenciára való képesség már a baktérium genomjában van (Salyers et al., 1997). Mindemelett említésre méltó jelenség az is, hogy nem csak a különböző antibiotikumok jelenléte tudja kiváltani a rezisztenciát. Úgynevezett stresszorok, például nehézfémek ellen kialakított rezisztencia kiválasztódásához kapcsolódhat az antibiotikum rezisztencia átadása is (Seiler & Berendonk, 2012). Ezeknek a szerekeknek különböző

természetű vizekben, vagy szennyvíztisztító telepeken való megjelenése előidézhetheti a szelekciós nyomást, vagyis csak azok a baktériumok lesznek képesek növekedni és osztódni, melyek rezisztensek (Segura et al., 2009). Ez abban az esetben jelentős, ha a koncentrációja a nehézfémeknek vagy antibiotikumoknak nem éri el a minimális gátló koncentrációt, vagyis azt a legkisebb mennyiséget, ami képes megakadályozni a baktériumok növekedését, ugyanis ekkor a baktériumok fejlődésére nem hatnak károsan, de a szelekciós nyomás megjelenik. Természetesen a véletlenszerű mutációk kialakulása, és átadása (vertikális géntranszfer) mellett, fontos a rezisztencia kialakulásával kapcsolatban a horizontális géntranszfer jelensége is. Háromfajta különböző útvonal lehetséges a HGT esetében (3. ábra). Az egyik a konjugáció, melynek során két baktérium között fizikai kapcsolat jön létre, és ebben az esetben a donor felől egyirányú géntranszfer történik. A másik lehetséges módszer a transzdukción, vagyis egy folyamat, ahol a transzfer egy bakteriofág fertőzés során történik meg azáltal, hogy a fág genomjába az egyik fertőzött sejt genomjának egy része beépül, és ezt továbbadja egy másik sejtnek. Az utolsó lehetséges útvonal a transzformáció, itt a környezetben lévő elhalt baktérium szabad DNS-ét veszi fel egy sejt (Soucy et al., 2015).



3.ábra: A horizontális géntranszfer típusai (Furuya és Lowy, 2006).

A horizontális géntranszfer mellett még egy érdekes jelenség az ugráló géneké, vagy transzpozonoké. Rövid DNS szakaszok képesek plazmidok között vagy a kromoszómákon más-más helyre ugrani és beépülni (Khardori, 2006). A fent említett folyamatokat felerősíti a tény, hogy a baktériumok vizes közegben képesek biofilmet létrehozni, amivel elősegítik

elsősorban a konjugáció, de alapvetően bármilyen horizontális géntranszfer létrejöttét. Az, hogy ez a folyamat a szennyvízben, illetve a szennyvíztisztítóknak történik azért probléma, mert az ezek után érintkező természetes vizekben lévő baktériumokkal történhet génátadás (Schlüter et al., 2007). A géntranszferek mennyiségét a külső környezet, illetve a baktériumban történő változások is befolyásolni tudják. Amennyiben egy bizonyos külső stressz éri a baktériumokat, például bizonyos antibiotikumok jelenléte, az egy SOS választ fog eredményezni, vagyis egy DNS javítási módszert. Amennyiben ez az SOS válasz bekövetkezik, a transzkripciós folyamatok megváltoznak a külső stressz kivédésének érdekében (Cirz et al., 2007). Emellett a baktérium környezetében lévő különböző tényezők, mint a pH vagy a hőmérséklet, a DNS átadásának lehetőségét befolyásolják, de az SOS mechanizmussal szemben nem váltanak ki változást a DNS szakaszokban.

I.2.1 A plazmidok jelentősége

A plazmidok olyan DNS molekulák melyek a kromoszómától függetlenül vannak, és replikálódnak. Főként olyan géneket kódoló szakaszokból állnak, melyek nem feltétlenül szükségesek az életben maradáshoz, de a megváltozó környezeti tényezőkhez jobb alkalmazkodást biztosítanak. Méretük változó, kilobázis és megabázis között mozoghat. Tisztázandó fogalom a plazmidok témakörében a különböző inkompatibilitási csoportoké, ezek olyan plazmidok csoportjai, melyek nem képesek egyszerre, ugyanazon a sejtben megenni és replikálódni. Az alapján, hogy tartalmazzak-e úgynevezett *tra* gént, csoportosíthatóak konjugatív és nem konjugatív módon, előbbi a gén megléte miatt képes átadódni a konjugáció során, utóbbi csak konjugatív plazmidok jelenlétében képes erre (Salyers et al., 1997). A konjugatív plazmidok működése az egyik legjobb módja a horizontális géntranszfernek, emiatt az egyik legjelentősebb tényezői is a rezisztencia kialakulásának (Smalla et al., 2006). A konjugatív plazmidok változó számú baktérium fajta között képesek cserélődni. Sok baktérium között képes átadódni a rezisztencia (R) plazmid. Az, hogy mitől függ a lehetséges gazdasejtek fajtáinak száma még nem tisztázott, feltehetőleg befolyásolja, hogy a befogadó sejt képes-e replikálni a plazmidot, illetve függ a felszíni receptorok meglététől a befogadó sejten (Bennett, 2008). A plazmidok továbbá képesek több rezisztens tulajdonság átadásra kapcsolt módon, vagyis például az antibiotikum rezisztencia és a réz, vagy bármilyen nehézfém elleni rezisztencia képességének transzferje egyszerre is megtörténhet (Fang et al., 2016). Mindezek mellett bizonyos plazmidok lehetővé teszik, hogy a gazdasejt képes legyen szénforrásként felhasználni a nehezen bontható kémiai anyagokat (Nawab et al., n.d.). Egy közismert

inkompatibilitási csoport az IncP-1 plazmidoké, melyek mellett, hogy konjugatív plazmidok, képesek nem konjugatív plazmidok irányítására, így taxonokon átívelő transzferükre. Rezisztenciára való képességet hordoznak a legtöbb antibiotikummal, különböző nehézfémekkel és káros anyagokkal szemben (Schlüter et al., 2007)

I.3 Rezisztens baktériumok a szennyvizekben

A modern szennyvíztisztító telepeken biológiai szennyvíztisztítást alkalmaznak, aminek során a vizet a különböző szerves szennyeződésektől biokémiai folyamatokkal tisztítják meg. Ehhez mikroorganizmusokat, baktériumokat használnak fel. Egyrésről ezek a folyamatok nem kifejezetten alkalmasak az antibiotikumok eltávolítására, másrésről a tisztítás utáni vízben bizonyos megváltozott szerkezetű anyagokká alakulnak, és ugyan csökkent mértékben, de van antibiotikus hatásuk (Buseti & Heitz, 2011). A vízben lévő antibiotikumok jelenléte képes kiváltani a rezisztenciát a tisztítási folyamatokban használt baktériumokban. Ezek a rezisztensé váló baktériumok képesek kifolyni az úgynevezett reaktorokból, így bekerülve a természetbe (Alighardashi et al., 2009). Még jelentősebb rezisztencia tapasztalható kórházi szennyvizekben, ahol az izolált baktériumok több mint fele hordozott rezisztencia plazmidot (Caplin et al., 2008). Bizonyos kutatások azt is kimutatják, hogy a nagyvárosok, és a nagyméretű lakónegyedek szennyvizéből izolált minták még legalább ugyanolyan jelentős, ha nem nagyobb mértékű rezisztenciát mutattak a kórházakéhoz képest (Li et al., 2015). Mindezek tudatában kijelenthető, hogy a szennyvíztisztító telepek, melyek nagyszámú és változatos baktériumok gyűjtőhelye egy tápanyagokkal és szerves anyagokkal gazdag környezetben, az antibiotikum rezisztencia melegágyát képezik (Pazda et al., 2019)

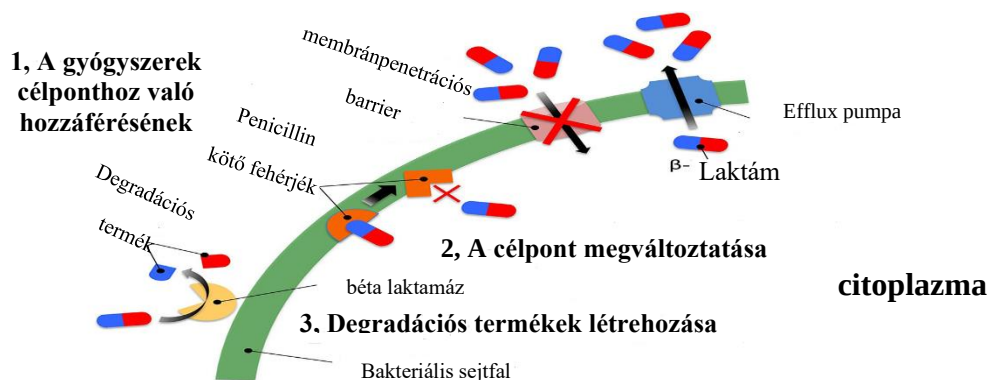
I.4 A béta-laktámok

A béta-laktámok az egyik legrégebbi csoportja az antibiotikumoknak. Mindegyik képviselőjükben közös, hogy egy β -laktám gyűrűt tartalmaznak. Ilyenek a chepalosporinok, monobaktámok, carbapenemek és a jól ismert penicillin és penicillin származékok (Dowling et al., 2017). Legfőbb hatásuk, hogy a baktériumok sejtfalszintézisét gátolják. A sejtfal merevségét, stabilitását peptid és glikán láncok kapcsolatai alakítják ki. A β -laktámok inhibitorai a penicillin kötő fehérjéknek (transzpeptidázoknak), melyek katalizátorai a transzpeptidációnak, a folyamatnak mely létrehozza a peptidoglikán keresztkötéseket. Azáltal, hogy a β -laktámok a penicillin kötő fehérjék kötőhelyeihez kapcsolódnak, megakadályozzák a folyamat végbemenetelét, ezzel a létrejövő sejtfal nem működik

tökéletesen, ami a sejt ozmotikus viszonyainak megváltozásához, végeredménybe líziséhez vezet.

1.5 A béta-laktám rezisztencia

A β -laktámok a leghasználtabb antibiotikumok, széles körű a felhasználásuk, mert sokféle fertőzésre nyújtanak gyógymódot, ezért az ellenük kialakuló rezisztencia kiváltképp fenyegető. Háromféleképpen lehetséges az ellenük való rezisztencia kialakulása. A béta-laktamáz enzim segítségével, a sejtmembránon való átjutásuk csökkentésével, vagy a penicillin kötő fehérjék (PBP) és a béta-laktámok közötti kötés megakadályozása. A PBPk megváltozása során, úgy változnak ezek a fehérjék, hogy β -laktámok ne legyenek képesek kapcsolódni hozzájuk. Főleg gram-pozitív baktériumoknál, mint a *Staphylococcus aureus*, vagy a *Streptococcus pneumoniae* esetében történik ilyen módú rezisztencia, gram negatívoknál igen ritka, de például *Neisseria* fajok esetében lehetséges. A gram-negatív baktériumok esetében a sejtmembrán mellett van egy extra membrán réteg, mely porin fehérje csatornákkal köti össze a 2 mátrixot. Amennyiben ezek a csatornák módosulnak, a béta-laktámok nem képesek bejutni a sejtbe. Ez a folyamat előidézhet rezisztenciát több fajta antibiotikummal szemben is. Az enzimatis útvonala esetében, az enzim felhasítja az amidkötéseket a β -laktám gyűrűben, ezzel az antibiotikum működését megakadályozza. Ezt az enzimet főként gram-negatív baktériumok használják, általában viszonylag alacsony mennyiséget termelve, génjeik (*bla*) plazmidokon és a kromoszómán is előfordulhatnak (Pitout et al., 1997). Ezeket az enzimeket általában 4 csoportra (A-D) osztják a fehérje szekvenciájuk alapján, egy 1991-ben készült besorolás után (Ambler et al., 1991). Ez a 3 lehetséges rezisztencia mód mellett az efflux pumpákat is meg kell említeni, melyek gram-negatív baktériumokban találhatóak, és működésük során különböző anyagokat juttatnak a sejten kívülre, éppen ezért szerepük van a multidrog rezisztencia kialakulásában (Hussain et al., 2021)



II. Célkitűzés

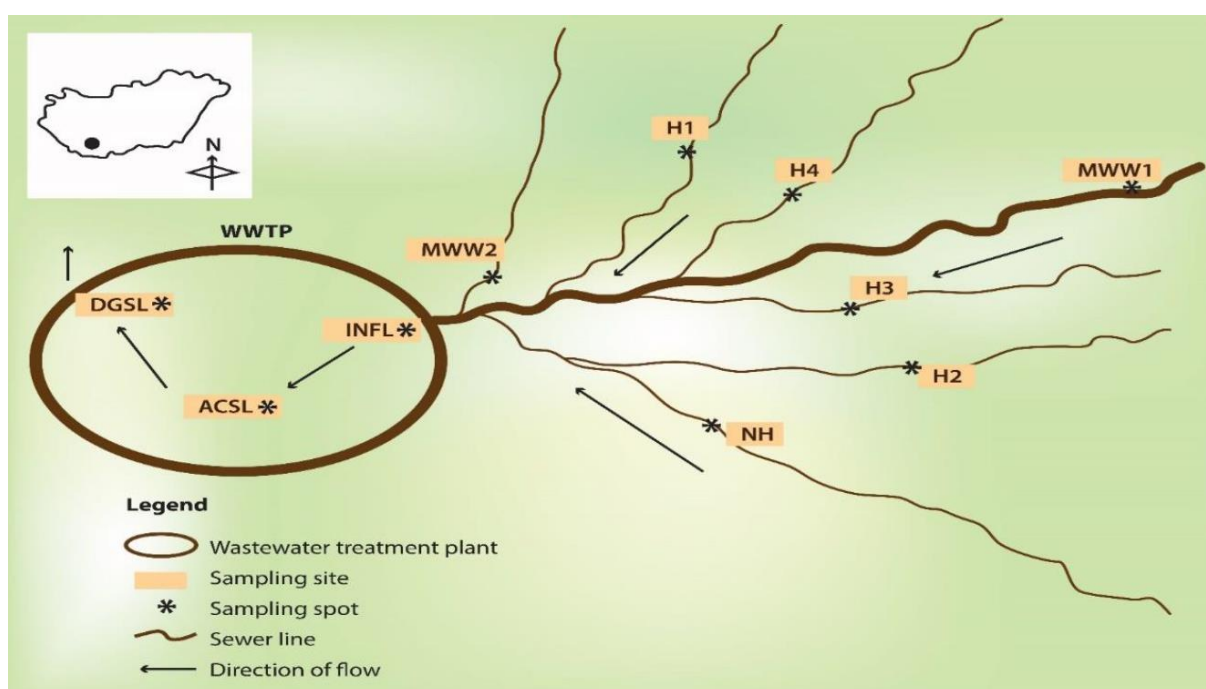
Az antibiotikum rezisztencia a modern orvoslás legnagyobb kihívása. A fordított arányosság miszerint növekszik a rezisztens baktériumok száma, de a gyógyszerfajták nem kerülnek piacra elég gyorsan, a túlnépesedő nagyvárosok által termelt szennyvíz okozta rezisztencia és az antibiotikumok növekvő, mégis meggondolatlan felhasználása mind azt eredményezi, hogy mindenképpen meg kell pontosan érteni a rezisztencia kialakulásának okait és módjait, lehetőleg a gének szintjén. Célunk, hogy izoláljuk és jellemezzük az Enterobacterales rendbe tartozó kiterjedt spektrumú β -laktamázokat (ESBL) termelő Gram-negatív opportunista kórokozókat a kórházi és városi szennyvizektől indulva a szennyvíztelep fermentációs tartályának a végtermékéig.

Ennek érdekében a vizsgálati helyszínekről mintát vettünk, antibiotikumot tartalmazó táptalajon szűrtük a mikrobákat, izoláltuk, antibiotikum tesztkorong módszerrel jellemeztük őket, PCR módszerrel plazmidokon megtalálható béta-laktamáz termelő *bla*TEM rezisztencia gén jelenlétét kimutattuk.

III. Anyagok és módszerek

III.1 Mintavételezés

A mintavételezés Pécs területén történt. Különböző kórházak (H1-H4), valamint a Baptista Szeretetszolgálat Szeretetotthona szennyvízgyűjtőjéből, lakossági szennyvízből (2 különböző mintavételezési ponton) és a Pécs Városi Szennyvíztisztító Telep befolyó szennyvizéből, oxigénos reaktorából, illetve a biogázreaktor fermentációs maradékából történt a mintavételezés. Általában 30 ml minta volt 15 percenként 4 óra hosszon keresztül vételezve a különböző mintavételi pontokról. Az oxigénos reaktorból és a fermentációs maradékából összesen egy-egy darab 500 ml-es minta vételezése történt. A minták a vizsgálatok elvégzéséig maximum 24 órán keresztül jégen voltak tárolva.



Ábra: Mintavételi helyek

H: kórházak; NH: Baptista Szeretetszolgálat Szeretetotthona; MWW: lakossági szennyvíz; INFL: befolyó szennyvíz; ACSL: oxigénos reaktor; DGSL: fermentációs maradék.

III.2 Antibiotikum érzékenység vizsgálata tesztkorong módszerrel

30 baktérium törzs (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*) vizsgálata történt. Először Müller-Hinton (250ml: 0,5g marhahús kivonat, 4,375g kazein, 0,375g keményítő, 4,25g agar) táptalajon történt a különböző törzsek egy napos tenyésztésének növesztése 35°C-on történő inkubálással. Ezután 5 ml fiziológiás sóoldatból (0,9%) és a törzsekből szuszpenziót készítettünk, majd 600 nm hullámhosszon mértük a szuszpenziók optikai denzitását (OD), 0,15 OD-re állítottuk be a sejtsűrűséget, eltérés esetén további baktériumokat vittünk a szuszpenzióba vagy hígítottuk azt. Az OD₆₀₀ 0,15 0,5

McFarland standard oldatnak felel meg. Ezek után Müller-Hinton táptalajra 50 µl szuszpenziót mértünk, és szélesztettük azt. 10 féle antibiotikum tartalmú korongot helyeztünk steril tű segítségével a táptalajokra a szuszpenzió szélesztése után. 7 fajta sejtfalszintézis gátló antibiotikum (ceftriaxone, ceftazidime, cefotaxime, cefpodoxime, cefoxitin, imipenem, meropenem) tartalmú korongot, illetve egy anyagsere gátló (sulfamethoxazole/trimethoprim), egy fehérjesszintézis gátló (gentamicin) és egy DNS giráz gátló (ciprofloxacin) antibiotikum korongot használtunk a vizsgálatok során. Ezek mellett egy cefotaxim-klavulánsav kombinált korongot is használtunk, a klavulánsav a béta-laktamáz enzim működését gátolja. Egy Petri-csészébe maximum 5db korongot helyeztünk el, így minden törzs esetében 3 Petri-csészében volt szükséges szélesztetni. A törzseket ezután ismét 24 óráig 35°C-on inkubáltuk, majd a gátlási zónák nagyságát azonosítottuk.

III.3 Plazmid DNS izolálása

A plazmid izolálás Monarch plasmid DNS miniprep kit használatával történt a gyártó előírásainak megfelelően. A DNS kivonása friss tenyészetekből történt melyek Luria Bertani tápoldatban voltak inkubálva 35°C-on 12-16 órát. Az izolált plazmid DNS tisztaságát, mennyiségét nanodrop spektrofotométerrel mértük meg, majd a termékeket fagyasztva, -20°C-on tároltuk.

III.4 TEM gén kimutatása PCR amplifikációval.

A PCR amplifikációhoz 25 mikroliter térfogatú oldatot mértünk össze, vagyis 1 µl DNS mintát, 1,25 µl forward és reverse primert és 12,5 µl 2x One Taq mastermixet, amely One Taq polimeráz enzimet, 2x One Taq standard puffert, 4 mM MgCl₂-t, dATP-t, dGTP-t, dCPT-t és dTTP-t tartalmaz. Végül 9 µl nukleázmentes vízzel egészítettük ki 25 µl-re a végtérfogatot. Az összemért oldatot röviden 10 másodpercig centrifugáltuk. Az összemért oldatokat hagyományos PCR technikával vizsgáltuk, 30 mp hosszúságú 94°C-on történő korai denaturációval kezdve, melyet egy 30 mp-es 94°C-os denaturációs ciklus követett, ezek után egy 56°C-os annealing fázis, ami szintén 30 mp-ig tartott, majd egy perces 68°C-os extenziós fázis következett. A ciklusok 35X ismétlődtek, majd egy 68°C-on végzett 4 perces végső elongációs szakasz következett, ami után a termékek 4°C-on voltak tartva. A PCR után 1% agaróz gélen végzett gél elektroforézis következett. A gélhez 2 µl SERVA DNA Stain G festéket adtunk. A PCR termékeket 2 µl futtatási festékkel kevertük, majd az egyes zsebekbe a festett termékekből 10 µl mennyiséget mértünk be. A futtatás során minden esetben alkalmaztunk egy kontroll *E.coli* törzset, mely tartalmazta a vizsgált TEM gént, ezenkívül markerként 10 µl EcoRI/HindIII által emésztett lamda fág DNS-t, illetve alacsony

tartományú molekulaszúlyú genetikai markert használtunk. A futtatás 1X Tris-EDTA pufferben történt 100V feszültségen 55 percen keresztül történt. A puffer elkészítéséhez először egy 0,5 M pH 8,0-as EDTA oldatot készítettünk (500ml). Ebből 20 ml mennyiséget 11,89 ml 96%-os ecetsavval és 48,4 g Trisel összekevertük, kiegészítve desztillált vízzel 400 ml végtérfogatra, így 25X Tris EDTA puffert kaptunk. Ebből 40 ml térfogatot 1000 ml térfogatra kiegészítve kaptuk meg a futtatáshoz szükséges 1X TAE puffert. A gél elektroforézis után a gélt UV fény segítségével világítottuk meg és vizsgáltuk.

1.táblázat: a TEM primerek szekvenciái, a várható termék mérete, és az annealing fázis hőmérséklete.

gén neve	forward primer szekvencia (5'-3')	reverse primer szekvencia (5'-3')	termék mérete (bp)	Annealing hőmérséklet (°C)
<i>bla</i> TEM	GCGGAACCCCCTATTG	ACCATTGCTTAATCAGTGAG	963	56

IV. Eredmények

IV.1 Antibiotikum érzékenység eredményei

A szennyvíz és szennyvíztelepi mintákból izolált és azonosított törzsekkel elvégeztük az antibiotikum érzékenységi vizsgálatokat korong diffúziós módszerrel. Az 1 napig inkubált korongokkal ellátott törzseken megfigyelhető gátlási zónákat lemértük és az EUCAST protokolljai alapján azok nagysága alapján meghatároztuk, hogy szenzitív vagy rezisztens a törzs az adott antibiotikummal szemben (a gátlási zónák mérete milliméterben értelmezendő). A klavulánsavval kombinált korong gátlási zónájának és a "sima" antibiotikum (cefotaxime) zónájának különbsége ha meghaladja az 5 mm nagyságot, abban az esetben azt lehet elmondani, hogy a klavulánsav okozza a különbséget, tehát a baktérium törzs enzimtermeléssel védekezett az antibiotikum ellen. Az egyes mintavételi helyekről származó törzsek esetében mért gátlási zóna mértéket és az ezek alapján meghatározott rezisztenciákat a 2. 3. és 4. táblázatok foglalják magukba.

2.táblázat: A Janus P. Kórházi Tömb (H1) mintavételi helyről származó törzsek rezisztenciái egyes antibiotikumokkal szemben. S: szenzitív **R: Rezisztens** EC: *E. coli* KP/KPUH: *K.pneumoniae* KO: *K.oxytoca* CRO: ceftriaxone CAZ: ceftazidime CTX: cefotaxime CPD: cefpodoxime FOX: cefoxitin MEM: meropenem IPM: imipenem SXT: sulfamethoxazole/trimethoprim GN: gentamicin CIP: ciprofloxacin CTC40: cefotaxime+klavulánsav

H1												
Törzsek	CRO	CAZ	CTX	CPD	FOX	MEM	IMP	SXT	GN	CIP	CTC40	CTC40- CTX
EC70	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	22	>5
EC71	R	R	R	R	S	S	S	n.a.	S	R	18	>5
EC72	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	22	>5
EC73	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	24	>5
EC74	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	25	>5
EC75	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	21	>5
KP2	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	23	>5
KPUH1	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	24	>5
KPUH2	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	18	>5
KPUH6	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	19	>5
KPUH7	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	22	>5
KO97	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	23	>5

3.táblázat: A Megyei Kórház (H4) mintavételi helyről származó törzsek rezisztenciái egyes antibiotikumokkal szemben. S: szenzitív **R: Rezisztens** EC: *E. coli* KP: *K.pneumoniae* KO: *K.oxytoca* CRO: ceftriaxone CAZ: ceftazidime CTX: cefotaxime CPD: cefpodoxime FOX: cefoxitin MEM: meropenem IPM: imipenem SXT: sulfamethoxazole/trimethoprim GN: gentamicin CIP: ciprofloxacin CTC40: cefotaxime+klavulánsav

H4												
Törzsek	CRO	CAZ	CTX	CPD	FOX	MEM	IMP	SXT	GN	CIP	CTC40	CTC40-CTX
EC4	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	23	>5
EC66	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	29	>5
EC67	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	26	>5
EC68	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	24	>5
EC69	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	26	>5
KP55	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	19	>5
KP56	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	15	>5
KP57	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	20	>5
KP79	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	23	>5
KP76	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	24	>5
KO63	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	21	>5
KO53	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	28	>5
KO54	R	S	R	R	S	S	R	S	R	R	27	>5

4.táblázat: A városi szennyvízből (CWW) származó törzsek rezisztenciái egyes antibiotikumokkal szemben. S: szenzitív **R: Rezisztens** EC: *E. coli* CRO: ceftriaxone CAZ: ceftazidime CTX: cefotaxime CPD: cefpodoxime FOX: cefoxitin MEM: meropenem IPM: imipenem SXT: sulfamethoxazole/trimethoprim GN: gentamicin CIP: ciprofloxacin CTC40: cefotaxime+klavulánsav

CWW												
Törzsek	CRO	CAZ	CTX	CPD	FOX	MEM	IMP	SXT	GN	CIP	CTC40	CTC40-CTX
EC1	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	24	>5
EC2	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	25	>5
EC3	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	18	>5
EC04	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	20	>5
EC7	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	28	>5

A vizsgálatok során mind a 30 törzs rezisztenciát mutatott ceftriaxone, cefotaxime és cefpodoxime antibiotikumokkal szemben, és 2 törzs kivételével mindegyik rezisztens volt ceftazidimre. Cefoxitinnal szemben *E. coli*, *K. pneumoniae* és *K. oxytoca* törzsek közül is csak 1-1 törzs mutatott rezisztenciát. Meropenem esetében mindösszesen 1 *Klebsiella pneumoniae* volt rezisztens. Az imipenem esetében 10 *K. pneumoniae* törzsből 2 volt rezisztens, a 4 *K. oxytoca* törzsből 1, *E. coli*-ból egy sem. Nem sejtfalszintézis gátló antibiotikumokkal szemben változó rezisztencia arányok voltak megfigyelhetőek.

Sulfamethoxazole/trimethoprim rezisztencia a 16 *E. coli* törzsből 10-nél volt tapasztalható, *Klebsiella pneumoniae* törzsek 20% volt rezisztens, míg az *K. oxytoca*-nál nem voltak rezisztens törzsek. *E. coli* törzsek nagyjából 19%-a, *Klebsiella* törzsek 50% és 100%-a mutatott rezisztenciát gentamicinnel szemben. Ciprofloxacin esetében az *E. coli* törzsek 69%-a, a *K. pneumoniae* törzsek 90%-a és a *K. oxytoca* törzsek 75%-a volt rezisztens. A klavulánsavval kombinált korong gátlási zónájának nagysága minden esetben 5mm-rel vagy többel nagyobb volt, mint a sima cefotaxime korongé, tehát béta laktamáz enzim termelése feltételezhető.

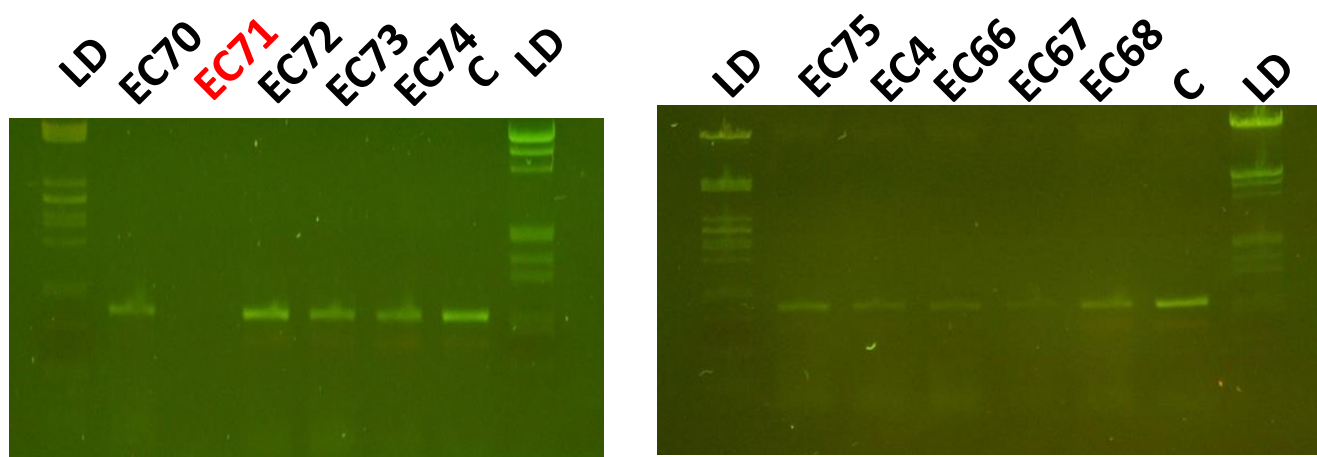
IV.2 Multirezisztencia

A multirezisztencia esetében egy törzs 3 vagy több antibiotikum osztállyal szemben volt rezisztens. *E. coli* esetében 10/16 törzs 3 osztállyal szemben is rezisztens volt, ráadásul ezek a törzsek közül az egyik 4 különböző osztályba tartozó antibiotikummal szemben mutatott rezisztenciát. *K. pneumoniae* törzsek 60 % volt rezisztens 3 antibiotikum osztállyal szemben, melyek közül az egyik 4 osztályra is rezisztens volt. *K. oxytoca* törzsek közül 3 volt multirezisztens.

IV.3 PCR amplifikáció eredményei

A plazmidminták elkészítése után elvégeztük a törzsekben a TEM gén jelenlétének az igazolását.

A termék mérete: 963 bp. Rövidítések: EC- *Escherichia coli*; LD- EcoRi/Hind111 molekula súly marker; C- kontrol



	<i>E. coli</i> törzsek															
	EC7 0	EC7 1	EC7 2	EC7 3	EC7 4	EC7 5	EC 4	EC6 6	EC6 7	EC6 8	EC6 9	EC 1	EC 2	EC 3	ECO 4	EC 7
TEM gén	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	<i>K.pneumoniae</i> törzsek															
	KP 2	KPUH 1	KPUH 2	KPUH 3	KPUH 4	KPUH 5	KPUH 6	KPUH 7	KP5 5	KP5 6	KP5 7	KP7 9	KP7 6			
TEM gén	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+			
			<i>K.oxytoca</i> törzsek													
			KO97	KO63	KO53	KO54										
TEM gén			-	-	+	+										

5. táblázat: A *bla*TEM PCR termékek megléte a 30 vizsgált törzs esetében. +: jelen volt a gén -: **nem volt jelen a gén** EC: *E. coli* KP/KPUH: *K. pneumoniae* KO: *K. oxytoca*

Az UV megvilágított gélen látszódó PCR termékek a *bla*TEM gének. *E. coli* törzsek 81% (13/16), *K. pneumoniae* törzsek 90% (9/10) és a *K. oxytoca* törzsek fele (2/4) hordozta a béta laktamáz enzimet kódoló TEM gént. A termékek mérete nagyjából 963bp nagyságú. A kontrol mind az 5 elvégzett futtatás esetében sikeres amplifikációról tett tanúbizonyságot, futtatás után megfigyelhető volt benne a TEM gén.

V. Eredmények értékelése

Az antibiotikumok hatásának megismerése 20. század egyik legnagyobb jelentőségű felfedezése volt. Azonban ezeknek a szereknek a tömeges és helytelen felhasználása a baktériumokban egyre inkább növekvő rezisztencia kialakítását eredményezte, melyet a különböző szennyvíz elvezetési, tisztítási és felhasználási folyamatai csak felerősítettek. A kutatásom célja az volt, hogy a kórházakból kifolyó szennyvizekből izolált baktérium minták segítségével értelmezni lehessen a mesterséges vízfolyásokban található antibiotikumok és a rezisztens baktériumok kialakulásának kapcsolatát. A kísérlet során nagymértékű antibiotikum elleni rezisztencia volt tapasztalható mindegyik törzsben. Az *Escherichia coli* esetében a legtöbb törzs rezisztens volt sejtfalszintézis gátló antibiotikumok egy részére, de nem volt gyakori a rezisztencia imipenemel, meropenemel és cefoxitinnel szemben, ez a három szer ugyanis effektívebb ESBL termelő baktériumok ellen, ami a magas szenzitivitás értékekből jól látszik. Egyéb nem sejtfalszintézis gátló antibiotikumokkal szemben változó volt az egyes törzsek esetében a rezisztencia. Megfigyelhető volt multirezisztencia a törzsek több mint 60%-ban. Klavulánsavval kombinált cefotaxime korong minden esetben béta-laktamáz enzim termelésre utalt. A vizsgált 16 *E. coli* törzsből PCR amplifikációval 13-ban kimutatható volt a *bla*Tem gén. Ez egy igen gyakori gram-negatív baktérium fajta, mely az *Enterobacteriaceae* családba tartozik. Az emberi tápcsatornában jelentős számban találhatóak, a bélflóra egyensúlyának fenttartásában fontos szerepük van. Mindemellett természetesen léteznek patogén törzseik, melyeket gyakran izolálnak és azonosítanak be kórházi vizsgálatok során, főleg az emésztőrendszerben okoznak fertőzéseket, kezelésükre főként béta-laktámokat alkalmaznak. Az eredmények jól mutatják, hogy különböző helyről származó szennyvíz mintákból, erősen rezisztens, több osztályba tartozó, akár 7 fajta antibiotikummal szemben is ellenálló *E. coli* törzsek voltak izolálhatóak, melyek nagy része hordozta az általunk vizsgált TEM gént. Jól látható, hogy nagymennyiségű rezisztens törzs található a szennyvízben, illetve látható más országokban vizsgált kórházi szennyvízben leírt megfigyelések alapján, hogy a jelenség globális mivoltú. Egy 2010-ben íródott lengyel tanulmány szintén nagyfokú rezisztenciát tapasztalt kórházi szennyvízből izolált *E. coli* esetében, és megfigyelhető volt a nagyfokú rezisztencia a gyakran használt sejtfalszintézis gátló béta-laktámokkal szemben is (Łuczkiewicz et al., 2010).

A *Klebsiella* nemzetség tagjai szintén gram-negatív baktériumok, a *Enterobacteriaceae* családba tartoznak. Tesztkorong módszer során, sejtfalszintézis gátló

szerekkel szemben hasonló rezisztenciát mutattak az *E. coli*-val, nem sejtfalszintézis gátló antibiotikumok esetében magasabb arányú rezisztencia figyelhető meg gentamicinnel szemben, és némileg nagyobb arányú érzékenység sulfamethoxazole/trimethoprimmel szemben, az eredmények alapján. A törzsek nagyrésze mind a *K. pneumoniae* és a *K. oxytoca* esetében mutat multirezisztenciát, és β -laktamáz enzim termelést. A *K. pneumoniae* törzsek 90%-ban, *K. oxytoca* törzsek pedig 50%-ban hordozták a TEM gént. A *K. pneumoniae* gyakori baktérium az emberi szervezetben is, alapvetően nem patogén, de beteg szervezetek esetében könnyen okozhatnak fertőzéseket. A legtöbb antibiotikummal szemben természetes rezisztenciával rendelkezik, így nem meglepő, hogy az egyik leggyakrabban használt gyógyszer elleni TEM rezisztencia gént ilyen nagy mennyiségben sikerült megtalálni a különböző törzsekben. Széles körben okozhatnak kellemetlen, esetenként halálos fertőzéseket is. *Klebsiella oxytoca* a nemzetségének előző képviselőjéhez hasonlóan az emberi bélflóra gyakori baktériuma, de a szervezetben máshol könnyen komoly fertőzéseket okozhat. Az *E. coli* törzsekhez képest nem tapasztaltunk kifejezett eltéréseket az egyes fajta sejtfalszintézis gátló antibiotikumok alkalmazása során. A nemzetségen belül vizsgált törzsekről szintén elmondható az, ami az *E. coli*-nál, vagyis hogy a világ minden táján, kórházi struktúráltságtól, szennyvíz tisztítástól és elvezetéstől függetlenül nagymértékű rezisztencia figyelhető meg. Portugáliában található kórházakból izoláltak *K. pneumoniae* törzseket, és vizsgálták a rezisztenciájukat különböző antibiotikumokkal szemben, és végeredményben kiugróan magas arányokat tapasztaltak több típusú antibiotikummal szembeni rezisztenciák esetében, így a béta-laktámoknál is (Caneiras et al., 2019). Egy 2019-ben íródott Dél-Afrikai kutatásban szintén nagymértékű rezisztenciát figyeltek meg kórházi szennyvizekből izolált *Klebsiella* fajták esetén (King et al., 2020).

Összeségében tehát kijelenthető, hogy a kórházból kifolyó vizek magas antibiotikum tartalma hozzájárul a rezisztencia kialakulásához, mely a következővel magyarázható. A szervezetbe bevitt antibiotikumok megemésztése nem tökéletes, ezek módosult metabolitok vagy az eredeti termék formájában a kiválasztó és emésztő folyamatok végén a szennyvízrendszerbe kerülnek (Winckler és Grafe, 2001). A szennyvíztelepeken a víz tisztítására használt mikroorganizmusok találkoznak ezekkel a szerekkel, és abban az esetben, ha a különböző gyógyszerek vagy káros anyagok mennyisége a minimális gátló koncentráció alatt van, a szelekciós nyomás következtében elszaporodhatnak az antibiotikum rezisztens baktériumok, vagy a káros anyagokkal szemben kialakított rezisztencia, melyekhez kapcsolódhat az antibiotikumok elleni védelem képessége is (Fang

et al., 2016). Ezt a szennyvíztelepeken vizes közegben kialakuló biofilmekben lejátszódó horizontális géntranszfer folyamatok felerősítik. A legfontosabb géntranszfer a konjugáció, melynek során rezisztencia vagy más tulajdonságot hordozó plazmidok adódnak át. A kísérletek során ilyen plazmidokon lévő gén, a TEM gén meglétét vizsgáltuk, és ez a konjugáció adhatja a választ arra, hogy miért alakult ki ilyen nagy százalékban rezisztencia az egyes fajok esetén (Schlüter et al., 2007). Ezeknek a rezisztencia plazmidoknak a transzferje nem csak biofilmekben történhet meg, a tisztító telepekről kifolyó víz találkozhat természetes vizekkel, amennyiben sejtek között kialakul a fizikai kapcsolat, így a természetes vizekben is elszaporodhatnak a rezisztens baktériumok, illetve akár emberek között is megtörténhet rezisztens baktériumok átadása, ezzel az emberi szervezetben is ellenálló sejteket eredményezve, megnehezítve így a fertőzések esetén a kezelések hatékonyságát. Emellett még több rezisztens baktériumot juttatnak az emberek a természetbe, éppen ez is magyarázhatja a magas rezisztencia arányokat a vizsgálat során, hiszen a kórházban, tekintettel az ellátott személyek számára és a limitált helyre, könnyedén lezajlódhat az egymás közötti baktérium csere, és a kifolyó vizekben talált ellenálló törzsek száma ezt igazolja is (Quaik et al., 2019). Mindezek alapján azt lehet elmondani, hogy a legfontosabb intézkedés a rezisztencia megállítása ellen a horizontális géntranszferek megakadályozása, illetve az eredményes antibiotikum eltávolítás a szennyvizekből. Szintén fontos lenne az antibiotikumok megfelelő felhasználása, hiszen könnyű észrevenni azt az ördögi kört, amit ennek az ellenkezője okoz. A kialakult rezisztencia miatt az antibiotikum kezelések már nem elég effektívek, ami több gyógyszer használatát eredményezi, ez több ellenálló törzset, ami még több fertőzést és eredménytelen kezelést okoz (Conly és Johnston, 2005).

V. Összefoglalás

A vizsgálataink során célunk a szennyvizekből izolálható baktériumok rezisztenciájának vizsgálata és az esetleges ESBL termelő TEM gén kimutatása volt. Eredményeink kimutattak számos antibiotikummal szembeni rezisztenciát, illetve a vizsgált törzsek nagyrésztében ki tudtuk mutatni a plazmidokon elhelyezkedő *bla*TEM rezisztencia gént

VI. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Fekete Csaba tanszékvezetőnek a labor biztosítását a kísérletek elvégzéséhez.

Szeretném megköszönni a vizsgálat során nyújtott rengeteg segítséget témavezetőimnek, Dr. Gazdag Zoltánnak, és Héninger Rékának, továbbá Christopher Mutukunak és a PTE TTK Biológia Intézet Általános és Környezeti Mikrobiológia Tanszék munkatársainak hozzájárulását a munkám sikeréhez.

Köszönöm a minták gyűjtését Christopher Mutukunak és Dr. Gazdag Zoltánnak.

Köszönöm az általam vizsgált törzsek izolálását szintén Christopher Mutukunak, valamint Héninger Rékának. Köszönöm az izolált törzsek azonosítását a PTE ÁOK Mikrobiológiai Intézet munkatársainak, Dr. Kovács Krisztinának, Dr. Melegh Szilviának és Dr. Pál-Sonnevend Ágnesnek.

VII. Irodalomjegyzék.

- Alighardashi, A., Pandolfi, D., Potier, O., & Pons, M. N. (2009). Acute sensitivity of activated sludge bacteria to erythromycin. *Journal of Hazardous Materials*, 172(2–3), 685–692.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.051>
- Ambler, R. P., Coulson, A. F., Frère, J. M., Ghuysen, J. M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R. C., Tiraby, G., & Waley, S. G. (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *The Biochemical journal*, 276 (Pt 1)(Pt 1), 269–270.
<https://doi.org/10.1042/bj2760269>
- Baquero, F., Martínez, J.-L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260–265.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria: Plasmid-encoded antibiotic resistance. *British Journal of Pharmacology*, 153(S1), S347–S357.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607>
- Busetti, F., & Heitz, A. (2011). Determination of human and veterinary antibiotics in indirect potable reuse systems. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 91(10), 989–1012.
<https://doi.org/10.1080/03067310903582374>
- Caneiras, C., Lito, L., Melo-Cristino, J., & Duarte, A. (2019). Community- and Hospital-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Urinary Tract Infections in Portugal: Virulence and Antibiotic Resistance. *Microorganisms*, 7(5), 138.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7050138>
- Caplin, J. L., Hanlon, G. W., & Taylor, H. D. (2008). Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England. *Environmental Microbiology*, 10(4), 885–892.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01507.x>
- Carvalho, I. T., & Santos, L. (2016). Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International*, 94, 736–757.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>
- Cirz, R. T., Jones, M. B., Gingles, N. A., Minogue, T. D., Jarrahi, B., Peterson, S. N., & Romesberg, F. E. (2007). Complete and SOS-Mediated Response of *Staphylococcus aureus* to the Antibiotic Ciprofloxacin. *Journal of Bacteriology*, 189(2), 531–539.
<https://doi.org/10.1128/JB.01464-06>
- Coleman, J. P., & Smith, C. J. (2014). Microbial Resistance☆. In *Reference Module in Biomedical Sciences* (o. B9780128012383052000). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05148-5>
- Conly, J., & Johnston, B. (2005). Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 16(3), 159–160.
<https://doi.org/10.1155/2005/892058>
- D’Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365), 457–461.

- <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- Dowling, A., O'Dwyer, J., & Adley, C. (2017). Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs*, 1, 536-545.
- Fang, L., Li, X., Li, L., Li, S., Liao, X., Sun, J., & Liu, Y. (2016). Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals. *Scientific Reports*, 6(1), 2531
<https://doi.org/10.1038/srep25312>
- Hussain, H. I., Aqib, A. I., Seleem, M. N., Shabbir, M. A., Hao, H., Iqbal, Z., Kulyar, M. F.-A., Zaheer, T., & Li, K. (2021). Genetic basis of molecular mechanisms in β -lactam resistant gram-negative bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 158, 105040.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105040>
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002>
- Khardori, N. (2006). Antibiotics—Past, Present, and Future. *Medical Clinics of North America*, 90(6), 1049–1076.
<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2006.06.007>
- King, T. L. B., Schmidt, S., & Essack, S. Y. (2020). Antibiotic resistant *Klebsiella* spp. From a hospital, hospital effluents and wastewater treatment plants in the uMgungundlovu District, KwaZulu-Natal, South Africa. *Science of The Total Environment*, 712, 135550.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135550>
- Li, J., Cheng, W., Xu, L., Strong, P. J., & Chen, H. (2015). Antibiotic-resistant genes and antibiotic-resistant bacteria in the effluent of urban residential areas, hospitals, and a municipal wastewater treatment plant system. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4587–4596.
<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3665-2>
- Łuczkiwicz, A., Jankowska, K., Fudala-Książek, S., & Olańczuk-Neyman, K. (2010). Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. *Water Research*, 44(17), 5089–5097.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.007>
- Nawab, A., Aleem, A., & Malik, A. (2003). Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to gamma-HCH degradation by *Pseudomonas* strains. *Bioresource technology*, 88(1), 41–46.
[https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(02\)00263-8](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(02)00263-8)
- Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., & Mulkiewicz, E. (2019). Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Science of The Total Environment*, 697, 134023.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>
- Pitout, J. D., Sanders, C. C., & Sanders, W. E., Jr (1997). Antimicrobial resistance with focus on beta-lactam resistance in gram-negative bacilli. *The American journal of medicine*, 103(1), 51–59.
[https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(97\)00044-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(97)00044-2)
- Quaik, S., Embrandiri, A., Ravindran, B., Hossain, K., Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., Ignacimuthu, S., & Ismail, N. (2020). Veterinary antibiotics in animal manure and manure laden soil: Scenario and challenges in Asian countries. *Journal of King Saud University - Science*, 32(2), 1300–1305.
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.11.015>
- Salyers, A. A., & Amábile-Cuevas, C. F. (1997). Why are antibiotic resistance genes so

- resistant to elimination? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(11), 2321–2325. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.11.2321>
- Schlüter, A., Szczepanowski, R., Pühler, A., & Top, E. M. (2007). Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 449–477. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00074.x>
- Segura, P. A., François, M., Gagnon, C., & Sauvé, S. (2009). Review of the Occurrence of Anti-infectives in Contaminated Wastewaters and Natural and Drinking Waters. *Environmental Health Perspectives*, 117(5), 675–684. <https://doi.org/10.1289/ehp.11776>
- Seiler, C., & Berendonk, T. U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00399>
- Sharma, P. C., Jain, A., & Jain, S. (2009). Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta poloniae pharmaceutica*, 66(6), 587–604.
- Singh, S. B., Young, K., & Silver, L. L. (2017). What is an “ideal” antibiotic? Discovery challenges and path forward. *Biochemical Pharmacology*, 133, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.01.003>
- Smalla, K., Haines, A. S., Jones, K., Krögerrecklenfort, E., Heuer, H., Schlöter, M., & Thomas, C. M. (2006). Increased Abundance of IncP-1 β Plasmids and Mercury Resistance Genes in Mercury-Polluted River Sediments: First Discovery of IncP-1 β Plasmids with a Complex *mer* Transposon as the Sole Accessory Element. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7253–7259. <https://doi.org/10.1128/AEM.00922-06>
- Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: Building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(8), 472–482. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>
- Winckler, C., & Grafe, A. (2001). Use of veterinary drugs in intensive animal production: Evidence for persistence of tetracycline in pig slurry. *Journal of Soils and Sediments*, 1(2), 66–70. <https://doi.org/10.1007/BF02987711>
- World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. *World Health Organization*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>

VIII. Ábrajegyzék

- Baquero, F., Martínez, J.-L., & Cantón, R. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>
- Furuya, E. Y., & Lowy, F. D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology*, 4(1), 36–45. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1325>
- Gao, M., Glenn, A. E., Blacutt, A. A., & Gold, S. E. (2017). Fungal Lactamases: Their Occurrence and Function. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01775>

Quaik, S., Embrandiri, A., Ravindran, B., Hossain, K., Al-Dhabi, N. A., Arasu, M. V., Ignacimuthu, S., & Ismail, N. (2020). Veterinary antibiotics in animal manure and manure laden soil: Scenario and challenges in Asian countries. *Journal of King Saud University - Science*, 32(2), 1300–1305.
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.11.015>