

Egy egészség – a 21. század problémája az antimikrobiális rezisztencia: Van kiút?

Kerek Ádám^{1*} , Nagy Zoltán², Jerzsele Ákos¹ 

¹Állatorvostudományi Egyetem, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék, Budapest, Magyarország

²CEVA-Phlyaxia Zrt., Innovációs és Kutatás-fejlesztési Igazgatóság, Budapest, Magyarország

*Levelező szerző: kerek.adam@univet.hu

Béérkezett: 2022. augusztus 31.; Elfogadva: 2023. január 11.; Online megjelent: 2023. március 8.

Összefoglalás

Napjaink kiemelkedő állat- és közegészségügyi problémája az antimikrobiális rezisztencia (AMR) kérdésköre. Az AMR terjedése szempontjából az egyik legnagyobb jelentőségű az *Escherichia coli* baktérium, amelynek plazmidon kódolt rezisztenciagénjei lehetőséget adnak a horizontális génátvitelre. A szerzők célul tűzték ki, hogy az AMR kevésbé vizsgált területeit térképezik fel. Egyrészt vakcinafejlesztés modellezéséhez kiválasztott törzseket, másrészt probiotikumkészítményeket vizsgáltak új generációs szekvenálással. Számos mobilis genetikai elemet, plazmidon és fágon kódolt gént sikerült azonosítani. Az eredmények rávilágítanak arra, hogy új vakcinák, valamint probiotikumok fejlesztéséhez érdemes a kiválasztott baktériumtörzsek rezisztenciagén szűrését elvégezni.

Kulcsszavak: antimikrobiális rezisztencia, ARG, *Escherichia coli*, probiotikumok, szekvenálás

One health - antimicrobial resistance is the problem of the 21st century: is there a way out?

Ádám Kerek¹, Zoltán Nagy², Ákos Jerzsele¹

¹Department of Pharmacology and Toxicology, University of Veterinary Medicine, Budapest, Hungary

²Innovation and Research and Development Directorate, CEVA-Phlyaxia Zrt., Budapest, Hungary

Summary

The spread of antimicrobial resistance (AMR) is a major public and animal health problem of our days, with the most conservative estimates suggesting that it could become the leading cause of death worldwide by 2050. The role of *Escherichia coli* is significant, as in many cases it creates the potential for horizontal gene transfer through antimicrobial resistance genes encoded as mobile genetic elements on plasmids. Authors have set out to map two less researched areas of potential involvement in the spread of antimicrobial resistance. One area is the investigation of potential vaccine candidate *Escherichia coli* isolates using next-generation sequencing (NGS). The other area is the investigation of commercialized probiotic products for farm and companion animals with NGS. Our results suggest that vaccine candidate strains may carry several mobile genetic elements encoded on plasmids or phages. Among these, there are genes clearly of public health importance (*TEM-1*, *ampC*, *qnrS1*, *ugd*) that may be responsible for the development of resistance to antibiotics classified as category B (3rd to 4th generation cephalosporins, fluoroquinolones, colistin) by the AMEG (AntiMicrobial Expert Group); the presence of these genes as mobile genetic elements is of particular concern. The *ampC* gene is a gene responsible for beta-lactamase overproduction, whereas *TEM-1* is an ESBL gene (extended spectrum beta lactamase), which has a significant role in public health mainly in nosocomial or multiresistant infections. In the case of probiotic products, those intended for farm animals are much better regulated, thereby mobile genetic elements were not found in our study. However, preparations intended for companion animals are not regulated at all, and we found resistance genes against aminoglycosides (*APH(3')-Ia*) and tetracyclines (*tetS*) that might have public health significance as these were encoded on mobile genetic elements on plasmids. Our results suggest that it is strongly recommended to include a pre-screening step for antimicrobial resistance genes in bacterial vaccine development. As regards probiotics, preparations for companion animals should be subject to similar regulation as those for farm animals. It is in our common interest to prevent the further spread of antimicrobial resistance as widely as possible in the light of the One Health concept and to use and preserve antibiotics responsibly for future generations.

Keywords: antimicrobial resistance, ARG, *Escherichia coli*, probiotics, sequencing

Előszó

Napjaink egyik legsúlyosabb egészségügyi problémája a túlzott és nem megfelelő antibiotikumfelhasználás következtében széles körben kialakuló bakteriális rezisztencia. Az *Egy egészség* koncepció tükrében az emberéletek megmentésére fenntartott antibiotikumok hatékonyságát mind a köz-, mind az állategészségügyben meg kell őriznünk. Napjainkra a hagyományos, fenotípuson alapuló módszerek kivül a molekuláris genetikai módszerek is egyre nagyobb teret nyernek, úgymint a polimeráz láncreakció (PCR) alapú vizsgálatok vagy az új generációs szekvenálás (NGS). Ez utóbbi segítségével pontos képet kaphatunk a genomról, a rezisztenciagének hordozásáról és további transzkriptomikai vizsgálatok segítségével genomikai környezetben vizsgálhatjuk az egyes rezisztenciagének kifejeződését is. A legóvatosabb becslések szerint, ha ilyen mértékben folytatjuk az antibiotikumok használatát, akkor 2050-re az antimikrobiális rezisztencia válhat a vezető halál okozó okká. Ennek megelőzése érdekében a jövőben szoros együttműködésre van szükség a tudomány, a klinikum és az ipari szereplők között.

Dr. Jerzsele Ákos
tudományos és innovációs rektorhelyettes,
egyetemi docens, tanszékvezető; Állatorvostudományi
Egyetem, Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Napjainkban az állatok, az emberek és bolygónk egészsége elválaszthatatlanul összekapcsolódott. A Ceva számára stratégiai fontosságú a folyamatos innováció, és a „One Health – Egy egészség” szemlélet céljainak elérése. Ezen a területen az AMR terjedésének megfékezése és az antibiotikumok korlátozott használata, hatékonyságuk megőrzése komoly kihívás elé állítja nemcsak a hatóságokat, de az állatgyógyászat és állategészségügy szereplőit is. Még inkább előtérbe kerül a fertőzések megelőzése, az állatok egészségének monitorozása, megfelelő vakcinázási programok alkalmazása. A kutatási együttműködés nagyszerű lehetősége a tudásbázis és a gyakorlati alkalmazás összekapcsolására, eredményei hozzájárulnak az AMR jobb megismeréséhez. Az eddigi vizsgálatok rámutattak a rezisztenciagének monitorozásának, a baktériumtörzsek rezisztómatérképezésének fontosságára, valamint napjaink egyik legkorszerűbb technológiájának, az új generációs szekvenálásnak az alkalmazásával eszközt is adott a kezünkbe ennek vizsgálatához. Az eredmények és a módszertan közvetlenül hozzájárul új, biztonságosabb vakcinák fejlesztéséhez. Az együttműködés sikeressége azon a korszerű, magas színvonalú tudományos ismereten és technikai felkészültségen alapul, amit az Állatorvostudományi Egyetem Gyógyszertani és Méregtani Tanszéke biztosít, egyben lehetőséget teremtve az ösztöndíjashoz hasonlóan tehetséges, a szakma iránt elkötelezett hallgatók képzésére, támogatására.

Dr. Nagy Zoltán
biomolekuláris módszerek platform vezető;
Ceva-Phlyxia Zrt.,
Innovációs és Kutatás-fejlesztési Igazgatóság

Bevezetés

Sir Alexander Fleming 1928-ban egy véletlennek köszönhetően fedezte fel az első antibiotikumot, a penicillint. Szabadon hagyott *Staphylococcus aureus* tenyésztete penészgombával (*Penicillium* spp.) fertőződött, mely körül gátlási zóna alakult ki. Bár terápiás célra csupán 1942-től kezdték el használni a penicillint, a rezisztencia néhány éven belül megjelent (Gálfi–Csikó–Jerzsele 2015). Már akkoriban feltételezte, hogy valószínűleg nincs olyan kemoterápiás szer, amire előbb vagy utóbb ne reagálnának a baktériumok valamilyen evolúciós, szelekciós lépéssel (Fleming 1946).

Az antibiotikumrezisztencia kialakulásának egyik fő mechanizmusa a hatóanyag enzimatisz uton történő lebontása vagy módosítása. Ez egyrészt vagy a kulcsfontosságú reaktív központ inaktivációja vagy egy szerkezetben történő változás során valósul meg. Másrészt a kovalens kötések módosítása, például O-foszforiláció, O-riboziláció, O-glikoziláció, O-nukleotidiláció, O- és N-acetiláció révén akadályozott az antibiotikum és a célpont kapcsolódása (De Pascale–Wright 2010). Egy másik fő mechanizmus az efflux pumpák által történő hatóanyag kipumpálása a sejtből (Li–Nikaido 2009). Az antibiotikum célpont módosítás (antibiotic target alteration) mechanizmuson belül beszélhetünk egyrészt rezisztenciát eredményező mutációról (mutation conferring antibiotic resistance), mely során a DNS-ben bekövetkező pontmutációk eredményeként kisebb affinitással kötődik az antibiotikum, másrészt a represszorok deaktivációja, inaktiváció vagy a pumpák génexpressziójának növekedése is bekövetkezik (Nilsson et al. 2003; Sakamoto et al. 2003; Takahata et al. 2010). Az antibiotikum célpont cseréje (antibiotic target replacement) például olyan fehérjékkel, melyeknek ugyanaz a funkciója, de a szerkezete más. Ilyenek például a methicillin rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsek kialakulásáért felelős penicillin-binding protein 2 (PBP2) – ami egy laterális géntranszfer eredményeként mutálódott penicillin kötőfehérje, melynek következtében a sejtmembrán peptidoglikán szintézise nem szenved zavart (Hartman–Tomasz 1984; Ubukata et al. 1989; Fuda et al. 2004; García–Álvarez et al. 2011; Paterson et al. 2012). Az antibiotikum célpontjának a védelem (antibiotic target protection) a hatóanyag kötődésével szembeni védelmet jelenti (Wilson et al. 2020). Az antibiotikummal szembeni permeabilitás csökkentés során általában a porinszatornák mennyiségének csökkentése révén alakul ki rezisztencia; ezen kívül enzimek és egyéb fehérjék közvetlenül vagy közvetve is csökkenthetik a permeabilitást (Cohen–McMurry–Levy. 1988; Delcour 2009). Nem utolsósorban beszélhetünk hiányból eredő rezisztenciáról (resistance by absence), ami egy rezisztenciát biztosító gén hiányából ered. Az adott gén vagy géntermék hiánya, például egy porin gén delécioja megakadályozza a hatóanyag sejtbe jutását (Makino et al. 1999; Zhang et al. 2008; Lin et al. 2014).

Az antimikrobiális rezisztencia terjedésének egyik alig vizsgált területe a vakcinaként felhasználni kívánt baktériumtörzsek antimikrobiális rezisztencia gén (ARG) hordozása, ezeknek a rezisztencia terjesztésében betöltött potenciális szerepe. Az élő, bakteriális vakcinák antigén kódoló génei vagy kromoszomálisan vagy plazmidon találhatóak. Ez számos biztonsági aggályt vethet fel (Detmer–Glenting 2006), melyek közül kétségtelenül az ARG-k terjedése lehet a legfontosabb (1. táblázat).

1. táblázat | A DNS-vakcinákkal szembeni biztonsági aggályok

Fehérje- és DNS-vakcinák	Nemkívánatos gének plazmidon való átvitele A vektor átvitele a kezelt faj mikrobiomjába Káros peptidek allergén hatása Pontatlan transzkripció és transláció
DNS-vakcinák	A DNS perzisztenciája Az idegen antigén tartós kifejeződése DNS-ellenes antitestek képződése Transzformáció Antimikrobiális rezisztencia gének terjedése

Forrás: Detmer–Glenting 2006

A másik keveset vizsgált terület a probiotikus törzsek ARG hordozása és az AMR terjesztésében betöltött lehetséges szerepük. A probiotikumok olyan alternatív hozzáférhető szerként léptek az antibiotikumok helyébe, melyekkel utóbbiak kedvező hatásait próbálják kiváltani (Afric 1989). Az Egészségügyi Világszervezet (WHO), az Élelmiszerügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (FAO) és az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) javaslatai alapján a probiotikumoknak meg kell felelniük bizonyos biztonsági, funkcionális kritériumoknak és technológiai feltételeknek. Ezek közül az egyik legfontosabb, hogy nem kódolhatnak mobilis genetikai elemként ARG-t. Ez a szabályozás azonban csak a gazdasági haszonállatok számára engedélyezett készítményekre terjed ki (EFSA 2005; Ganguly et al. 2011; Kovács et al. 2021).

Anyag és módszer

A törzsek és a készítmények eredete

A vizsgálatban nyolc, baromfi eredetű *E. coli* izolátumot használtunk fel, amelyeket a Ceva-Phylaxia Zrt. biztosított számunkra. A törzseket 1–8. sorszámmal jelöltük a vizsgálatok során, azok tulajdonjogával a Ceva rendelkezik.

A probiotikus készítmények kereskedelmi forgalomban kapható szabadon forgalmazható állatgyógyá-

szati készítmények, melyeket állatpatikáktól és állatgyógyászati termékeket forgalmazó cégektől vásároltunk. Ezek jelölése 1–20. sorszámmal történt, a készítményekben előforduló törzsek pedig az *Enterococcus faecium*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus ramnosus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentasaccus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchnerii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*. A készítmények kereskedelmi forgalmi neveit tulajdonjogból eredően nem jelöltük.

Új generációs szekvenálás

Az *E. coli* törzseket tartalmazó baktériumszuspenzióból, valamint a probiotikumkészítményekből a QIAmp DNS-kit (Qiagen, Németország) segítségével izoláltuk a DNS-t a gyártó protokollja szerint. A DNS-ből generált páros végű leolvasásokat Illumina NextSeq 500 szekvenálóval határoztuk meg (Sabin-Tóth et al. 2021).

Bioinformatikai adatfeldolgozás

A nyers szekvenciák minőség-ellenőrzését a FastQC v0.11.9 (Andrews 2012) szoftverrel végeztük, majd a nem megfelelő minőségű szekvenciákat a TrimGalore v0.6.6 (Krueger 2022) program segítségével kiszűrtük. A leolvasott szekvenciákat a MEGAHIT v1.2.9 (Li 2015) segítségével hosszabb átfedő szekvenciákká (contigok) igazítottuk. A contigok minőség-ellenőrzésére a QUAST szoftvert használtuk (Gurevich et al. 2013). Az így kapott contigokból a Prodigal v2.6.3 (Hyatt et al. 2010) segítségével meghatároztuk az összes lehetséges nyitott leolvasási keretet (ORF). Az ARG-k azonosítását az ORF-ek között a Resistance Gene Identifier (RGI) v5.1.0 segítségével végeztük a CARD adatbázissal (letöltve 2021. 04. 23-án) összevetve (Alcock et al. 2020). Csak azokat a géneket vettük figyelembe, amelyek megfeleltek a CARD adatbázis által meghatározott STRICT küszöbkritériumoknak, és legalább 95%-os szekvencia-azonosságot és lefedettséget mutattak.

Az azonosított rezisztenciagének potenciális mobilitásának vizsgálatához a MobileElementFinder (v1.0.3) (Johansson et al. 2021) programot használtuk, amely a mobilis genetikai elemeket (MGE) jelzi előre a contigokon. Ebből a célból csak azokat az ARG-ket tekintettük potenciálisan mobilnak, amelyek az adatbázisban szereplő leghosszabb, *E. coli*-ra jellemző összetett transzpozon (Tn1681, 24488 nukleotid hosszúságú) távolságán belül voltak. Emellett a contigok plazmid eredetét a PlasFlow v1.1 szoftver (Krawczyk–Lipinski–Dziembowski 2018) segítségével vizsgáltuk, a fággenomok jelenlétét a contigokon pedig a VirSorter v2.2.2 (Roux et al. 2015) szoftver segítségével határoztuk meg.

2. táblázat | Az azonosított antimikrobiális rezisztencia gének mobilis, fág és plazmidon kódolt elemei

Antimikrobiális rezisztencia gének	Lefedettségi (%)	Szekvencia-azonosság (%)	MGE*	Fág	Plazmid	Antibiotikumosztály**	Rezisztenciamechanizmus**
<i>acrD</i>	100	99,81		+		aminoglikozidok	efflux pumpa
<i>acrE</i>	100	100		+		fluorokinolonok, cefalosporinok, cefamicinek, penicillinek	efflux pumpa
<i>acrF</i>	100	99,61		+		fluorokinolonok, cefalosporinok, cefamicinek, penicillinek	efflux pumpa
<i>ampC</i>	100	97,35	+			cefalosporinok, penicillinek	enzimatis inaktiváció
<i>ampC1</i>	99,77	99,08		+		cefalosporinok, penicillinek	enzimatis inaktiváció
<i>bacR</i>	100	99,58		+		aminoglikozidok, aminokumarin	efflux pumpa
<i>bacS</i>	100	99,14		+		aminoglikozidok, aminokumarin	efflux pumpa
<i>cpxA</i>	100	100		+		aminoglikozidok, aminokumarin	efflux pumpa
<i>emrE</i>	100	98,18		+		makrolidok	efflux pumpa
<i>emrK</i>	100	99,72		+		tetraciklinek	efflux pumpa
<i>emrY</i>	100	99,8		+		tetraciklinek	efflux pumpa
<i>kdpE</i>	100	99,11	+			aminoglikozidok	efflux pumpa
<i>mdtA</i>	100	99,28		+		aminokumarin	efflux pumpa
<i>mdtB</i>	100	100		+		aminokumarin	efflux pumpa
<i>mdtC</i>	100	99,41		+		aminokumarin	efflux pumpa
<i>mdtG</i>	100	100	+	+		foszfomicin	efflux pumpa
<i>mdtH</i>	100	100		+		fluorokinolonok	efflux pumpa
<i>mdtM</i>	100	97,8		+		fluorokinolonok, linkozamidok, nukleozidok, akridin festék, fenikolok, fertőtlenítőszeres és interkalációs festék	efflux pumpa
<i>mdtN</i>	100	99,42		+		nukleozidok, akridin festék, fertőtlenítőszeres és interkalációs festék	efflux pumpa
<i>mdtO</i>	95,75	98,62		+		nukleozidok, akridin festék, fertőtlenítőszeres és interkalációs festék	efflux pumpa
<i>mdtP</i>	100	98,16		+		nukleozidok, akridin festék, fertőtlenítőszeres és interkalációs festék	efflux pumpa
<i>msbA</i>	100	100	+	+		nitroimidazolok	efflux pumpa
<i>QnrS1</i>	100	100	+		+	fluorokinolonok	antibiotikum célpont védelem
<i>saxR</i>	100	100		+		fluorokinolonok, cefalosporinok, tetraciklinek, penicillinek, rifamicinek, fenikolok, triklózán	antibiotikum kötőhely módosítás, efflux pumpa
<i>saxS</i>	100	100		+		fluorokinolonok, cefalosporinok, tetraciklinek, penicillinek, rifamicinek, fenikolok, triklózán	antibiotikum kötőhely módosítás, efflux pumpa
<i>sul2</i>	100	100	+		+	szulfonamidok	antibiotikum kötőhely változtatás
<i>TEM-1</i>	100	100	+		+	monobaktámok, cefalosporinok, penicillinek, karbapenemek	enzimatis inaktiváció
<i>tolC</i>	99,6	100	+			makrolidok, fluorokinolonok, aminoglikozidok, karbapenemek, cefalosporinok, tetraciklinek, cefamicinek, penicillinek, peptid antibiotikumok, aminokumarin, rifamicinek, fenikolok, triklózán	efflux pumpa
<i>ugd</i>	100	99,23	+	+		peptid antibiotikumok	antibiotikum kötőhely módosítás
<i>UhpT</i>	100	99,57	+			foszfomicin	antibiotikum kötőhely módosítás

*MGE – Mobilis Genetikai Elem

**The Comprehensive Antibiotic Resistance Database

Eredmények

Az *E. coli* törzsek szekvenálási eredményei

A 8 *E. coli* új generációs szekvenálása során összesen 57 ARG-t azonosítottunk, melyek 18-féle antibiotikumcsoporttal szemben alakítanak ki rezisztenciát. Ezek közül 30 génnek van potenciális jelentősége horizontális géntranszfer tekintetében (2. táblázat). Horizontális géntranszferen olyan folyamatot értünk, mely során reprodukció nélkül adódik át egy adott gén egyik baktériumból a másikba, és a fogadó fél genomjába be is épül az. Ez egy kétkomponensű folyamat, hiszen szükséges az adott DNS-szakasz elmozdulása (transzfer mechanizmus) és a beépülési képesség (integrációs mechanizmus). Az MGE-k erre az elmozdulásra adnak lehetőséget, ezáltal hozzájárulva a horizontális géntranszferhez (Daubi-Szöllősi 2016; Lerminiaux-Cameron 2018). Ezen gének átadásában bizonyítottan pozitív szelekciós hatása van az adott antibiotikum hatóanyag használatának (Martínez-Coque-Baquero 2015).

Az 57 gén közül 10 (17,5%) volt MGE, melyből 3 (*mdtG*, *msbA*, *ugd*) fagon kódolt (0,5%) és 3 (*QnrS1*, *sul2*, *TEM-1*) plazmidon kódolt volt (0,5%), összesen 23 gén volt fagon kódolt (40,4%) és mindössze 3 gén (*QnrS1*, *sul2*, *TEM-1*) volt plazmidon kódolt (0,5%). A 30 gén közül a legtöbb ARG penicillinekkal (7 db, 23,3%), cefalosporinokkal (7 db, 23,3%) és aminoglikozidokkal (6 db, 20%) szemben kódolt rezisztenciát. A 18-féle antibiotikumcsoport, mellyel szemben fenotípusosan is megnyilvánuló rezisztencia alakulhat ki: penicillinek, cefalosporinok, monobaktámok, karbapenemek, tetraciklinek, aminoglikozidok, fenikolok, makrolidok, peptid antibiotikumok, fluorokinolonok, foszfomicin, aminokumarin, rifamicinek, nukleozid antibiotikumok, elfamicin, linkozamidok, nitroimidazolok, szulfonamidok. Ezen kívül olyan fertőtlenítőszerekkel és festékek-

kel szemben is találtunk rezisztenciát kódoló géneket, mint az akridin, interkalációs festék és triklozán.

Az azonosított gének közül közegészségügyi szempontból legnagyobb jelentőséggel az *ampC*, *ampC1*, *QnrS1*, *TEM-1* és *ugd* gének bírnak. A biztonságot veszélyeztető tényező, hogy az *ampC*, a *QnrS1* és az *ugd* gének MGE-ként voltak kódolva. Az *ampC* és ennek az *ampC1* mutációi olyan béta-laktamáz termelést kódoló gének (cefalosporináz), melyek széles körben, mind a penicillinekkal, mind a cefalosporinokkal szemben, enzimikus lebontás révén alakítanak ki rezisztenciát (Jacoby 2009). A *QnrS1* gén egy plazmidon kódolt fluorokinolon kötőhely módosításért felelős fehérjét kódoló rezisztenciagén (Hata et al. 2005). Kiemelendő, hogy az egyik törzs esetén egy szélesebb spektrumú béta-laktamáz termelést (ESBL) kódoló gén, a *TEM-1* volt kimutatható, mely a penicillinekkal és az első generációs cefalosporinokkal szemben alakít ki rezisztenciát (Salverda-Visser-Barlow 2010), és emellett MGE-ként volt jelen. Az *ugd* egy foszfoetanolamin transzferázt kódoló gén, mely a 4-amino-4-deoxi-L-arabinóz szintéziséért és a lipid-A-ra történő átviteléért felelős. Kifejeződésének eredményeként a Gram-negatív baktériumok sejtfa megvastagodik, ami lehetővé teszi a polimixinekkal szembeni (pl. kolisztin) rezisztenciát (Gunn et al. 1998).

A probiotikumok szekvenálásának eredményei

A 20-féle probiotikumos készítmény új generációs szekvenálása során mintegy 91 ARG-t sikerült azonosítanunk. A közegészségügyi jelentőséggel bíró 9-féle ARG-t a 3. táblázat tartalmazza, mely az MGE és a plazmidon kódolt géneket foglalja össze. Ezeket kizárólag a társállatoknak szánt készítményekben sikerült kimutatnunk. A szigorú egyezőségi feltétel alkalmazása során fagon kódolt gént nem detektáltunk. Az egyetlen MGE az *APH(3')-Ia* gén volt, mely transzpozon által kódolt, és foszforiláció útján, aminoglikozid rezisztenciát

3. táblázat | *Pediococcus pentasaccus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchnerii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus* törzseket tartalmazó probiotikumok ARG hordozása MGE és plazmidon való kódolás tekintetében

Antimikrobiális rezisztencia gén	Lefedettség (%)	Szekvencia-azonosság (%)	MGE*	Plazmid	Antibiotikumosztály**	Rezisztenciamechanizmus**
<i>AAC(6')-Ii</i>	100	98,9	–	+	aminoglikozidok	enzimikus inaktiváció
<i>APH(3')-Ia</i>	100	100	+	+	aminoglikozidok	enzimikus inaktiváció
<i>APH(3'')-Ib</i>	100	99,63	–	+	aminoglikozidok	enzimikus inaktiváció
<i>APH(6)-Id</i>	99,28	99,64	–	+	aminoglikozidok	enzimikus inaktiváció
<i>cata8</i>	96,74	100	–	+	fenikolok	enzimikus inaktiváció
<i>ErmB</i>	98,79	99,18	–	+	makrolidok, linkozamidok	antibiotikum kötőhely módosítás
<i>tet(C)</i>	100	99,75	–	+	tetraciklinek	efflux pumpa
<i>tetM</i>	100	96,56	–	+	tetraciklinek	antibiotikum kötőhely módosítás
<i>tetS</i>	100,78	99,84	+	+	tetraciklinek	antibiotikum kötőhely módosítás

*MGE – Mobilis Genetikai Elem

**The Comprehensive Antibiotic Resistance Database

4. táblázat | Az *Enterococcus faecium* probiotikum ARG hordozása

ARG	ARG család*	Mechanizmus*	Antibiotikumcsoport											Haszonállat										Társállat							
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
	x										x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			x	
	x																		x											x	
		x	x	x	x	x					x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x			x	
											x	x	x	x	x	x	x	x												x	
			x	x	x	x					x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x			x	
				x	x	x														x											
	</																														

x plazmidon kódolt gén

I. penicillinek, II. aminoglikozidok, III. tetraciklinek, IV. fenikolok, V. makrolidok, VI. lincosamidok, VII. pleuromutilinek, VIII. fluorokinolonok, IX. diaminopirimidinek, X. rifamicinek, XI. nukleozidok

*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database

eredményező enzimátikus inaktivációt vált ki (*Oka–Sugisaki–Takanami 1981*). Az összes azonosított gén (9 db) közül egy készítményben mutattuk ki az *APH(3'')-Ia* gént mint MGE-t (1,1%), és 11 esetben (12,1%) azonosítottunk plazmidon kódolt gént, melyek közül az *ErmB* és a *tetS* gének fordultak elő két készítményben.

A 4. táblázatban a probiotikus készítményekben leggyakrabban használt *Enterococcus faecium* törzsek vizsgálatában azonosított rezisztenciagénjeit foglaltuk össze. Összesen 61 esetben azonosítottunk ARG-t, melyek 8-féle rezisztenciagént foglaltak magukban. A haszonállatok számára engedélyezett készítmények közül egy kivételével mindegyikben megtalálható volt az *AAC(6')-Ii* gén, mely acetiltranszferáció útján az aminoglikozidok enzimátikus inaktivációjáért felel. Az *eatA* és *msrC* gének tetraciklinek, fenikolok, makrolidok, linkozamidok és pleuromutilinek kötőhely védelméért felelős gének, melyek az ATP-kötő kazetta riboszomális védelméért felelős fehérjét kódolnak. Látható, hogy a haszonállatok számára engedélyezett készítményekben sem MGE, sem plazmidon és fagon kódolt ARG nem volt azonosítható. Más a helyzet a társállatok számára engedélyezett készítményeknél, itt három készítményben is találtunk plazmidon kódolt géneket. Többek között az előbb említett *AAC(6')-Ii* gént, ezen kívül a foszfortranszferáció útján aminoglikozidok enzimátikus inaktivációjáért felelős *APH(6)-Id* gént, két esetben *ErmB* gént, ami metiltranszferáció révén mRNS csendesítést eredményez, ami a szerkezet stabilizálásához vezet, megakadályozva a további transzlációt. Egy esetben a major facilitátor szupercsaládba (MFS) tartozó efflux pumpát kódoló *tetC* gént azonosítottunk, és egy esetben *tetM* gént találtunk, ami egy olyan riboszomális védőfehérje, mely a DNS-ben ún. „ugrógén”, tehát változtathatja a genomon belüli pozícióját, ezáltal a horizontális géntranszferben nagy eséllyel szerepet játszhat.

Megvitatás

A bakteriális és DNS-alapú vakcinák alkalmazása esetén mind a World Health Organization – WHO (*Standardization & Organization 2016*), mind a Food and Drug Administration – FDA (*Guidance for Industry: Considerations for Plasmid Deoxyribonucleic Acid Vaccines for Infectious Disease Indications; Availability 2007*) és a European Medicines Agency – EMA (*EMA 2018*) potenciális veszélyként jelöli meg a recipiens DNS-ébe történő ARG beépülést. Azonban nem teszik kötelezővé ennek a vizsgálatát vakcinafejlesztés során. Összehasonlító tanulmány nem áll rendelkezésre ilyen jellegű vizsgálatra.

Összességében elmondhatjuk, hogy a kolisztinnel szembeni rezisztencia szempontjából fontos *mcrI* gént nem találtunk. Az *ugd* gén kizárólag kromoszomálisan volt kódolva, azonban mobilitása miatt problémát okozhat. Ki kell emelni a *marA* gént, mely egy fontos regulátorgén az MDR típusú *acrAB* efflux pumparendszer mű-

ködésében, valamint az *ompF* gén regulációja révén a porinszatornák downregulációjáért is felel. A makrolid rezisztenciát kódoló gének csak abban az esetben lennének jelentősek, ha mobilisak lennének, foszomicin esetén ugyanez a helyzet. A *gyrA* génmutáció meglete nem előnyös, annak ellenére, hogy nem mobilis. A *QnRS1* gén plazmidon való kódolása és mobilitása miatt biztosan kizárandó azon törzsek felhasználása, melyben detektálható. A *sul2* gén mobilitása szintén kizáró tényező. Az *ampC* gén jelenléte szintén gyakorlati problémákat okozhat a laktamáztermelés végett.

A probiotikumkészítmények közül a haszonállatok részére engedélyezett termékek közegészségügyi veszélyt nem hordoznak. A társállatok részére engedélyezett készítmények közül egy esetben azonosítottunk plazmidon kódolt MGE-t, ami az *APH(3'')-Ia* gén volt, mely transzpozon által kódolt aminoglikozid rezisztenciát eredményez, foszforilációval történő enzimátikus inaktiváció útján (*Oka–Sugisaki–Takanami 1981*). Ezen kívül nyolc esetén állapítottuk meg, hogy plazmidon kódoltak, melyek szintén hozzájárulhatnak a horizontális géntranszferhez. Ezen gének aktiválódása közül három gén aminoglikozid rezisztenciát (*AAC(6')-Ii*, *APH(3'')-Ib*, *APH(6)-Id*), három gén tetraciklinrezisztenciát (*tet(C)*, *tetM*, *tetS*), egy gén fenikol rezisztenciát (*catA8*) eredményezhet; és egy gén esetében makrolid- és linkozamidrezisztencia következhet be (*ErmB*).

Következtetések

Az eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy érdemes a bakteriális alapú vakcinák fejlesztése során metagenomikai módszerekkel feltérképezni a baktériumok rezisztómiáját. Az egyes gének azonosítása nem feltétlenül utal fenotípusos megnyilvánulásra. A mobilis genetikai elemek közelsége általában növeli a gének terjedési valószínűségét. Fenotípusos megnyilvánulás tekintetében érdemes minimális gátló koncentráció (MIC) meghatározást végezni.

Az AMR terjedése gazdasági haszonállataink rezisztómiája és haszonállataink termékei, valamint az állatokkal kapcsolatba kerülő emberek között ma már bizonyítottan meghatározza a hasonló rezisztóma felépítését. A legnagyobb jelentőséggel bíró indikátor kórokozó pedig ennek tekintetében az *E. coli* (*Munk et al. 2018; Luiken et al. 2019; Van Gompel et al. 2020; Tóth et al. 2021*). Egyértelműen kijelenthető tehát, hogy mindannyiunk felelőssége a széles körben történő felmérések végzése, és az AMR terjedése szempontjából potenciális veszélyforrások minimalizálása.

Köszönetnyilvánítás

Az új generációs szekvenálásban nyújtott segítségükért szeretném köszönetemet kifejezni dr. Bányai Krisztiánnak, dr. Kaszab Eszternek és dr. Bali Krisztinának. A nyers

szekvenciaadatok feldolgozásában nélkülözhetetlen segítséget nyújtott dr. Solymosi Norbert és dr. Papp Márton.

Az Innovációs és Technológiai Minisztérium Kooperatív Doktori Program Doktori Hallgatói Ösztöndíj Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.



Irodalomjegyzék

- Afric, R.F. (1989) Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 66. No. 5. pp. 365–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x>
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., ... McArthur, A. G. (2020) CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, Vol. 48 (D1), pp. D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Andrews, S. (2012) A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> [Letöltve: 2022. 04. 25.]
- Cohen, S. P., McMurry, L. M., & Levy, S. B. (1988) marA locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 170. No. 12. pp. 5416–5422. <https://doi.org/10.1128/jb.170.12.5416-5422.1988>
- Daubin, V. & Szöllősi, G. J. (2016) Horizontal Gene Transfer and the History of Life. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol. 8. No. 4. a018036. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018036>
- De Pascale, G. & Wright, G. D. (2010) Antibiotic resistance by enzyme inactivation: from mechanisms to solutions. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, Vol. 11. No. 10. pp. 1325–1334. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000067>
- Delcour, A. H. (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1794. No. 5. pp. 808–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>
- Detmer, A. & Glenting, J. (2006) Live bacterial vaccines – a review and identification of potential hazards. *Microbial Cell Factories*, Vol. 5. No. 23. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-23>
- EFSA (2005) Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to a generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA Journal*, Vol. 3. No. 6. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2005.226>
- EMA (2018) DNA vaccines non-amplifiable in eukaryotic cells for veterinary use. European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/dna-vaccines-non-amplifiable-eukaryotic-cells-veterinary-use> [Letöltve: 2022. 05. 09.]
- Fleming, S. A. (1946) *Chemotherapy: Yesterday, To-day, and To-morrow*. CUP Archive
- Fuda, C., Suvorov, M., Vakulenko, S. B., & Mobashery, S. (2004) The Basis for Resistance to β -Lactam Antibiotics by Penicillin-binding Protein 2a of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus**. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279. No. 39. pp. 40802–40806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403589200>
- Gálfi P., Csikó G., & Jerzsele Á. (2015) *Állatorvosi gyógyszerteran III. Második, javított kiadás*. Budapest: Robbie-Vet Kft.
- Ganguly, N. K., Bhattacharya, S. K., Sesikeran, B., Nair, G. B., Ramakrishna, B. S., Sachdev, H. P. S., & Hemalatha, R. (2011) ICMR-DBT Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food. *The Indian Journal of Medical Research*, Vol. 134. No. 1. pp. 22–25.
- García-Álvarez, L., Holden, M. T. G., Lindsay, H., Webb, C. R., Brown, D. F. J., Curran, M. D. ... Holmes, M. A. (2011) Metcillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet. Infectious Diseases*, Vol. 11. No. 8. pp. 595–603. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70126-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70126-8)
- Guidance for Industry: Considerations for Plasmid Deoxyribonucleic Acid Vaccines for Infectious Disease Indications; Availability (2007) Federal Register. <https://www.federalregister.gov/documents/2007/10/29/E7-21266/guidance-for-industry-considerations-for-plasmid-deoxyribonucleic-acid-vaccines-for-infectious> [Letöltve: 2022. 05. 09.]
- Gunn, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M., & Miller, S. I. (1998) PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminocarabiose lipid A modification and polymyxin resistance. *Molecular Microbiology*, Vol. 27. No. 6. pp. 1171–1182. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00757.x>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013) QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, Vol. 29. No. 8. pp. 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Hartman, B. J. & Tomasz, A. (1984) Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, Vol. 158. No. 2. pp. 513–516. <https://doi.org/10.1128/jb.158.2.513-516.1984>
- Hata, M., Suzuki, M., Matsumoto, M., Takahashi, M., Sato, K., Ibe, S., & Sakae, K. (2005) Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 49. No. 2. pp. 801–803. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.801-803.2005>
- Hyatt, D., Chen, G.-L., Locascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, Vol. 11. Article No. 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>
- Jacoby, G. A. (2009) AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 22. No. 1. pp. 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
- Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2021) Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 76. No. 1. pp. 101–109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>
- Kovács D., Palkovicsné Pézsa N., Farkas O., & Jerzsele Á. (2021) Antibiotikum-alternatívák a sertéstartásban: Irodalmi összefoglaló. *Magyar Állatorvosok Lapja*, Vol. 14. No. 5. pp. 281–282
- Krawczyk, P. S., Lipinski, L. & Dziembowski, A. (2018) PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. *Nucleic Acids Research*, Vol. 46. No. 6. p. e35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1321>
- Krueger, F. (2022) Trim Galore. Perl. <https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore> [2022-04-25]
- Lerminiaux, N. A. & Cameron, A. D. S. (2018) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 65. No. 1. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., Lam, T.-W. (2015) MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, 31 (10) 1674–1676, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>

- Li, X.-Z. & Nikaido, H. (2009) Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, Vol. 69. No. 12. pp. 1555–1623. <https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000>
- Lin, X., Yang, M., Li, H., Wang, C., & Peng, X.-X. (2014) Decreased expression of LamB and Odp1 complex is crucial for antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Proteomics*, Vol. 98. pp. 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.12.024>
- Luiken, R. E. C., Van Gompel, L., Munk, P., Sarrazin, S., Joosten, P., Dorado-García, A. ... EFFORT Consortium (2019) Associations between antimicrobial use and the faecal resistome on broiler farms from nine European countries. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 74. No. 9. pp. 2596–2604. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz235>
- Makino, K., Yokoyama, K., Kubota, Y., Yutsudo, C. H., Kimura, S., Kurokawa, K., & Shinagawa, H. (1999) Complete nucleotide sequence of the prophage VT2-Sakai carrying the verotoxin 2 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from the Sakai outbreak. *Genes & Genetic Systems*, Vol. 74. No. 5. pp. 227–239. <https://doi.org/10.1266/ggs.74.227>
- Martínez, J. L., Coque, T. M., & Baquero, F. (2015) What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature Reviews. Microbiology*, Vol. 13. No. 2. pp. 116–123. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3399>
- Munk, P., Knudsen, B. E., Lukjancenko, O., Duarte, A. S. R., Van Gompel, L., Luiken, R. E. C. ... Aarestrup, F. M. (2018) Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nature Microbiology*, Vol. 3. No. 8. pp. 898–908. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0192-9>
- Nilsson, A. I., Berg, O. G., Aspevall, O., Kahlmeter, G. & Andersson, D. I. (2003) Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 47. No. 9. pp. 2850–2858. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2850-2858.2003>
- Oka, A., Sugisaki, H., & Takanami, M. (1981) Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 147. No. 2. pp. 217–226. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90438-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90438-1)
- Paterson, G. K., Larsen, A. R., Robb, A., Edwards, G. E., Pennycott, T. W., Foster, G. ... Holmes, M. A. (2012) The newly described mecA homologue, mecALGA251, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 67. No. 12. pp. 2809–2813. <https://doi.org/10.1093/jac/dks329>
- Roux, S., Enault, F., Hurwitz, B. L., & Sullivan, M. B. (2015) VirSorter: mining viral signal from microbial genomic data. *PeerJ*, Vol. 3. p. e985. <https://doi.org/10.7717/peerj.985>
- Sahin-Tóth, J., Kovács, E., Tóthpál, A., Juhász, J., Forró, B., Bányai, K. ... Dobay, O. (2021) Whole genome sequencing of coagulase positive staphylococci from a dog-and-owner screening survey. *PLoS One*, Vol. 16. No. 1. p. e0245351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245351>
- Sakamoto, Y., Furukawa, S., Ogihara, H., & Yamasaki, M. (2003) Fosmidomycin Resistance in Adenylate Cyclase Deficient (*cya*) Mutants of *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 67. No. 9. pp. 2030–2033. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.2030>
- Salverda, M. L. M., De Visser, J. A. G. M., & Barlow, M. (2010) Natural evolution of TEM-1 β -lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. *FEMS microbiology reviews*, Vol. 34. No. 6. pp. 1015–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00222.x>
- Standardization, W.H.O.E.C. on B. & Organization, W.H. (2016) WHO Expert Committee on Biological Standardization: Sixty-sixth Report. World Health Organization
- Takahata, S., Ida, T., Hiraishi, T., Sakakibara, S., Maebashi, K., Terada, S. ... Tomono, K. (2010) Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 35. No. 4. pp. 333–337. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.011>
- The Comprehensive Antibiotic Resistance Database: <https://card.mcmaster.ca/> [Letöltve: 2022. 04. 18.]
- Tóth A. G., Papp M., Jerzsele Á., Borbély F., Reibling T., Makrai L., & Solymosi N. (2021) Szoptató kocák bélsárrezisztómja egy hazai nagy létszámú sertésállományban. *Magyar Állatorvosok Lapja*, Vol. 143. No. 4. pp. 203–214.
- Ubukata, K., Nonoguchi, R., Matsushashi, M., & Konno, M. (1989) Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the mecA gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *Journal of Bacteriology*, Vol. 171. No. 5. pp. 2882–2885. <https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2882-2885.1989>
- Van Gompel, L., Luiken, R. E. C., Hansen, R. B., Munk, P., Bouwknegt, M., Heres, L. & Smit, L. A. M. (2020) Description and determinants of the faecal resistome and microbiome of farmers and slaughterhouse workers: A metagenome-wide cross-sectional study. *Environment International*, Vol. 143, 105939. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105939>
- Wilson, D. N., Haurlyuk, V., Atkinson, G. C., & O'Neill, A. J. (2020) Target protection as a key antibiotic resistance mechanism. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 18. pp. 637–648. <https://eprints.whiterose.ac.uk/164346/> [Letöltve: 2022. 01. 07.]
- Zhang, D., Jiang, B., Xiang, Z., & Wang, S. (2008) Functional characterisation of altered outer membrane proteins for tetracycline resistance in *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Vol. 32. No. 4. pp. 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.04.015>