

Mechanismy rezistence na antimikrobika

update 2022

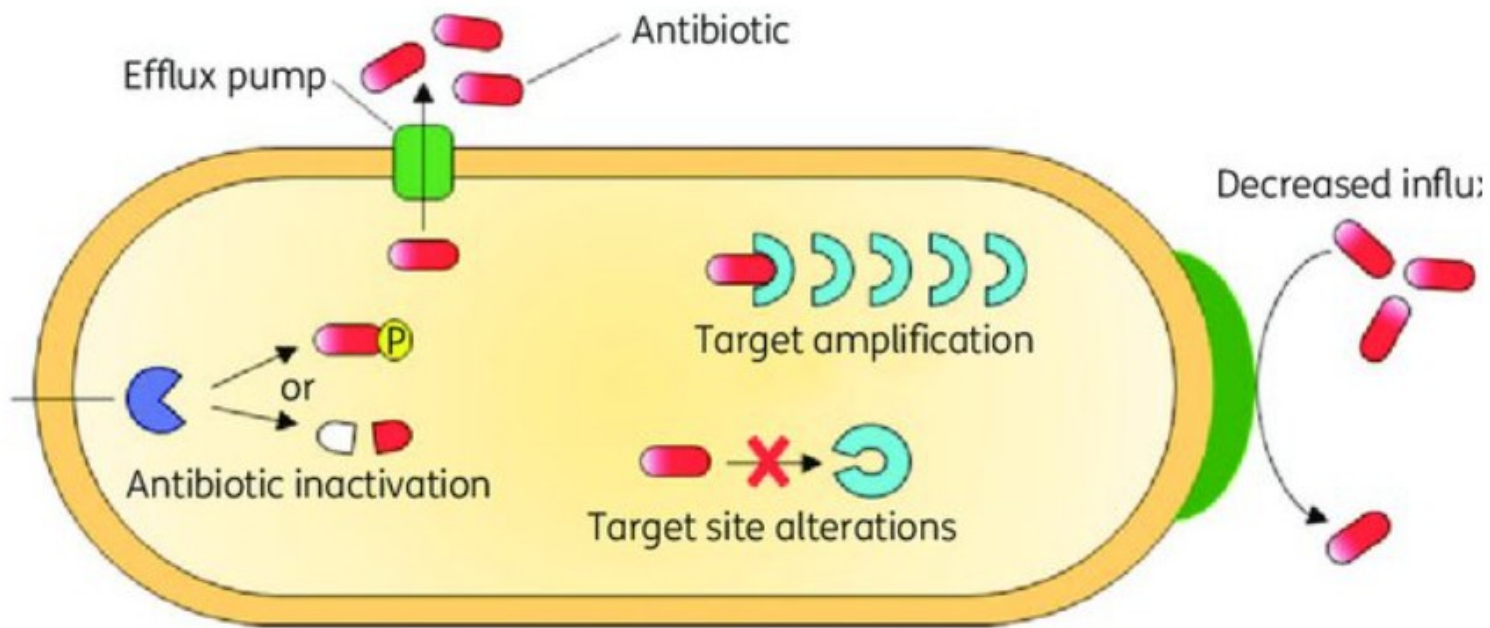
L.Pokludová MU_CZ

U většiny antibiotik a mikroorganismů, není rezistence na atb způsobena jedním mechanismem, často dochází ke kombinaci mechanismů nebo alespoň ke kombinaci účinků působících enzymů.

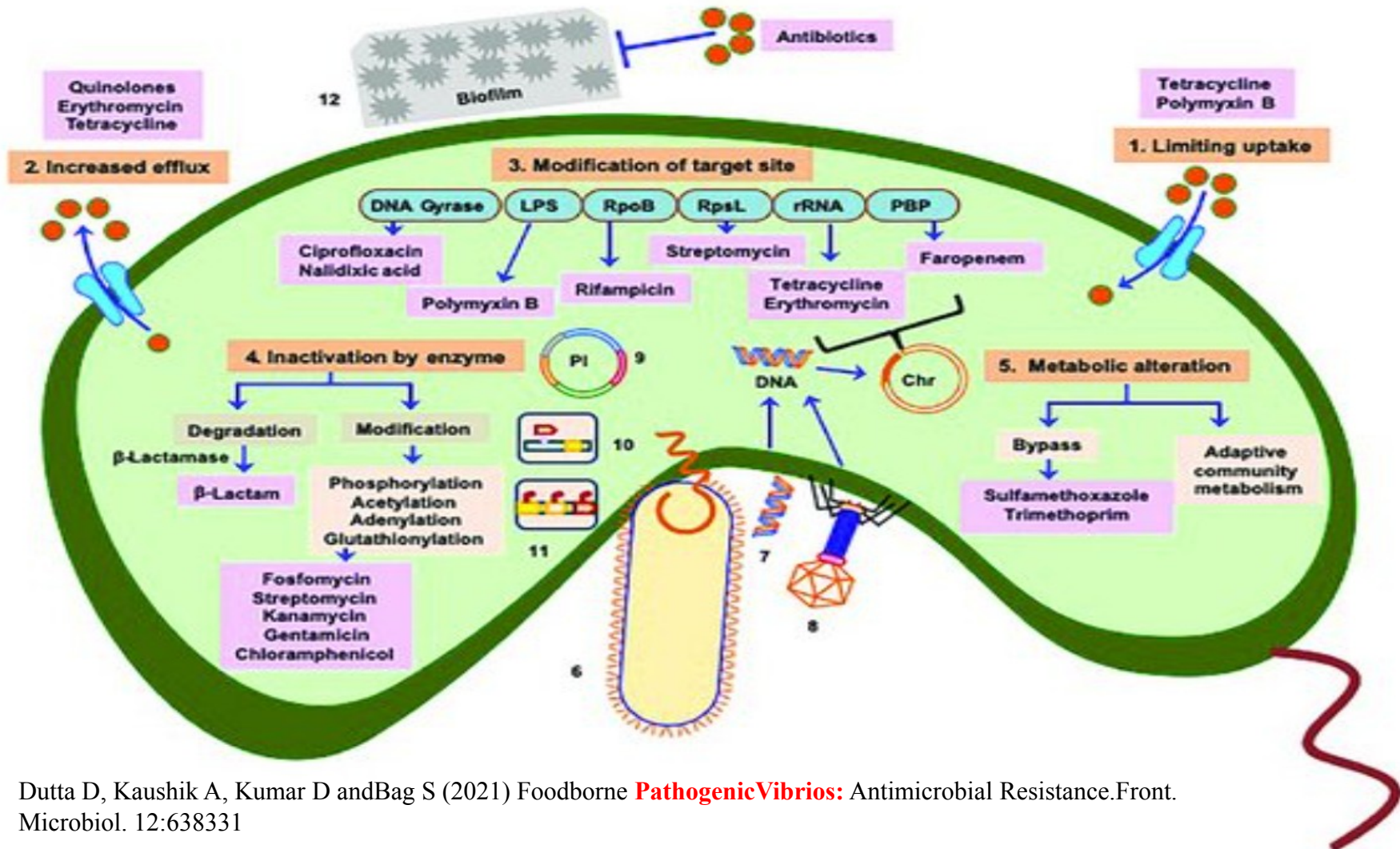
4 základní mechanismy nebo „strategie rezistence“

- **Změna cílové struktury (Target alteration)**
 - změna v místě působení atb
- **Nepropustnost nebo snížená propustnost + eflux**
 - Změna propustnosti – permeability, jiná než eflux
(Impermeability, decreased permeability)
 - **Efluxní pumpy**
(Active transport outside of bacterial cell)
- **Enzymatická inaktivace antibiotika (Enzymatic inactivation)**
- **Hyperprodukce cílové struktury (Target amplification)**

Modely typů rezistence na atb



Modely typů rezistence dle mechanismů a ATM



Komentář k předchozímu obrázku- model patogenních Vibrií

Mechanismy intrinsic (přirozené) či acquired (získané) rezistence či snížené citlivosti

1. Snížený příjem ATM
2. Zvýšený efflux léčiv včetně ATM
3. Modifikace cílové struktury ATM (chromosome associated phenomenon),
4. Enzymatická inaktivace
5. Alterace metabolické dráhy
- 6, 7 a 8 reprezentují horizontální přenos AMR (mobilní genetické elementy - prostřednictvím konjugace, transformace či fágové transdukce)
- 9, 10, a 11 reprezentují plasmidový transfer či mobilní genetické elementy: transposony a integrony
- 12 Fyzikálně chemické procesy – např. v důsledku tvorby biofilmu mohou rovněž hrát roli při vzniku a šíření AMR

Mechanismy 6-12 představují vyšší a rychlejší přenos AMR s klinickými dopady

Bledě modré bublinky – cíle zásahu ATM

Červené tečky – koncentrace ATM odpovědné za buněčný influx nebo efflux pomocí bleděmodrých transportérů nebo effluxních proteinů

Antibiotika (ATM) jsou vyjmenována ve fialových obdélnících

Pl = plasmid, Chr = chromozom

Změna cílové struktury - změna v místě působení atb:

- Bakterie mění strukturu cílové molekuly zásahu antibiotika,
 - obvykle esenciálního bakteriálního enzymu, nebo
 - exprimuje alternativní cílovou molekulu neinhibovanou antibiotikem tím se vyhne toxickému účinku antibiotika („bypass“ pathway)
- Tato vlastnost není zcela specifická, ale může být společná pro více antibiotik se stejným nebo příbuzným mechanismem účinku.

Impermeabilita – změna propustnosti – permeability :

- Bakterie mění propustnost :
 - úplnou impermeabilitou pro antibiotikum nebo
 - aktivním vyloučením antibiotika z buňky.
- Tato vlastnost může být přísně
- **specifická:**
 - chybění specifických receptorů nebo
 - chybění porinů pro propuštění atb do buňky
- **nespecifická**
 - blok ATP systému a zábrana aktivního transportu do buňky v závislosti na konkrétním mechanismu.

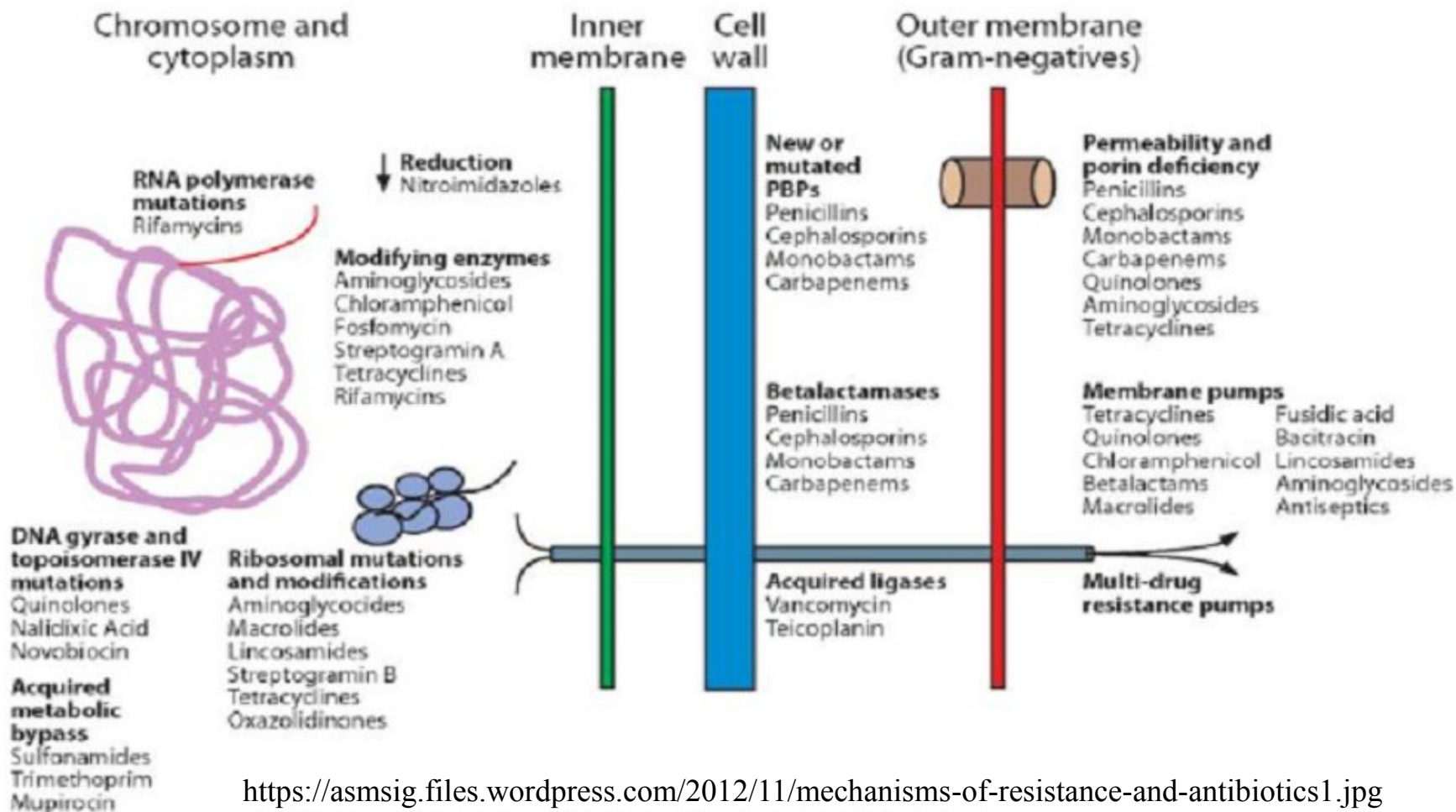
Enzymatická inaktivace antibiotika :

- ● ● ●
Bakterie produkuje enzymy, které inaktivují antibiotikum :
 - změněním struktury a funkčnosti
 - přímým štěpením a zničením funkčnosti
- Tato vlastnost bývá **vysoce specifická** :
 - odpovídající inaktivační enzym přesně stereospecificky odpovídá danému substrátu – zde antibiotiku.

Hyperprodukce cílové struktury

- Bakterie produkuje cílový enzym v takovém množství, že jej nelze danou koncentrací antibiotika vyblokovat.

Mechanismy rezistence a antibiotika, u kterých se uplatňují





Změna cílové struktury působení antimikrobika

Změna cílové struktury – Změna lokusu NK, na kterém dochází k vazbě atb

Rezistence k rifampicinu

- bodová mutace DNA-dependentní RNA polymerázy
- **Příkladem tohoto mechanismu je R k rifampicinu u *Mycobacterium tuberculosis***
 - **Cíl :** β -podjednotka RNA-polymerázy kódovaná genem *rob*.
 - **Vzniká s vysokou frekvencí**
 - Mechanismus zahrnuje bodové mutace, delece a inserce,
 - „single step“ high level resistance.

Zdroj : Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites, P.A. Lambert/ Advanced Drug Delivery Reviews 57(2005) 1471-1485)

- **Obdobný mechanismus se změnou v genu *rpoB* byl popsán také u vysokého nárůstu R k rifampicinu u kmenů *Helicobacter pylori* a *E.coli*.**

Rezistence k sulfonamidům

- bodová mutace v lokusu genu kódujícím syntetázu dihydropteroátu – snížená afinita k sulfonamidům a zvýšená ke kyselině p-aminobenzoové

Změna cílové struktury – Změna lokusu NK, na kterém dochází k vazbě atb

Rezistence k fluorochinolonům

- Může vzniknout chromozomálními mutacemi jak DNA gyrázy tak topoizomerázy IV.
- **U gramnegativních** bakterií rezistentních na fluorochinolony dochází:
 - k alteraci buď **GyrA** nebo **GyrB podjednotek DNA gyrázy**.
 - K mutaci dochází v tzv. „oblasti determinující R k chinolonům“ (= **QRDR** ... quinolone resistance determining region).
 - současný výskyt mutací **GyrA a parC** => velmi vysoký stupeň rezistence k chinolonům
 - např. 2 modifikace v místě GyrA+ 2 modifikace v místě parC => obrovský nárůst MIC ciprofloxacinu, pohybuje se v rozmezí 16 až 32 mg/l ... pro srovnání snížená citlivost ciprofloxacinu v přítomnosti jediné modifikace vede k MIC 0,25 mg/l.
 - GyrB mutace jsou méně časté, mechanismus způsobující rezistenci není zcela objasněn.
- **U grampozitivních** bakterií změna **topoizomerázy IV**
Zde se jedná o chromozomální mutace zasahující především oblasti *parC* a *parE*.

Změna cílové struktury

Expresse alternativní cílové molekuly neinhibované antibiotikem

- Plazmid poskytuje buňce náhradní enzym, který je odolný proti účinku antimikrobní látky.
- Jeden enzym je např. kódován chromozomálně a je k atb citlivý, při jeho „napadení“ je zastoupen enzymem kódovaným plazmidově, který je odolný k atb.

Bypass pathway

- Je volena jiná metabolická dráha, kterou přítomnost antibiotika nenaruší.

Rezistence k trimetoprimu

- alterace reduktázy dihydrofolátu => alterace je provedena **náhradou enzymem kódovaným *dfr* genem** neseným plazmidem nebo jiným mobilním elementem – např. transpozónem nebo genovou kazetou) + snížená permeabilita.
- Mechanismus popsán u *St.aureus*, *Str. pneumonie* a *H.influenzae*)

Změna cílové struktury

Změna cílového místa enzymu účastnícího se základních

metabolických pochodů, což má za následek rezistenci k danému atb

Rezistence k β -laktámům - alterace cílových struktur : PBP

(PBP = penicillin binding proteins)

- změněná afinita PBP k **β -laktamovým antibiotikům:**
- *MRSA, Streptococcus pneumoniae, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, Helicobacter pylori, Streptococcus pyogenes, Listeria monocytogenes*
- *Proteus mirabilis, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* kromě změněné afinity PBP také eflux a narušení permeability
- Z klinického a epidemiologického hlediska zejména z pohledu problematiky nozokomiálních infekcí je velmi důležitá
- REZISTENCE K OXACILINU A METICILINU U KMENŮ STAFYLOKOKŮ

REZISTENCE K OXACILINU A METICILINU U KMENŮ STAFYLOKOKŮ

- MRSA získávají vysokou rezistenci k meticilinu a k jiným β -laktamům prostřednictvím získání a exprese ***mecA* genu**.
- Tento gen kóduje **protein PBP 2a** (patří do skupiny biosyntetických enzymů podílejících se na začleňování peptidoglykanových komponent do buněčné stěny).
- Gen *mecA* je nesen na velkém genetickém elementu, který bývá nazýván **stafylokokovým kazetovým chromozómem *mec* (SCC*mec*)**, který je integrován do chromozómu MRSA v blízkosti počátku replikace.
- Předpokládá se, že SCC*mec* byl získán prostřednictvím horizontálního genového přenosu z kmenů koaguláza-negativních stafylokoků, pravděpodobně veterinárních kmenů *Staphylococcus sciuri*.

REZISTENCE K OXACILINU A METICILINU U KMENŮ STAFYLOKOKŮ

- V současnosti se rozlišuje 5 základních typů *SCCmec* (označ. I až V) a několik jejich variant.
- Liší se složením i velikostí (21 – 67kb).
- Lze je identifikovat PCR technikami.
- Interakce mezi β -laktamovým antibiotikem a PBP zahrnuje:
 - rychlé **reverzibilní vytvoření nekovalentního komplexu**,
 - následuje **nukleofilní atak na β -laktamový kruh** prostřednictvím kyslíku z postranního řetězce zbytku serinu přítomného v aktivním centru enzymu.
 - Tak se vytvoří relativně stabilní kovalentní komplex, ve kterém je serin acylován hydrolyzovaným β -laktamem.
 - Další mechanismus je vysvětlován pomocí kinetického modelu.
- V různém stádiu vývoje jsou nyní léčiva, jejichž účinek je založen na principu uchování afinity k PBP 2a a možnosti překlenout tento mechanismus rezistence. Patří mezi ně například **modifikované cefalosporiny, karbapenemy a trinem.**

Další příklady změny enzymů

Mozaikové PBP u kmenů *Streptococcus pneumoniae*

- PBP se sníženou afinitou k β -laktamům.
- způsobující rezistenci ke třetí generaci cefalosporinů nebo modifikované PBP 2a u rezistence k penicilinům.

Alterované PBP u kmenů *Neisseria gonorrhoeae*

- *N.gonorrhoeae* má 4 druhy PBP, označované PBP 1, 2, 3 a 4.
- Vysoká rezistence k penicilinu + spojení s dalšími systémy - efluxní systémy a alterace porinů vnější membrány, které působí spolu se změnami na PBP.

Mozaikové PBP u kmenů *Neisseria meningitidis*

- Gen *penA* produkce PBP 2 s nízkou afinitou k penicilinům, zčásti je tento gen shodný s geny *N. flavescens* a *N.cinerea* – tyto druhy jsou přirozeně rezistentní k penicilinu a jsou to komensální, může však docházet k výměně genetické informace.

Nízká afinita k PBP u enterokoků

- PBP enterokoků mají přirozeně nízkou afinitu k penicilinům a žádnou k cefalosporinům.
- Mají 5 druhů PBP. Prostřednictvím mutací a rekombinantních mechanismů dochází k minimalizaci afinity PBP (zejména PBP typu 5) k penicilinům a tím k projevu vysoké R k penicilinům.

Zdroj: *Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites*, P.A. Lambert / *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005) 1471 – 1485).

Změna cílové struktury

Ribozomální modifikace

Změny 23S rRNA a změna proteinů 50S ribozomální podjednotky

- **Rezistence ke skupině „MLS“ (makrolidy, linkosamidy, streptogramin B)**
 - je způsobena posttranskripční modifikací 23S rRNA komponenty 50S podjednotky ribozómu, která zahrnuje metylaci a dimethylaci klíčových adeninových bazí v oblasti funkční domény peptidyltransferázy.
 - Methylace je katalyzována adeninspecifickými N-metyltransferázami determinovanými skupinou genů *erm*, která je přítomna u mnoha typů mikroorganismů a je nesena na plazmidu.
- **Rezistence k makrolidům u *Streptococcus pneumoniae***
 - modifikace způsobuje enzym metyláza prostřednictvím dimethylace adeninu – výsledkem je rezistence na makrolidy, linkosamidy a streptograminy typu B.
 - proti tomuto mechanismu rezistence je odolný nový ketolid telithromycin.
- **Mechanismus rezistence na oxazolidinony**
 - je založen na mutaci zasahující 23S rRNA a byl popsán u VRE (vankomycin rezistentní enterokoky) a u kmenů *E.coli*.

Změna cílové struktury

Ribozomální modifikace

Změny 16S rRNA a změna proteinů 30S ribozomální podjednotky

- Jeden z mechanismů rezistence na aminoglykosidy je způsoben mutací zasahující 16 S rRNA, jedná se o změny na pozicích 1400, 1401 a 1483,
- nejčastěji byla např. u kmenů mykobakterií zaznamenána výměna A za G v pozici 1400.
- Substituce na dalších pozicích byly popsány u kmenů mykobakterií s rezistencí na streptomycin a další aminoglykosidy (amikacin, kanamycin, gentamicin, tobramycin a neomycin).

Změna cílové struktury

Změny peptidoglykanu

■ Snížené množství peptidoglykanu v buněčné stěně a alterované stem peptidy

■ popsán u rezistence na vankomycin.

■ zaznamenána např. u kmenů stafylokoků (VRSA... GRSA = vancomycin resistant *St.aureus*) a u kmenů s intermediární rezistencí (VISA ... GISA = vancomycin intermediate-resistant *St.aureus*).

■ Při porovnání s kmeny citlivými ke glykopeptidům, zjistili bychom například :

- řada změn v metabolismu jejich buněčné stěny včetně dvojnásobného nárůstu tloušťky buněčné stěny,
- nárůst proporce peptidoglykanových stem peptidů obsahujících zbytky glutaminu (non-aminated glutamine) a
- snížená provázanost peptidoglykanové struktury.
- O těchto faktorech je známo, že způsobují intermediární rezistenci k vankomycinu prostřednictvím **afinitních chytacích (trapping) mechanismů**. U silnější buněčné stěny s mnoha vazebnými místy pro vankomycin bylo prokázáno, že „chytá“ molekuly antibiotik a tak snižuje počet molekul vankomycinu, které prostoupí až k cytoplazmatické membráně, kde jsou umístěny transglykosylátové cíle (... prostřednictvím těchto cílů účinkují glykopeptidy na b.s. bakterií zábranou inkorporace D-Ala-D-Ala).

Změna cílové struktury

Modifikace prekurzorů peptidoglykanu

Nejčastější příčina rezistence na glykopeptidy u kmenů *E. faecium* a *E. faecalis*

- získání jednoho nebo dvou genových klastrů nazývaných **VanA a VanB**.
- Tyto genové klastry kódují enzymy -producenty modifikovaných prekurzorů peptidoglykanu končící D-Ala-D-**Lac** místo D-Ala-D-**Ala**.
- Rezistence ke glykopeptidům v důsledku exprese genů VanA a VanB klastrů je **indukována přítomností glykopeptidových antibiotik**, procesem, který je regulován dvousložkovým regulačním mechanismem *vanRS* a *vanR_B S_B*.
- Genové klastry zodpovědné za VanA a VanB rezistenci jsou lokalizovány na přenosných elementech a na šíření těchto elementů na další kmeny v rámci rodu *Enterococcus* se může podílet jak **transpozice tak přenos plazmidů**.
- Intrinsic rezistence byla popsána u *E. caselliflavus* a *E. gallinarum* a byl zde detekován klast *VanC*.
- Raritní je výskyt rezistence a determinant *VanD*, *VanE* a *VanF*.

Změna cílové struktury

Modifikace prekurzorů peptidoglykanu

- V roce 2002 byl poprvé zjištěn MRSA kmen *Staphylococcus aureus* s vysokou rezistencí na glykopeptidy (MIC = 32 mg/l)
- u něj popsána determinanta VanA získaná od enterokoků.
- Přítomnost dvou odlišných typů mechanismů rezistence na antibiotika u téhož kmene :
 - **SCC*mecA*** na chromozómu a **Van A** klastru na plazmidu => velké změny ve složení peptidoglykanu.
- Byly tak objeveny dva genové klastry, které používají různé sady enzymů pro dosažení modifikace peptidoglykanu.
- V procesu klinického hodnocení - nová antibiotika účinná na VRE a MRSA kmeny a vykazují zároveň zlepšené farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti :
 - ORITAVAMYCIN (derivát chloroeremomycinu – analog vankomycinu),
 - TELAVANCIN (analog vankomycinu)
 - DALBAVANCIN (analog teikoplaninu s vylepšenými vlastnostmi adsorpce, distribuce a metabolismem a exkrecí).

Změna cílové struktury – další mechanismy

Rezistence k izoniazidu způsobená změnami v syntéze kyseliny mykolové

- Geny *katG*, *inhA* a *kasA* u klinických izolátů *Mycobacterium tuberculosis* rezistentních na INH. Dva důležité enzymatické cíle zásahu INH jsou inhibovány:
 - NADH – dependentní enoyl ACP reduktáza kódovaná genem *inhA*
 - B-ketoacyl ACP syntéza kódovaná genem *kasA*

Ztráta účinnosti pyrazinamidázy v důsledku mutace *pncA* genu

- Ztráta účinnosti pyrazinamidázy vede k rezistenci na pyrazinamid u kmenů *Mycobacterium tuberculosis*. Mechanismus účinku spočívá v hydrolýze pyrazinamidu uvnitř buňky a selhání efluxu výsledné pyrazonové kyseliny, což vede k acidifikaci vnitřního prostředí buňky, která způsobí její smrt.

Změny iso-leucyl-tRNA syntetázy vedoucí k rezistenci na mupirocin

- vysoká hladina rezistence k mupirocinu je způsobena plazmidem přenášeným genem *mupA* nesoucím informaci o druhotné mupirocin rezistentní iso-leucyl-tRNA syntetáze. Nízká hladina rezistence naopak vzniká bodovou mutací na chromozomálně lokalizovaném genu *ileS*. Popsáno u kmenů *St.aureus*.

Elongační faktor G

- Rezistence kmenů *St.aureus* vzniká v důsledku alterace EF-G cílového místa.
- Je způsobena bodovou mutací chromozomálního genu *fusA* kódujícího EF-G.

Lipopolysacharidy

- Chemická modifikace interakce polymyxinové antibiotikum + lipopolysacharid.
- V oblasti lipidu A dochází k modifikaci diglukosaminových komponent a jejich provázanosti s estery fosfátů. Popsáno u gramnegativních bakterií.



Změny průniku ATM do buňky:

Impermeabilita

- **Mechanicky**
- **Energeticky**

Efflux (aktivní vyloučení)

Impermeabilita

MECHANICKÉ ZABRÁNĚNÍ PRŮNIKU ATB DO BUŇKY

Změna molekuly přenašeče

- Změna prostorové konformace vedoucí k zúžení porinového kanálu a tím bloku průniku antibiotika.

Alterace aktivního transportního proteinu

- Změnou v aktivním centru transportního enzymu se není schopno antibiotikum navázat a není transportováno do prostoru buňky.

Změnou charakteru povrchu buňky modifikace lipopolysacharidů

- Modifikace lipopolysacharidů (LPS) zachycením polykationických sloučenin nebo mutací vede ke zvýšení rezistence k **hydrofobním atb**

Zabránění průniku antibiotika do buňky pomocí porinů

- Antibiotika jako β -laktamy, chloramfenikol a fluorchinolony pronikají přes membránu gramnegativních mikroorganismů přes poriny. Proto změny v počtu porinů, jejich velikosti a selektivitě vedou ke změně propustnosti výše uvedených antibiotik
 - první kolo „selekce průniku“ je podle velikosti atb, další podle náboje
 - izoláty rezistentní na β -laktamy většinou kombinují mechanismus ztráty odpovídajících porinů a enzymatickou likvidaci pomocí betalaktamáz, někdy ale také postup může spočívat ve „zúžení“ porinového kanálu

Impermeabilita

ENERGETICKÝ DEFICIT – OVLIVNĚNÍ SYSTÉMU ATP

- je-li atb přenášeno aktivním transportem – vyžaduje to energii – mutací nebo plazmidově kódovanou informací může dojít k ovlivnění tvorby ATP, což má za následek snížení nebo zastavení transportu atb do bakteriální buňky

Impermeabilita

ELIMINACE NEBO AKTIVNÍ VYLOUČENÍ ATB:

- Systémy **efluxních pump** vylučují léčiva různých chemických a strukturálních skupin vně bakteriální buňky pomocí na energii závislých bakteriálních mechanismů, aniž by byla léčiva rozkládána nebo alterována.
- Efluxní transportéry tvoří asi 6 až 18 % všech transportních systémů bakteriální buňky.

Efflux

Tyto systémy lze také rozlišit na:

- **jednosložkové systémy – transport přes cytoplazmatickou membránu**
 - hlavně u grampozitivů
 - eflux makrolidů a fluorochinolonů
 - příklady - NorA u *St. aureus* – fluorochinolony
 - MefA *Str.pyogenes* – makrolidy
 - MefE *Str. pneumoniae* - makrolidy
- **vícesložkové systémy – spojené s periplazmatickým membránovým proteinem**
 - fúze (MFP) a proteinem vnější membrány (OMP),
 - výskyt u gramnegativních mikroorganismů
 - hlavní mechanismus RND

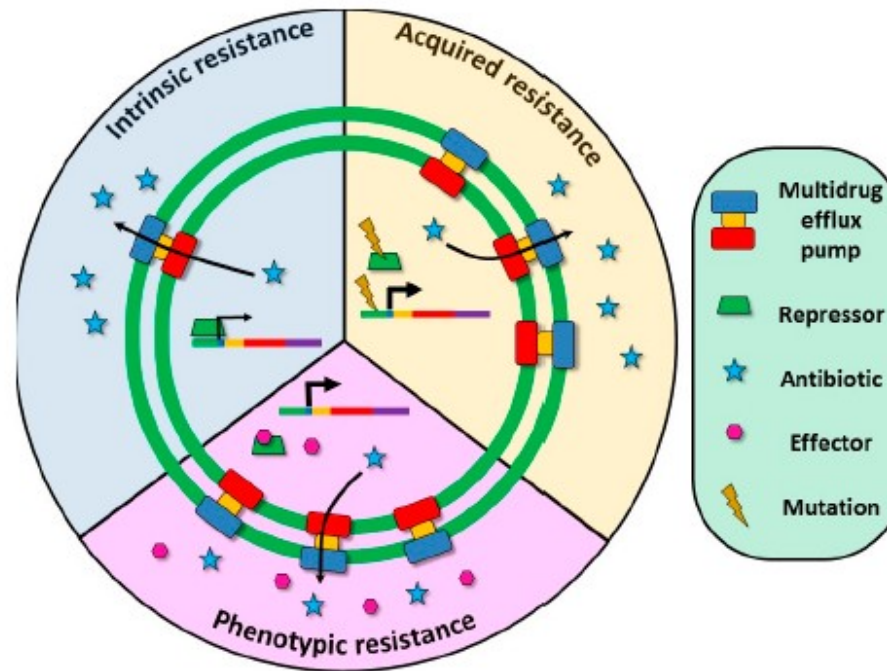


Figure 2. Role of multidrug efflux pumps in antibiotic resistance. Expression of efflux pumps is frequently down-regulated by transcriptional repressors encoded upstream of the pump operon. Consequently, MDR efflux pumps can contribute to the phenotype of antibiotic resistance at different levels, depending on their expression level. Intrinsic resistance: Some MDR efflux pumps, such as *P. aeruginosa* MexAB-OprN [62] or *E. coli* AcrAB-TolC [63], present a basal level of expression, enough for contributing to the intrinsic antimicrobial resistance of these microorganisms (blue in the Figure). Acquired resistance: De-repression of the expression of the efflux pumps can be achieved by mutations at the regulatory proteins, rendering stable acquired resistance (yellow in the Figure). Phenotypic resistance: The expression of efflux pumps can be triggered in the presence of specific inducers, rendering transient phenotypic resistance (pink in the Figure).

PRINCIP AKTIVNÍHO EFLUXU

Energeticky závislý systém, vázaný na membránové specifické proteiny

- V současnosti je známo 5 základních systémů aktivního efluxu :
 - **(a) Major facilitator superfamily (MFS)**
 - **(b) ATP – binding cassette (ABC) superfamily**
 - **(c) Small multidrug resistance (SMR) family**
 - **(d) Resistance-nodulation-cell division (RND) superfamily**
 - **(e) Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family**

Major facilitator superfamily (MFS)

- Velká a různorodá skupina
- zahrnuje asi tisíc transportérů:
 - katalyzují **uniport**, **symport** látka / kation (H^+ a Na^+),
 - **antiport** látka/ H^+ nebo
 - **antiport** látka/látka.
- Uplatňují se při transportu:
 - cukrů, metabolitů, anionů a léčiv.
- Skládají se ze 12- až 14- transmembránových segmentů
- obvykle fungují jako jednosložkové pumpy např. *NorA St.aureus*
- U některých gramnegativních bakterií fungují spolu s MFP) a OMP a jsou tedy vícesložkové, např. *E.coli* –EmrAB – TolC

ATP – binding cassette (ABC) superfamily

- Tento systém lze zahrnout do:
 - kategorie sníženého příjmu látek,
 - kategorie aktivního vylučování – efluxu.
- Systém využívá energie vznikající hydrolýzou ATP.
- Funguje u cukrů, AK, iontů, léčiv, polysacharidů a proteinů.
- Transportní proteiny z této skupiny jsou multiproteinové komplexy tvořené:
 - integrálními membránovými proteiny – fungují v rámci transportních pórů v cytoplazmatické membráně
 - cytoplazmatickými proteiny s ATPázovou aktivitou.
 - většinou tvoří dimery – dvě ATPázové podjednotky spojené s permeázami na straně cytoplazmy vnitřní membrány
- Tento systém je poměrně **raritní u bakterií** (popsán např. u *Lactococcus lactis*) , ale **u prokaryot je známo asi 20** takových systémů.

Small multidrug resistance (SMR) family

- Transportéry z této skupiny se skládají:
 - z přibližně 110 AK zbytků a
 - 4 transmembránových segmentů.
- Podílejí se na efluxu barviv, léčiv a kationtů.
- S ohledem na malou velikost se dříve předpokládalo, že fungují jako trimery,
- později bylo objasněno, že **aktivní** jsou ve formě **tetramerů**.
- Některé z těchto systémů byly popsány u *St.aureus* (Smr pumpa) a *E.coli* (EmrE pumpa),

Resistance-nodulation-cell division (RND) superfamily

- Původně se vědci domnívali:
 - že existuje jen u eubakterií,
 - nyní byl popsán i eukaryot a archeí.
- Eflux funguje jako **antiport** substrát /H⁺.
- většinou kódovány **chromozomálně** (intrinsic)
- v současnosti byly nalezeny i **plazmidově** (získaná R) kódované typy.
- RND pumpy se uplatňují u gramnegativních mikroorganismů jako „multidrug transporters“ .
- Systém popsán:
 - u kmenů mykobakterií ;
 - u kmenů *Pseudomonas aeruginosa* eflux antibiotik, těžkých kovů, barviv, detergentů, rozpouštědel a dalších látek.
- V posledních letech byly objeveny a prozkoumány složky RND systému => NEXT SLIDES:

Složky RND systému :

v roce 2000

- **proteiny kanálu vnější membrány (outer membrane channel proteins)**
 - Trimer tvořící dvěma strukturami podobajícími se barelům, kotví tunelovitou strukturu uzpůsobenou pro transport

v roce 2002

- **RND transportéry vnitřní membrány (inner membrane RND transporters)**
 - Tyto komponenty jsou zodpovědné za rozpoznání molekuly, kterou je třeba efluxem vyloučit.
 - dvě velké periplazmaticky umístěné kličky (loops) – cca 300 AK, které jsou schopny interagovat se substrátem a rozpoznat jej.

v roce 2004

- **Periplazmatické MF proteiny (periplasmic MFP)**
 - kruhové struktury interagující:
 - s proteiny kanálu vnější membrány + s RND transportéry.
 - Jsou nepostradatelné pro kompletaci i pro funkci efluxního transportu

Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family

Před časem řazen k MFS skupině, ale nyní vyčleněny pro strukturální odlišnost od MFS transport syst.

- Tyto proteiny jsou tvořeny:
 - zbytky přibližně 450 aminokyselin
 - 12 transmembránových segmentů.
- Proteiny patřící do této skupiny využívají Na⁺ gradient jako zdroj energie k efluxu kationických barviv a **chinolonů**.
- Příkladem proteinů z této skupiny může být *NorM* u *Vibrio parahaemolyticus* a jeho obdoba u *E.coli* protein *YdhE*.

Tzv. **vícelékové efluxní proteiny** (multidrug eflux proteins),

- specifické exportní proteiny kódované plazmidy nebo chromozomálně.
- pumpují tetracykliny, fluorochinolony, chloramfenikol, erytromycin, β-laktámy , z jiných například **dezinfekčních** látek jsou tyto mechanismy známé u kvarterních amoniových solí.

„Léky“ na tyto mechanismy R

- Vědci se tak jako u předchozích mechanismů rezistence i zde snaží nalézt způsoby jak systémy vyblokovat.
- V minulých letech byla pozornost soustředěna na látky patřící mezi tzv. **Eflux Pump Inhibitors (EPI)** .
 - příklad EPI – první širokospektrý inhibitor RND pumpy – potenciace účinku levofloxacinu (chinolon), popsány rovněž další nové systémy inhibice – viz :.
 - Další napomáhají vyblokovat eflux tetracyklinů. Některé látky tohoto charakteru lze izolovat ze samotných bakterií.
 - Potenciální nebezpečí EPI látek se ale může skrývat v jejich toxicitě pro transportní systémy eukaryot.
- **Bypassing Eflux Pump** jako alternativa k EPI. Zde je nebezpečí, že po čase toto překonání efluxu naindukuje nový způsob R u bakterie.



ENZYMY

- **Modifikující**
- **Inaktivující**

Produkce modifikujících či inaktivačních enzymů

Princip je u všech skupin stejný :

- modifikovat molekulu antibiotika takovým způsobem, aby přestala být účinná a nebezpečná pro bakteriální buňku,
- modifikace vede často až k úplné inaktivaci antibiotika.

Produkce modifikujících či inaktivačních enzymů

Enzymy hydrolýzy

B-laktamázy

- základní rozdělení na dvě základní molekulárně-strategické skupiny :
 - jedna je zaměřena na Serin – aktivní centrum (Ser- β -laktamázy)
 - druhá na Zn $^{2+}$ centrum (metalo- β -laktamázy)

Esterázy makrolidů

- přítomnost genů nesoucích informaci o esteráze a tutíž R na makrolidy je nesena na mobilním genetickém elementu, což umožňuje její přenos v bakteriální populaci
- mechanismus je zásah do esterové vazby uvnitř cyklické molekuly makrolidu, reverzní kruh-otevírající zásah esterázy ... likvidace cyklického uspořádání molekuly makrolidu

Epoxidázy

- účinek na fysfomicin, destrukcí reaktivního epoxidu otevřením kruhové struktury fosfomicinu

Produkce modifikujících či inaktivačních enzymů

Transfery skupin

- Skupina modifikujících enzymů s velkou rozmanitostí. Tyto enzymy kovalentně modifikují antibiotika, což má za následek alteraci struktury ATB, která ovlivní vazbu na cílovou strukturu bakterie.

Acetyltransferázy

- O-acetylace, N-acetylace,
- popsány u aminoglykosidů, chloramfenikolu, streptograminů

Fosfotransferázy

- patří mezi kinázy
- katalyzují přenos fosfátu, typicky z ATP
- aminoglykosidové fosfotransferázy
- popsány i u některých makrolidů (erytromycin) a u některých peptidových antibiotik (viomycin) a rifampicinu

Thioltransferázy

- thiolát glutationu se účastní otevření kruhu fosfomycinu (viz výše zmíněno u epoxidáz)

Produkce modifikujících či inaktivačních enzymů

Transfery skupin – pokračování

Nukleotidyltransferázy

- popsány dvě hlavní skupiny nukleotidyltransferáz:
- ANTs – modifikují aminoglykosidy
- Lin – modifikují linkosamidy (linkomycin, klindamycin)
- ANTs jsou sice málo skupinou, co do strukturální rozmanitosti, ale mají velký klinický význam, takto lze vyblokovat např. účinek gentamicinu nebo tobramycinu – gen je zastoupen v bakteriálních populacích a jeho aktivace probíhá při používání atb z dané farmakologické skupiny

ADP-ribosyltransferázy

- modifikační mechanismus známý u prokaryot i eukaryot
- tento mechanismus popsán např. u mykobakterií a R na rifampicin

Glykosyltransferázy

- glykozilace makrolidů a rifampicinu, není příliš rozšířena, ale může nabýt na významu je-li např. u nokardiové infekce takto podmíněná R

Produkce modifikujících či inaktivačních enzymů

Jiné enzymatické systémy rezistence

Redoxní enzymy

- Jedná se o oxidační nebo redukční mechanismy – nepříliš rozšířené mezi bakteriemi.
- *Streptomyces virginiae* producent streptograminového antibiotika virginiamycinu (dříve používán ve veterinární medicíně jako stimulant růstu). Tato bakterie se chrání proti „selfkillingu“ mechanismem redukce ketonové skupiny, takže vzniká antibioticky inaktivní sloučenina

Lyázy

- enzymy způsobující štěpení vazeb C-C nebo C-O nebo C-N nebo C-S. Způsob štěpení není ani hydrolýza ani oxidace. Tento mechanismus vede často k vytvoření dvojité vazby nebo uzavření kruhu. Popsáno u streptograminu B.



Mechanismy rezistence

u jednotlivých skupin antibiotik

**Nejrecentnější seřazení a výčet viz publikace
Duijkeren, 2018, případně Pokludová 2020**

Tetracykliny (streptokoky, stafylokoky)

aktivní buněčný eflux (efluxová pumpa v cytoplazmatické membráně)

- vyloučení atb z buňky dříve než zasáhne cílové místo, geny podmiňující eflux jsou nesený transpozóny
- jako ochrana proti efluxu u tetracyklinů – nová forma modifikace na glycylyklyny

nedostupnost cílových ribozómů

- v důsledku zablokování bílkovinami kódovanými *tet* geny – tyto geny jsou umístěny na transpozónu chromozómu nebo také na plasmidech, přenos je možný konjugací

alterace molekuly

- rezistence způsobená acetylací nebo fosforylací ribozómové bílkoviny nebo r RNA
- *tet* determinanty
- byl dokázán i přenos mezi nepříbuznými taxony:
 - *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, streptomycety
 - u proteů chromozomální rezistence
 - plasmidová rezistence u *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*
 - *Pasteurella multocida* nese geny *tet* rezistence z G+ a G- bakterií

Chinolony

existuje trojí mechanismus rezistence (pokud dojde ke kombinaci mechanismů, kmeny mají často hodnoty MIC 128 – 1000 mg/l)

modifikace gyrázy (bakteriální topoisomerasa II) –

- mutací genu *gyrA* nebo *gyrB*, takto modifikovaná gyráza navozuje rezistenci ke všem chinolonům

modifikace porin determinujícího genu *OmpF* mutací, vede ke snížené nebo zcela vymizelé schopnosti akumulace chinolonů

únik a eflux chinolonů z buňky – stafylokoky, proteus

- jelikož chinolony neexistují v přírodě, neměly analoga mezi mikrobiálně biosyntetizovanými produkty před jejich vývojem a zavedením do humánní a veterinární medicíny.
- Jednotlivé mutace v „chinolony determinujících oblastech“ bakteriálního genomu umožňují zvýšené přežití, následující „hot spot“ mutace vyvolávají vždy vyšší stupeň rezistence
- Vznik rezistence k chinolonům byl u všech druhů bakterií zjištěn brzy po zavedení těchto sloučenin do klinického užívání již více než před 10 lety a rozvíjí se velmi rychle.

makrolidy, linkosamidy a streptograminy

- identifikovány tři **metylázy** (geny *ermA*, *ermB* – nesený na transpozónech a *ermC* nesený na malém plazmidu) - způsobují ribozomální modifikaci
- nejčastěji byl identifikován gen *ermC* u kmenů stafyloků izolátů z humánního i veterinárního materiálu (Werckenthin et al., 1997)
- u streptograminů popsány také jiné přenosné mechanismy jako inaktivační enzym streptogramin-A **acetyltransferáza** (*sat*-gen) a streptogramin-B **hydroláza** (*vgb*-gen) – popsány u stafyloků a enterokoků (Zervos, 1997)

Aminoglykosidy

Popsána kombinace mechanismů :

1. snížená permeabilita

- změna bílkoviny zevní membrány, alterace aktivního transportního systému

2. alterace cílové struktury

- snížená vazba na 30 S ribozóm

3. alterace molekuly aminoglykosidu

- modifikace (změna)
 - - **acetylací** aminoskupin aminoglykosidu (=AMG)
 - - **fosforylace** hydroxylových skupin molekuly AMG
 - - **nukleotidylace** hydroxylové skupiny AMG
- modifikace jsou způsobeny modifikujícími enzymy, které bakterie produkuje

Aminoglykosidy – alterace molekuly - modifikace

Acetylace

- **AAC (2)** enzym acetyláza – determinace geny na chromozómech (*Providentia spp., Serratia marcescens, Enterococcus faecium, Acinetobacter haemolyticus*)
- **AAC (6) I** acetyluje a způsobuje rezistenci k AMI ne ke GEN determinanty na plazmidech (determinanta je schopna inzerce do plazmidů a transpozónů nesoucích rezistence i na jiná antibiotika)
- **AAC (6) II** acetyluje a způsobuje rezistenci ke GEN ne k AMI , tento enzym je přítomen u kmenů pseudomonád a také až u 50 % kmenů enterobakterií

Adenylace

- **ANT (2) I** aminoglykosid nukleotid transferáza – u pseudomonád, enterobakterií
- **ANT (4)** méně častá

Fosforylace

- **APH (3)** rezistence ke KAN, NEO Nejméně 7 enzymů s označením **APH (3) I až VII**
- **APH (3) I** pseudomonády, G- fermentující tyčky
- **APH (3) VI** acinetobacter, aktivní ke všem aminoglykosidům

Zvláštní postavení má bifunkční enzym

- **APH (2) + AAC (6)**
- určuje rezistenci vysokého stupně ke gentamicinu u *Enterococcus faecalis*
- u stafylokoků je rezistence k aminoglykosidům u 40 % kmenů jen tímto bifunkčním enzymem

β - laktámy

- mechanismy založené na PBP (viz výše) => tento typ má MRSA
- mechanismy štěpení těchto antibiotik enzymy - β -laktamázy

β -laktamázy

- produkované G+ i G- tyčkami, koky, anaeroby i mykobakterii
- genetické determinanty uloženy na chromozómech i na plazmidech

- inhibitory β -laktamáz mají zanedbatelnou hydrolytickou schopnost,
- ale váží se na aktivní centrum a inhibují tak hydrolytickou aktivitu enzymu β -laktamázy (příklady kyselina klavulanová, sulbaktám, tazobaktám), tyto inhibitory se používají v kombinaci s β -laktámovými ATB – amoxicilinem, ampicilinem, ticarcilinem, piperacilinem, nově také s cefoperazonem)

Klasifikace β -laktamáz

EXISTUJE NĚKOLIK KLASIFIKAČNÍCH SYSTÉMŮ !!!

Klasifikace dle:

- Hydrolytického spektra
- Citlivosti k inhibitorům beta-laktamáz
(dle Bushové, Jacobyho a Medeiros)
- Dle genetické charakteristiky a příbuznosti
- Dle toho, zda jsou nesené plasmidy či chromozomy

Klasifikace dle Bushové- Jacobyho a Medeirosse

skupina 1

● ● ● ●

cefalosporinázy, které **nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou**

- Většinou kódovány chromozomálně
- Vybrané z nich odpovídají třídě B dle Amblera
- Hlavní producenti jsou enterobakterie a *Pseudomonas aeruginosa*

Klasifikace dle Bushové- Jacobyho a Medeirosse

skupina 2

penicilinázy a / nebo cefalosporinázy, které **jsou inhibovány kyselinou klavulanovou**

- Obvykle plasmidy kódované enzymy
- Členění do podskupin dle preferovaného substrátu
- Do této třídy bývají řazeny i širokospektré betalaktamázy (ESBL) – třídy A

Klasifikace dle Bushové- Jacobyho a Medeirosse

skupina 3

Jsou závislé na zinku (proto metalobetalaktamázy) a **nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou**

- Nazývají se také metalobetalaktamázy (MBL), molekulární třídy B
- Hydrolyzují široké spektrum beta-laktamů, včetně karbapenemů, s výjimkou aztreonamu

Klasifikace dle Amblera (tř.A a B)

Třída A

- Kódovány plasmidy, s výjimkou genů *Klebsiella* spp., *Proteus vulgaris*, *Bacteroides* spp.
- **TEM-1** a **SHV-1** enterobakterií
- Jejich mutací vznikly AmpA betalaktamázy širokého spektra (řadí se mezi ESBL)

Třída B

- Destruuje karbapenemy
- **IMI, VIM, SPM** a další karabapenemázy
- Producteme je např. *Stenotrophomonas maltophilia*

Klasifikace dle Amblera (tř.C a D)

Třída C

- Chromozomální beta-laktamázy typu **AmpC**, s inducibilním nebo konstitutivním charakterem
- Producenti: *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella morganii*, *Serratia* spp. a *Pseudomonas aeruginosa*

Třída D

- Hydrolyzuje vysoce především oxacilin
- **OXA** betalaktamázy
- Producenti *Aeromonas* spp. a nefermentující tyče

Epidemiologicky velký význam

■ **ESBL** (= **E**xtended **S**pectrum **B**eta-**L**actamases)

- nejčastěji popsány u *E. coli* a *Klebsiella pneumoniae*, ale i u mnoha dalších G- baktérií.
- Většina ESBL jsou deriváty enzymů TEM a SHV.
- Rezistence vzniká na peniciliny, cefalosporiny 1., 2. a 3. generace, a aztreonam (monobaktam). ESBL hydrolyzují tyto antibiotika.
- Vybrané ESBL mohou být inhibovány inhibitory β -laktamáz.

■ **AmpC**

- **chromozomální β -laktamázy,**
- Účinek proti **cefalosporinům třetí generace** (ceftriaxon, cefotaxim) a **nejsou inhibovány kyselinou klavulanovou.**
- třída C a do funkční skupiny 1 (Ambler)
- **ESCAPPM** (*Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter* spp., *Proteus vulgaris*, *Providencia* spp., *Morganella morganii*.) Použití cefalosporinů třetí generace k léčbě těchto infekcí **vede k selekci mutantů**, které **hyperprodukují AmpC** – velký problém u nozokomiálních (nemocničních infekcí).

AmpC - pokračování

- indukovatelné enzymy primárně lokalizované na chromozómu
- preferenčně aktivní k cefalosporinům
- gen *AmpC* lokalizovaný na chromozómu kóduje **enzym indukovatelný** cefoxitinem, imipenemem a aztreonamem
- existují však také **konstitutivní mutanty**, které produkují enzym beta-laktamázu bez přítomnosti ATB induktoru
- enzym typu *AmpC I* byl zjištěn v kódování FOX-1 na plazmidu u *Klebsiella pneumoniae*
- *AmpC* derivované enzymy BIL-1, FEC-1, MEN-1 nehydrolyzují cefamyciny

ESBL betalaktamázy

TEM - primárně aktivní = destruuující peniciliny i cefalosporiny

- v jedné je i **TEM-1** plazmidová β -laktamáza G- tyček (tato β -laktamáza byla poprvé izolována v Řecku a název – zkratka byla vytvořena ze jména pacientky (Temoniera) od níž byl izolován kmen *E.coli*)
- **TEM-2 a SHV-1** peniciliny a cefalosporiny, ALE jsou citlivé k inhibitorům β -laktamáz

ESBL β -laktamázy (extended spectrum ...)

- jsou odvozené z dosud známých β -laktamáz, od kterých se liší většinou nepatrnou substitucí aminokyselin v molekule a rozšířeným spektrem účinku
- charakteristická je aktivita vůči ceftazidimu, cefotaximu a aztreonamu
- bylo popsáno již asi 40 enzymů derivovaných od TEM-1, TEM-2 a TEM-13 a více než 15 s TEM nepříbuzných
- SHV deriváty označované jako CAZ-4 a CAZ-5 s vyšší afinitou k cefotaximu než ceftazidimu

Klasifikace β -laktamáz

β -laktamázy s úplně rozšířeným spektrem účinku

- nejsou derivovány z TEM a SHV enzymů
- jedním z nich je **MIR-1**, na které je zajímavé především to, že není vnímavá k inhibitorům β -laktamáz (spektrum účinku cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxon, ceftibufen, aztreonam, cefoxitin, cefmetazol, cefotetan, moxalactam)
- nepojmenovaný enzym (dle plazmidu s původním pracovním označením pMS350) izolovaná z kmenů *Pseudomonas aeruginosa* (hydrolyzuje imipenem, ceftazidim, cefotaxim, cefoxitin, cefmetazol, cefotetan, moxalactam a peniciliny), nehydrolyzuje piperacilin a aztreonam

Inducibilní β -laktamázy *Stenotrophomonas maltophilia* L1 a L2

- L1 - metaloenzym - především penicilinázová a karbapenemová aktivita
 - nehydrolyzuje aztreonam
 - není citlivý k inhibitorům β -laktamáz
- L2 - v aktivním místě AK serin - štěpí cefalosporiny a aztreonam
 - je ovlivnitelný inhibitory (k. klavulanovou)

Přenos β -laktamáz

- Plazmidový, původně se šířily pouze mezi enterobakteriemi, později na *Pseudomonas aeruginosa* a další nefermentující G – tyčky
- byl také prokázán přenos na *Haemophilus influenzae* a *Neisseria gonorrhoeae* – zde se ale plazmidy nereplikují.
- Prokázán přenos také mezi stafylokoky a enterokoky.

Rozšíření specifity

- Je zajímavé, že k rozšíření specifity stačí často náhrada jedné AK v řetězci :

Příklady:

- **TEM-1** náhrada **argininu za serin na pozici 164** má za následek rozšíření specifity na aztreonam a ceftazidim a tento enzym má již také jinou klasifikaci – **TEM-12**
- Další zajímavostí je, že někdy může být stejná specifita ve dvou variantách obsazení AK v řetězci :
 - lyzin **104** a serin 164 **TEM-26**
 - lyzin **240** a serin 164 **TEM-10**